

CHARLES GAUTHIER, M.Sc., chimiste

**AMÉLIORATION DU COMPORTEMENT BIOPHARMACEUTIQUE DE
TRITERPÈNES NATURELS ANTICANCÉREUX PAR SYNTHÈSE DE
SAPONINES MONO- ET BIDESMOSIDIQUES**

Thèse présentée

au Réseau de l'Université du Québec

comme exigence partielle du Doctorat en Sciences de l'Environnement

pour l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.)

DÉPARTEMENT DES SCIENCES FONDAMENTALES

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI

NOVEMBRE 2008



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.

“L'imprévisible est dans la nature même de l'entreprise scientifique. Si ce qu'on va trouver est vraiment nouveau, alors c'est par définition quelque chose d'inconnu à l'avance.”

- François Jacob, médecin et biologiste français, prix Nobel de médecine (1965)

RÉSUMÉ

Cette thèse décrit les travaux réalisés concernant la synthèse et l'évaluation des activités anticancéreuse et hémolytique de saponines triterpéniques naturelles et non-naturelles à génine de type lupane. D'une part, deux saponines naturelles à section α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranose provenant de plantes de la médecine traditionnelle orientale, une librairie de huit saponines bidesmosidiques à génine bétulinol et acide bétulinique ainsi que plusieurs dérivés chacotriosidiques de type lupane et germanicane ont été préparés par l'utilisation judicieuse de différents groupements protecteurs et procédures de glycosylation. D'autre part, l'étude des relations structure-activité démontre que les sections osidiques hautement polaires à la position C-3 du squelette lupane ont, dans la plupart des cas, un impact négatif sur l'activité anticancéreuse tandis que l'activité est augmentée pour les triterpènes de type germanicane. En revanche, la présence d'une section L-rhamnose à cette position accroît la cytotoxicité des saponines de type lupane. Notamment, le bétulinol 3,28-*O*-bis- α -L-rhamnopyranoside s'est révélé un puissant agent anticancéreux inhibant sélectivement la croissance des cellules provenant des cancers les plus prévalents chez l'homme ($IC_{50} = 1,7-1,9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). À l'inverse des saponines naturelles de type oléanane telles que l' α -hédérine et l'hédéracolchiside A₁, la majorité des saponines de type lupane, tout comme leurs homologues triterpéniques (bétulinol et acide bétulinique), n'induisent pas l'hémolyse des globules rouges ($HD_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), et ce, indépendamment de la nature des sections osidiques. De surcroît, l'acide 28-*O*- β -D-glucuronide bétulinique, un métabolite acyl-glucuronide, a été efficacement préparé et pourrait être utilisé en tant que prodrogue anticancéreuse. En somme, ces résultats prometteurs sont très encourageants pour le développement biopharmaceutique futur des saponines de type lupane en tant qu'agents anticancéreux d'origine naturelle.

ABSTRACT

This thesis describes the chemical synthesis and the *in vitro* evaluation of the anticancer and haemolytic activities of natural and non-natural lupane-type triterpenoid saponins. On the one hand, two naturally occurring betulinic acid saponins isolated from Chinese medicinal plants bearing an α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranose moiety, a library of eight bidesmosidic saponins with betulin and betulinic acid as aglycones as well as five lupane- and germanicane-type chacotriosidic derivatives have been synthesized via the use of different glycosylation methods such as Schmidt's normal and inverse procedures and phase-transfer conditions. On the other hand, structure-activity relationship study reveals that highly polar sugar moieties at the C-3 position of the lupane skeleton have a negative impact on the anticancer activity while the activity is increased for the germanicane-type triterpenoids. Otherwise, the presence of an L-rhamnose moiety at the same position increases the cytotoxicity of lupane-type saponins such as betulin 3,28-*O*-bis- α -L-rhamnopyranoside, which exhibited a strongly potent *in vitro* anticancer activity against the cell lines from the most prevalent human cancers ($IC_{50} = 1.7\text{-}1.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Contrary to naturally occurring oleanane-type saponins, most of the lupane-type saponins and parent triterpenoids betulin and betulinic acid do not induce any haemolytic activity against sheep red blood cells ($HD_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) independently of the nature of the sugar moieties. Also, 28-*O*- β -D-glucuronide betulinic acid, which is an acyl glucuronide metabolite, has been efficiently synthesized and could be used as an anticancer prodrug according to prodrug monotherapy strategy.

RÉSUMÉ (Version longue)

Cette thèse présente les travaux accomplis concernant la synthèse de saponines triterpéniques naturelles et non-naturelles à génine de type lupane et l'évaluation de leurs activités anticancéreuse et hémolytique. Dans un premier temps, une voie de synthèse a été développée pour la préparation de deux saponines naturelles contenant une section osidique particulière, c'est-à-dire α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranose, à la position C-3. Ces saponines d'acide bétulinique isolées de plantes de la médecine traditionnelle orientale ont été obtenues dans des rendements globaux de 10 et 27% à partir de l'allyl bétulinate selon une approche de glycosylation linéaire impliquant huit étapes de synthèse. Par ailleurs, des analyses RMN à différentes températures (0 à 100 °C) ont permis de constater l'instabilité conformationnelle caractéristique du L-arabinose oscillant entre les conformères chaises 4C_1 et 1C_4 lorsque substitué en position 2' par un groupement stériquement encombré.

Dans un deuxième temps, une librairie de huit saponines bidesmosidiques à génine bétulinol et acide bétulinique a été synthétisée par l'utilisation judicieuse de différentes procédures de glycosylation telles que la méthode inverse de Schmidt et les conditions réactionnelles par transfert de phase. L'étude des relations structure-activité a démontré que le bétulinol 3,28-*O*-bis- α -L-rhamnopyranoside se révèle un puissant anticancéreux inhibant sélectivement la croissance des cellules provenant des cancers les plus prévalents chez l'homme ($IC_{50} = 1,7-1,9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Une telle augmentation de la cytotoxicité en lien avec la présence de sections L-rhamnose suggère que les membranes de certaines cellules cancéreuses pourraient contenir des récepteurs protéiques spécifiques au L-rhamnose facilitant ainsi la diffusion de la saponine à l'intérieur du cytoplasme avant l'induction de l'apoptose.

Dans un troisième temps, l'activité hémolytique d'une série de saponines triterpéniques de type lupane semi-synthétiques a été évaluée en comparaison avec certaines saponines naturelles de type oléanane telles que l' α -hédérine et l'hédéracolchiside A₁. Les résultats révèlent que les saponines de type lupane, tout comme leurs homologues triterpéniques (bétulinol et acide bétulinique), n'induisent pas la lyse des globules rouges ($HD_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), et ce, indépendamment de la nature des sections osidiques. Quelques exceptions subsistent toutefois pour certaines saponines à génine acide bétulinique contenant des sections α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranose à la position C-3 et pour l'acide 3,28-*O*-bis- α -L-rhamnopyranoside bétulinique qui exercent une faible activité hémolytique ($HD_{50} = 78-94 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Par ailleurs, les résultats obtenus relatifs à l'évaluation de la perméabilisation des membranes cellulaires suggèrent fortement que l'activité anticancéreuse des saponines de type lupane est due à une induction de l'apoptose cellulaire plutôt qu'à la formation de pores au sein des membranes phospholipidiques comme c'est le cas pour l'hédéracolchiside A₁.

Dans un quatrième temps, la section α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]- β -D-glucopyranoside ou chacotriose retrouvée sur la dioscine, une saponine stéroïdique anticancéreuse utilisée en médecine traditionnelle orientale, a été greffée à la position C-3 des triterpènes de type lupane tels que le lupéol, le bétulinol et l'acide bétulinique. La méthodologie de synthèse impliquait la protection régiosélective des alcools en position 3' et 6' de la section glucose suivie du couplage subséquent avec des unités rhamnose via la procédure inverse de Schmidt. L'étude des relations structure-activité a montré que l'ajout d'une section chacotriosidique hautement polaire en position C-3 du squelette lupane a un impact négatif sur l'activité anticancéreuse ($IC_{50} > 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). En revanche, les dérivés de réarrangement, c'est-à-dire les chacotriosides d'allobétulinol et de 28-oxoallobétulinol, exercent une activité antiproliférative envers les cellules cancéreuses du poumon, du côlon, du sein et de la prostate ($IC_{50} = 10-18 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

Finalement, après plusieurs essais infructueux, la synthèse de l'acide 28-O- β -D-glucuronide bétulinique, un métabolite acyl-glucuronide, a été réalisée avec succès (68%, deux étapes) par l'utilisation des conditions réactionnelles de transfert de phase. Les résultats suggèrent que cette molécule pourrait être utilisée en tant que prodrogue anticancéreuse selon certains critères spécifiques à la stratégie prodrogue monothérapie (PMT). En effet, la prodrogue 1) possède une très bonne stabilité dans le tampon phosphate, 2) possède une hydrosolubilité supérieure à l'acide bétulinique, 3) est non-cytotoxique et non-hémolytique, et 4) constitue un très bon substrat libérant l'aglycone cible en présence de la β -D-glucuronidase, une enzyme surexprimée dans les zones nécrotiques des tumeurs. De plus, cette méthodologie de synthèse pourrait être utilisée ultérieurement pour la préparation des métabolites glucuronidés du bevirimat, un agent anti-VIH dérivé de l'acide bétulinique présentement en phase clinique de phase II.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je voudrais sincèrement remercier le professeur André Pichette, mon directeur de thèse, qui m'a accueilli dans son équipe de recherche depuis le début de mes études graduées. À ses côtés, j'ai grandement appris et acquis une solide expertise dans le domaine de la chimie organique des produits naturels. Je lui suis également très reconnaissant de m'avoir laissé autant de liberté et de responsabilités au sein de son laboratoire. La réussite de ce projet d'envergure lui est attribuable en grande partie grâce à ces judicieux conseils et aux ressources, tant matérielles qu'humaines, qu'il a su mettre à ma disposition afin d'atteindre les objectifs que nous nous étions fixés. Je suis certain qu'il restera un très bon ami et un collaborateur scientifique essentiel pour ma future carrière de chercheur.

Mes remerciements vont ensuite à mon co-directeur de thèse, le professeur Jean Legault, pour ses idées et conseils avertis en ce qui a trait à la partie biologie de mon projet de thèse. Sans son apport considérable à mes travaux de recherche, il m'aurait été certes plus difficile de publier dans des journaux de chimie médicinale. Je le remercie également pour avoir entrepris dernièrement une étude approfondie du mécanisme d'action de mes composés ce qui mènera bientôt à la publication d'un article d'envergure dans le domaine de la biologie moléculaire.

Un merci spécial va au docteur Vakthang Mshvildadze, professeur associé à l'Université du Québec à Chicoutimi et pharmacognosiste renommé, qui de par son expertise dans le domaine des saponines triterpéniques, m'a judicieusement éclairé dans mes recherches. C'est par nos nombreuses discussions sur les saponines que j'ai pu cibler avec justesse certains objectifs en regard de mon projet de thèse. Je le remercie également de m'avoir donné accès à sa bibliothèque personnelle de produits naturels ce qui m'a permis de réaliser une étude approfondie et unique en son genre concernant les relations entre l'activité hémolytique et la structure de saponines naturelles et semi-synthétiques.

Je tiens ensuite à exprimer de sincères remerciements au professeur François-Xavier Garneau pour le temps précieux qu'il a consacré à la lecture attentive de tous les manuscrits de cette thèse rédigés en langue anglaise. Ces nombreuses suggestions et corrections m'ont permis de m'améliorer grandement en anglais écrit et je lui en suis très reconnaissant. De plus, je le remercie d'avoir fait partie du comité d'évaluation de mon projet de thèse et de mon examen prédoctoral ainsi que pour les nombreuses lettres de référence qu'il a rédigées afin de mettre en valeur ma candidature pour certaines bourses et distinctions.

Je remercie sincèrement mon ami Serge Lavoie, assistant de recherche du professeur André Pichette, pour toute l'aide qu'il m'a apportée durant mes études supérieures à l'Université du Québec à Chicoutimi. Que ce soit pour des questions en synthèse organique, spectroscopie RMN, informatique et chimie analytique, Serge a toujours su me guider et me donner les outils nécessaires à ma compréhension tant au niveau théorique que pratique. Son importante contribution pour l'analyse détaillée des spectres RMN de plusieurs de mes composés m'auront permis de progresser rapidement dans mon projet de thèse.

J'aimerais remercier tous les étudiants du baccalauréat en chimie (Simon Rondeau, Samuel Tremblay-Fortin, Frédérick Rossignol et Sébastien Vanier), de la maîtrise en ressources renouvelables (Marianne Piochon, Philippe Dufour et Dominic Dufour) et du doctorat en sciences de l'environnement (François Simard et Dominic Thibeault) ainsi que les stagiaires post-doctoraux (Jimmy Bouchard et Véronique Gagnon), les assistants de recherche (Karl Girard-Lalancette, Maxime Dufour, Catherine Dussault, Lyne Bouchard, Carole Grenon, Angélique Longtin et Hélène Gagnon) et les techniciens de laboratoire (Caroline Potvin, André Barette, Annie Girard, Jean-Marc Gauthier et Patrick Nadeau) qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce projet de doctorat. La chimie organique étant une science très exigeante en termes de temps passé au laboratoire, il m'eut été difficile de terminer dans les délais prévus sans l'apport considérable de ces scientifiques compétents. Je remercie particulièrement Samuel et Simon, étudiants de premier cycle en chimie, qui ont travaillé pendant près d'un an sous ma supervision dans le cadre de leur projet de fins

d'études. Leur contribution a été grandement appréciée. Aussi, je remercie le département de chimie de l'Université de Montréal pour les analyses de spectrométrie de masse à haute résolution et de spectroscopie RMN à haut champ.

Je désire remercier les organismes subventionnaires qui m'ont accordé des bourses d'excellence pendant mes études doctorales ce qui m'a permis de me consacrer entièrement à ma recherche, c'est-à-dire le Fonds Québécois de Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT), la Fondation de l'UQAC et le programme d'aide institutionnel à la recherche (PAIR) de l'UQAC. Je remercie également l'Association Francophone pour le Savoir (ACFAS) de m'avoir accordé le prestigieux prix Bernard-Belleau pour un doctorat dans le domaine de la santé et de la pharmaceutique.

J'aimerais remercier de tout coeur ma blonde Marianne Piochon, étudiante à la maîtrise en ressources renouvelables de l'UQAC, pour sa présence réconfortante et chaleureuse, son écoute, sa compréhension, sa douceur, et sa grande patience à mon égard. C'est elle qui m'a donné la force et le courage nécessaires afin de passer au travers de cette ultime étape de ma vie d'étudiant. Je désire également la remercier pour sa contribution au travail de synthèse organique ainsi que pour ses corrections suite à la lecture attentive de cette thèse.

En terminant, je désire remercier spécialement ma mère, Jocelyne Boivin, qui m'a tant supporté durant mes études depuis la petite école jusqu'à mon doctorat. Merci d'être là pour moi. Merci pour ta grande générosité et ta joie de vivre. Une pensée va aussi à mon père, feu Gaston Gauthier, qui m'a insufflé la soif du savoir scientifique de par nos nombreuses discussions philosophiques sur l'Univers et la vie. Je remercie également les membres de ma famille et tous mes amis de Péribonka et d'ailleurs avec qui j'ai passé de très agréables moments durant mes études supérieures.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	iii
Abstract	iv
Résumé (version longue)	v
Remerciements	vii
Table des matières	x
Liste des figures	xiv
Liste des tableaux	xviii
Liste des annexes	xix
Liste des abréviations	xx
CHAPITRE 1 - Introduction générale	1
CHAPITRE 2 - Revue de la littérature	10
2.1. Les saponines triterpéniques.....	10
2.1.1. Généralités.....	10
2.1.2. Activités biologiques.....	11
2.1.2.1. Activité hémolytique.....	11
2.1.2.2. Activités cytotoxique et antitumorale.....	12
2.1.3. Isolement de saponines.....	14
2.1.4. Synthèse de saponines.....	16
2.1.4.1. Synthèse de monodesmosides.....	16
2.1.4.1.1. Synthèse d'arabinosides.....	18
2.1.4.1.2. Synthèse de chacotriosides.....	23
2.1.4.2. Synthèse de bidesmosides.....	27
2.1.4.2.1. Synthèse d'arabinosides naturels.....	28
2.1.4.2.2. Synthèse par glycorandomisation.....	29
2.1.4.2.3. Synthèse de bidesmosides glucuronidés.....	30
2.1.4.2.4. Synthèse du flaccidoside II.....	32
2.1.4.2.5. Synthèse totale de QS-21A _{api}	33
2.1.4.2.6. Synthèse totale du lobatoside E.....	36
2.2. Les triterpènes de type lupane.....	38

2.2.1. Généralités.....	38
2.2.2. Activités biologiques.....	39
2.2.2.1. Activités cytotoxique et antitumorale.....	40
2.2.2.2. Activité anti-VIH.....	41
2.2.3. Synthèse de l'acide bétulinique.....	42
2.2.4. Dérivés synthétiques anticancéreux.....	45
2.3. Les saponines de type lupane.....	47
2.3.1. Isolement et activités biologiques.....	47
2.3.2. Synthèse de saponines de type lupane.....	52
2.3.2.1. Groupes russes.....	52
2.3.2.2. Groupes tchèques.....	55
2.3.2.3. Autres groupes.....	57
2.3.2.4. Groupe Pichette.....	60
CHAPITRE 3 - Synthesis of two natural betulinic acid saponins containing α-L-rhamnopyranosyl-(1\rightarrow2)-α-L-arabinopyranose and their analogues.....	64
Contribution des auteurs.....	65
Résumé graphique.....	66
Résumé.....	67
Abstract.....	68
Introduction.....	69
Results and discussion.....	71
Conclusion.....	78
Experimental section.....	79
Acknowledgements.....	103
References.....	103
CHAPITRE 4 - Synthesis and cytotoxicity of bidesmosidic betulin and betulinic acid saponins.....	120
Contribution des auteurs.....	121
Résumé graphique.....	122
Résumé.....	123
Abstract.....	124

Introduction.....	125
Results and discussion.....	126
<i>Synthesis of bidesmosides</i>	126
<i>Cytotoxicity evaluation</i>	129
Conclusion.....	131
Experimental section.....	131
Acknowledgements.....	147
References.....	147
CHAPITRE 5 - Haemolytic activity, cytotoxicity, and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins.....	163
Contribution des auteurs.....	164
Résumé graphique.....	165
Résumé.....	166
Abstract.....	167
Introduction.....	168
Results.....	170
<i>Haemolysis of red blood cells</i>	170
<i>Cytotoxic activity</i>	171
<i>Permeabilization of cell membrane</i>	173
Discussion.....	174
Experimental section.....	178
<i>Chemicals</i>	178
<i>Triterpenes and saponins</i>	178
<i>Haemolytic assay</i>	179
<i>Cells culture</i>	180
<i>Cytotoxicity assay</i>	180
<i>Calcein-AM assay</i>	180
<i>Statistical analysis</i>	181
Acknowledgements.....	181
References.....	182

CHAPITRE 6 - Synthesis, cytotoxicity, and haemolytic activity of chacotrioside lupane-type neosaponins and their germanicane-type rearrangement products.....	193
Contribution des auteurs.....	194
Résumé graphique.....	195
Résumé.....	196
Abstract.....	197
Introduction.....	198
Results and discussion.....	199
Acknowledgements.....	202
References and notes.....	203
CHAPITRE 7 - Synthèse de l'acide 28-O-β-D-glucuronide bétulinique pour application dans une stratégie « prodrogue monothérapie »	214
Contribution des auteurs.....	215
Résumé graphique.....	216
Résumé.....	217
Introduction.....	218
Résultats et discussion.....	220
Conclusion.....	225
Partie expérimentale.....	226
Références.....	231
CHAPITRE 8 - Discussion générale et conclusions.....	235
LISTE DES PUBLICATIONS.....	242
LISTE DES BREVETS.....	243
RÉFÉRENCES.....	244
ANNEXE 1.....	273
ANNEXE 2.....	274
ANNEXE 3.....	276
ANNEXE 4.....	277
ANNEXE 5.....	278
ANNEXE 6.....	286

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Structures de quelques agents antitumoraux naturels (1-7) utilisés en clinique.....	2
Figure 2.	Structures de produits naturels anticancéreux (8-14) isolés de la forêt boréale.....	4
Figure 3.	Structure du bevirimat (21), un inhibiteur de la maturation du VIH.....	6
Figure 4.	Structure d'OSW-1 (22) et d'un dérivé oxygéné (23).....	13
Figure 5.	Structure de la dioscine (24), une saponine de la médecine traditionnelle orientale.....	14
Figure 6.	Synthèse pratique de la trilline (27).....	17
Figure 7.	Synthèse du 2,3,4-tri- <i>O</i> -benzoyl- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-3,4-di- <i>O</i> -benzoyl- α -L-arabinopyranosyl trichloroacétimide (34).....	19
Figure 8.	Synthèse de l' α -hédérine (28) selon une approche convergente....	20
Figure 9.	Synthèse de la β -hédérine (38) selon une approche linéaire.....	21
Figure 10.	Synthèse de l'hédéracolchiside A ₁ (45).....	22
Figure 11.	Synthèse de la section α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]- α -L-arabinopyranoside (54).....	23
Figure 12.	Première synthèse de la dioscine (24) selon une approche linéaire.	24
Figure 13.	Seconde synthèse de la dioscine (24) selon une approche linéaire..	25
Figure 14.	Synthèse de la dioscine (24) selon une approche convergente.....	26
Figure 15.	Synthèse d'une saponine bidesmosidique (75) par glycosylations successives.....	28
Figure 16.	Saponines bidesmosidiques (83 et 84) à génine de type acide ursolique (10).....	28

Figure 17.	Synthèse d'une saponine bidesmosidique (84) à génine acide ursolique (10).....	29
Figure 18.	Synthèse de bidesmosides (93-96) par glycorandomisation.....	30
Figure 19.	Saponines bidesmosidiques de type oléanane (97 et 98) contenant une section acide D-glucuronique.....	31
Figure 20.	Synthèse d'un ginsenoside Ro (98) porteur d'une section acide D-glucuronique.....	32
Figure 21.	Synthèse du flaccidoside II (105) porteur d'une section osidique Rhap(1→4)GlcP(1→6)GlcP en C-28.....	34
Figure 22.	Synthèse totale convergente de l'adjuvant de vaccins QS-21A _{api} (112).....	35
Figure 23.	Synthèse totale du lobatoside E (122), un bidesmoside cyclique anticancéreux.....	37
Figure 24.	Synthèse de l'acide bétulinique (15) par le groupe Pezzuto.....	43
Figure 25.	Synthèse de l'acide bétulinique (15) par le groupe Pichette.....	43
Figure 26.	Synthèse de l'acide 3-acétyl bétulinique (145) par le groupe Pichette.....	44
Figure 27.	Synthèse de l'acide bétulinique (15) en une seule étape avec le 4-acétimido-TEMPO.....	44
Figure 28.	Dérivés hémiphthalates (146 et 147) cytotoxiques du bétulinol (16).....	45
Figure 29.	Dérivés aminés (148 et 149) anticancéreux de l'acide bétulinique (15).....	46
Figure 30.	Souris traitées avec le dérivé Boc-lysine (149) de l'acide bétulinique (141).....	46
Figure 31.	Aglycones de type lupane retrouvés dans les saponines naturelles.....	47
Figure 32.	Saponines bidesmosidiques (157 et 158) de type lupane isolées de <i>S. rotundifolia</i>	52
Figure 33.	Synthèse de 1,2- <i>cis</i> -glycosides peracétylés de bétulinol (162-167) par la méthode des sucres orthoesters.....	53

Figure 34.	Synthèse de glycosides peracétylés de bétulinol (142, 162, 164 et 168) par la méthode de Koenigs-Knorr.....	54
Figure 35.	Synthèse de 2-désoxy- α -L-glycosides de bétulinol (171 et 173)....	54
Figure 36.	Synthèse de glucosides d'acide bétulinique (174, 176 et 177).....	55
Figure 37.	Synthèse de glucosides d'acide bétulinique (174 et 176) et de bétulinate de méthyle (179).....	56
Figure 38.	Synthèse de trimannosides 3,6-branchés (184 et 188).....	57
Figure 39.	Synthèse d'un C-28 galactoside d'acide bétulinique (190) en conditions de transfert de phase.....	58
Figure 40.	Synthèse du C-28 glucoside d'acide bétulinique (174).....	58
Figure 41.	Biotransformation de l'acide bétulinique (15) par <i>Cunninghamella</i>	59
Figure 42.	Synthèse de glycosides de bétulinol (192-198) à l'aide de la CGTase.....	59
Figure 43.	Synthèse du ribofuranoside de bétulinol 201 par glycosylation verte.....	60
Figure 44.	Sucres activés perbenzoylés utilisés pour la synthèse de monodesmosides.....	61
Figure 45.	Glycosylation avec (A) ou sans (B) groupements participants.....	61
Figure 46.	Synthèse des glycosides d'acide bétulinique (205-210).....	62
Figure 47.	Relations structure-activité des glycosides triterpéniques de type lupane.....	63
Figure 48.	Acyl glucuronides (214-216) du bevirimat (21).....	219
Figure 49.	Acide 28-O- β -D-glucuronide bétulinique (217).....	220
Figure 50.	Synthèse d'acyl glucuronides via une réaction de Mitsunobu (A) et une acylation sélective (B).....	221
Figure 51.	Synthèse d'acyl glucuronides via le système d'oxydation TEMPO/KBr/Ca(OCl) ₂	222

Figure 52.	Synthèse de l'acide 28- <i>O</i> - β -D-glucuronide bétulinique (217) par synthèse en phase hétérogène.....	222
Figure 53.	Voies de synthèse potentielles du monoglucuronide de bevirimat (214).....	223
Figure 54.	Hydrolyse enzymatique du glucuronide 217 relâchant l'acide bétulinique (15).....	225

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Nouveaux cas de cancers et décès estimés selon le sexe au Canada en 2007.....	1
Tableau 2. Triterpènes majoritaires (15-20) isolés des écorces externes de <i>B. papyrifera</i>	5
Tableau 3. Saponines triterpéniques naturelles de type lupane.....	48
Tableau 4. Activité anticancéreuse de saponines naturelles isolées de <i>P. chinensis</i>	51
Tableau 5. Cytotoxicité (IC ₅₀) et activité hémolytique (HD ₅₀) du glucuronide 217.....	224

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1.	Schéma d'extraction et d'isolement de saponines naturelles.....	273
Annexe 2.	Synthèse de saponines de type lupane et germanicane.....	274
Annexe 3.	Cytotoxicité de saponines triterpéniques de type lupane.....	276
Annexe 4.	Cytotoxicité de saponines triterpéniques de type germanicane.....	277
Annexe 5.	Article soumis à <i>Tetrahedron Letters</i>	278
Annexe 6.	Spectres RMN ^1H et ^{13}C	286

LISTE DES ABRÉVIATIONS

[α]:	rotation spécifique
Å:	Angstrom(s)
Ac:	acétyle
AcCl:	chlorure d'acétyle
ACF:	fibres de carbone activées
Ac ₂ O:	anhydride acétique
AcOH:	acide acétique
ADN:	acide désoxyribonucléique
Ag ₂ CO ₃ :	carbonate d'argent
Ag ₂ O:	oxyde d'argent
AgOTf:	trifluorométhane sulfonate d'argent
All:	allyle
AllBr:	bromure d'allyle
Api:	apiose
aq:	aqueux
Ara:	arabinose
AZMB:	2-(azidométhyl)benzoyle
B(C ₆ F ₅) ₃ :	tris(pentafluorophényl)borane
BF ₃ •OEt ₂ :	éthérate de trifluorure de bore
Bn:	benzyle
BnBr:	bromure de benzyle
Boc:	<i>tert</i> -butylcarbonyle
br:	large (spectres)
Bu ₄ NBr:	bromure de tétrabutylammonium
Bu ₄ NI:	iodure de tétrabutylammonium
Bu ₃ P:	tributylphosphine
Bz:	benzoyle
BzCl:	chlorure de benzoyle
CA:	chloroacétyle
CaH ₂ :	hydrure de calcium
calcd:	<i>calculated</i>
CAM:	molybdate d'ammonium cérique
Ca(ClO) ₂ :	hypochlorite de calcium
CCM:	chromatographie sur couche mince
CCl ₃ CN:	trichloroacétonitrile
CDCl ₃ :	chloroforme deutéré
C ₅ D ₅ N:	pyridine deutérée
CD ₃ OD:	méthanol deutéré
CGTase:	cyclodextrine glycosyltransférase
CH ₂ Cl ₂ :	dichlorométhane
CHCl ₃ :	chloroforme
CH ₃ CN:	acétonitrile
CH ₃ I:	iodométhane

CH ₃ NO ₂ :	nitrométhane
CH ₃ OH:	méthanol
CO ₂ :	dioxyde de carbone
COSY:	<i>correlation spectroscopy</i>
cpd:	composé
CrO ₃ :	trioxyde de chrome
Cs ₂ CO ₃ :	carbonate de césium
°C:	degrés Celcius
δ:	déplacement chimique en parties par million
d:	doublet (spectres)
dd:	doublet de doublet (spectres)
ddd:	doublet de doublet de doublet (spectres)
DABCO:	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
DBU:	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DEPT:	<i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DIAD:	diisopropylazodicarboxylate
DMAP:	diméthylaminopyridine
DMEM:	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMF:	diméthylformamide
DMP:	diméthoxypropane
DMSO:	diméthylsulfoxyde
ED ₅₀ :	dose efficace inhibant 50% de l'activité
éq. (<i>equiv</i>):	équivalent(s)
Et:	éthyle
Et ₃ N:	triéthylamine
EtOAc:	acétate d'éthyle
EtOH:	éthanol
fur:	furannose
g:	gramme(s)
Gal:	D-galactose
GC-MS:	chromatographie gazeuse / spectrométrie de masse
Glc:	D-glucose
GlcA:	acide D-glucuronique
h:	heure(s)
HATU:	<i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tétraméthyluronium hexafluorophosphate
H ₂ O:	eau
HBr:	acide bromique
HCl:	acide chlorhydrique
HCO ₂ H:	acide formique
HD ₅₀ :	dose présentant 50% d'activité hémolytique
Hg(Br) ₂ :	bromure de mercure
Hg(CN) ₂ :	cyanure de mercure
HMBC:	<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HOAc:	acide acétique
HPFC:	chromatographie éclair haute performance
HPLC:	chromatographie liquide haute performance

HRMS:	spectroscopie de masse à haute résolution
H ₂ SO ₄ :	acide sulfurique
HSQC:	<i>heteronuclear single quantum correlation</i>
Hz:	hertz
I ₂ :	iode
IC ₅₀ :	concentration inhibant 50% de l'activité
IsoVal:	isovaleroyl
<i>J</i> :	constante de couplage en hertz
K ₂ CO ₃ :	carbonate de potassium
KBr:	bromure de potassium
KHCO ₃ :	bicarbonate de potassium
KOH:	hydroxyde de potassium
L:	litre(s)
Lev:	levulinoyl
LiBr:	bromure de lithium
log <i>P</i> :	coefficient de partition
m:	mètre(s), multiplet (spectres)
M:	molaire (mole par litre)
Mal:	D-maltoside
Man:	D-mannose
Me:	méthyle
MeGlcA:	acide D-glucuronique méthyl ester
MeOH:	méthanol
MeOD:	méthanol deutéré
min:	minute(s)
Mg(OMe) ₂ :	diméthoxyde de magnésium
MgSO ₄ :	sulfate de magnésium
MHz:	mégahertz
mg:	milligramme(s)
mL:	millilitre(s)
mM:	millimolaire (millimoles par litre)
mmol:	millimole(s)
mol:	mole(s)
mp:	point de fusion
MPM:	<i>para</i> -méthoxyphénylméthyle (PMB)
MS:	<i>molecular sieves</i> , spectrométrie de masse
<i>m/z</i> :	ratio masse sur charge
N:	normale (équivalents par litre)
NaBH ₄ :	borohydrure de sodium
NaCl:	chlorure de sodium
NaH:	hydrure de sodium
NaHCO ₃ :	bicarbonate de sodium
NaOH:	hydroxyde de sodium
NaOMe:	méthoxyde de sodium
<i>n</i> -BuOH:	<i>n</i> -butanol
nd:	non-déterminé
NH ₂ NH ₂ :	hydrazine

NIS:	<i>N</i> -iodosuccinimide
nm:	nanomètre(s)
nM:	nanomolaire (nanomoles par litre)
NMR:	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NOESY:	<i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>
<i>P</i> :	probabilité
PBS:	tampon phosphate
PCC:	pyridinium chlorochromate
PdCl ₂ :	chlorure de palladium
Pd(OAc) ₂ :	acétate de palladium
Pd(OH) ₂ :	hydroxyde de palladium
Pd ⁰ (PPh ₃) ₄ :	tétrakis(triphénylphosphine) palladium(0)
Ph:	phényle
PhMe:	toluène
Piv:	pivaloyle
PivCl:	chlorure de pivaloyle
PMB:	<i>para</i> -méthoxybenzyle (MPM)
PPh ₃ :	triphénylphosphine
ppm:	parties par million
PPTs:	pyridinium <i>para</i> -toluènesulfonate
Pr:	propyle
Py:	pyridine
pyr:	pyrannose
R _f :	facteur de rétention
Rha:	L-rhamnose
RMN:	résonance magnétique nucléaire
RPM:	rotations par minute
rt:	température ambiante
SAR:	relations de structure-activité
SIDA:	syndrome d'immunodéficience acquise
SiO ₂ :	dioxyde de silicium
t:	triplet (spectres)
T:	température
TBAB:	bromure de tétrabutylammonium
TBAF:	fluorure de tétrabutylammonium
TBDMS:	<i>tert</i> -butyldiméthylsilyle
TBDPS:	<i>tert</i> -butyldiphénylsilyle
TBDPSCI:	chlorure de <i>tert</i> -butyldiphénylsilyle
TBS:	<i>tert</i> -butyldiméthylsilyle
TCA:	trichloroacétimide
TEMPO:	tétraméthylpiperidinyloxy
TESOTf:	triéthylsilyl trifluorométhanesulfonate
TFA:	acide trifluoroacétique, trifluorophénylacétimide
THF:	tétrahydrofuranne
TIPS:	triisopropylsilyle
TLC:	<i>thin layer chromatography</i>
TMS:	triméthylsilyle, tétraméthylsilane

TMSOTf:	trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle
TOCSY:	<i>total correlation spectroscopy</i>
Tr:	triphénylméthyle (trityle)
TsOH•H ₂ O:	acide <i>para</i> -toluènesulfonique monohydrate
μL:	microlitre(s)
μM:	micromolaire (micromole par litre)
v:	volume
VIH:	virus d'immunodéficience humaine
Xyl:	D-xylose

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

En dépit des avancées scientifiques des dernières années dans le domaine de l'oncologie, le cancer demeure la deuxième principale cause de décès dans le monde tout juste après les maladies cardiovasculaires. Au Canada, c'est plus de 39% des hommes et 44% des femmes qui développeront un cancer dans leur vie. Sur ce nombre, une personne sur quatre en mourra [Société Canadienne du Cancer, 2007]. Comme le montre le tableau 1, le cancer du poumon affecte une majorité d'hommes et de femmes et demeure le plus mortel avec 19 900 décès estimés en 2007 et un taux de survie très faible ($\approx 15\%$ après 5 ans). Selon ces mêmes estimations, les cancers du sein et de la prostate sont, chez la femme et chez l'homme respectivement, les cancers ayant la plus grande prévalence dans la population canadienne.

Tableau 1. Nouveaux cas de cancers et décès estimés selon le sexe au Canada en 2007

	Nouveaux cas estimés 2007			Décès estimés 2007		
	Total	M	F	Total	M	F
Tous les cancers	159 900	82 700	77 200	72 700	38 400	34 300
Poumon	23 300	12 400	10 900	19 900	11 000	8 900
Sein	22 500	170	22 300	5 400	50	5 300
Prostate	22 300	22 300	-	4 300	4 300	-
Colon	20 800	11 400	9 400	8 700	4 700	4 000

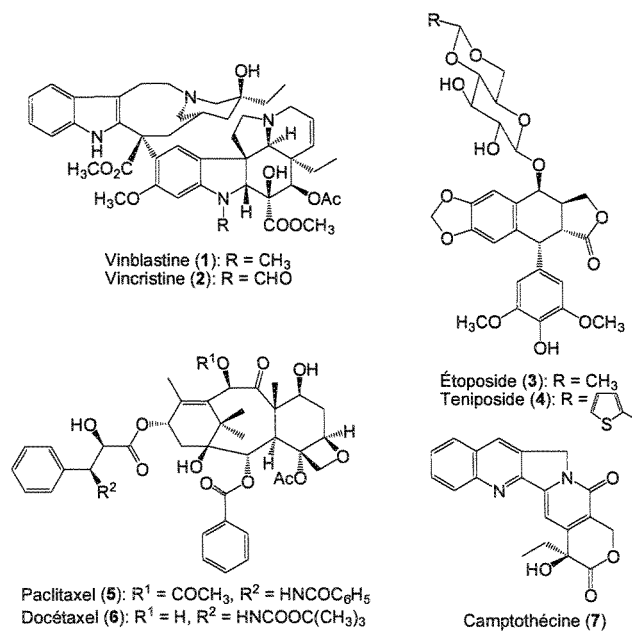


Figure 1. Structures de quelques agents antitumoraux naturels (1-7) utilisés en clinique

Après la chirurgie, la chimiothérapie anticancéreuse, c'est-à-dire le traitement du cancer à l'aide de substances chimiques habituellement administrées aux patients sous la forme d'une injection intraveineuse, est l'une des voies privilégiées par la médecine contemporaine afin de combattre cette terrible maladie. À cet effet, les composés biosynthétisés par les plantes (produits naturels) sont très prisés par l'industrie pharmaceutique en tant qu'anticancéreux [Pezzuto, 1997; da Rocha *et al.*, 2001; Lee, 2004] puisqu'ils représentent un élément unique de diversité moléculaire [Nisbet *et al.*, 1997; Butler, 2004]. De 1940 à 2006, plus de 47% des agents antitumoraux approuvés en clinique étaient des composés naturels ou leurs dérivés semi-synthétiques [Newman *et al.*, 2007]. La figure 1 illustre la grande diversité structurale des produits naturels antitumoraux utilisés en chimiothérapie dont la vinblastine (1, Velban[®]) et la vincristine (2, Oncovin[®]) extraits de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*), l'étoposide (3, VP-16[®]) et le teniposide (4, VM-26[®]) dérivés glycosylés de la podophyllotoxine isolée du rhizome de la pomme de mai américaine (*Podophyllum peltatum*), le paclitaxel (5, Taxol[®]) isolé de l'if du pacifique (*Taxus brevifolia*) et son dérivé semisynthétique le docétaxel (6,

Taxotere[®]), et la camptothécine (7, CPT[®]) extraite de l'écorce de *Camptotheca acuminata*, un arbre endémique à la Chine.

Dans le domaine des produits naturels anticancéreux, les forêts équatoriales et amazoniennes ont été souvent étudiées. Toutefois, peu d'études ont rapporté le potentiel pharmacologique des plantes et arbres de la forêt boréale. Pourtant, ce riche écosystème recèle de nombreuses espèces végétales encore inconnues de la communauté scientifique en regard de leurs compositions chimiques et propriétés médicinales. Le paclitaxel (5) et ses dérivés représentent un exemple qui illustre très bien l'énorme potentiel biopharmaceutique contenu dans la forêt boréale. En effet, cette molécule utilisée actuellement pour le traitement du cancer du sein, du poumon et des ovaires [Cragg *et al.*, 2005] avec des ventes s'élevant à plus de deux milliards de dollars a été identifiée pour la première fois en 1971 dans les aiguilles de l'if du pacifique (*T. brevifolia*) [Wani *et al.*, 1971], un conifère à croissance lente. Quelques années plus tard, des chercheurs du Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales (LASEVE) de l'Université du Québec à Chicoutimi (UQAC), au sein duquel j'ai effectué mes études graduées, ont isolé et identifié plusieurs dérivés taxanes dont le paclitaxel (5) à partir de l'if du Canada (*T. canadensis*) [Jean *et al.*, 1992; Zamir *et al.*, 1992], arbre présent dans la forêt boréale québécoise. Récemment, basé sur le savoir ancestral de la médecine traditionnelle amérindienne, les recherches effectuées au LASEVE ont permis la découverte de nouvelles molécules anticancéreuses lesquelles ont été isolées d'extraits de divers végétaux présents dans la forêt boréale. Tel qu'illustré à la figure 2, le β -caryophyllène (8) et l' α -humulène (9) identifiés dans l'huile essentielle des aiguilles du sapin baumier (*Abies balsamea*) [Legault *et al.*, 2003], l'acide ursolique (10) isolé des tiges du thé du Labrador (*Ledum groenlandicum*) [Dufour *et al.*, 2007], le *cis*-19-hydroxyabiéanol (11) isolé de l'écorce du mélèze laricin (*Larix laricina*) [Pichette *et al.*, 2006], le papyriferoside A (12), un diarylheptanoïde glycosylé, isolé des écorces internes du bouleau blanc (*Betula papyrifera*) [Mshvildadze *et al.*, 2007], le pinosylvin monométhyl éther (13) extrait du bois interne du pin rouge (*Pinus resinosa*) [Simard *et al.*, 2008] et le solicanolide (14) isolé des sommités florales de la verge d'or du

Canada (*Solidago canadensis*) [Bradette-Hébert *et al.*, 2008] exercent tous, à l'exception du sesquiterpène **8**, une activité cytotoxique de l'ordre du micromolaire (μM) vis-à-vis des cellules cancéreuses humaines du poumon et du côlon. Le β -caryophyllène (**8**) non-cytotoxique a, quant à lui, démontré une forte capacité à potentialiser l'action d'agents anti-tumoraux connus [Legault *et al.*, 2007].

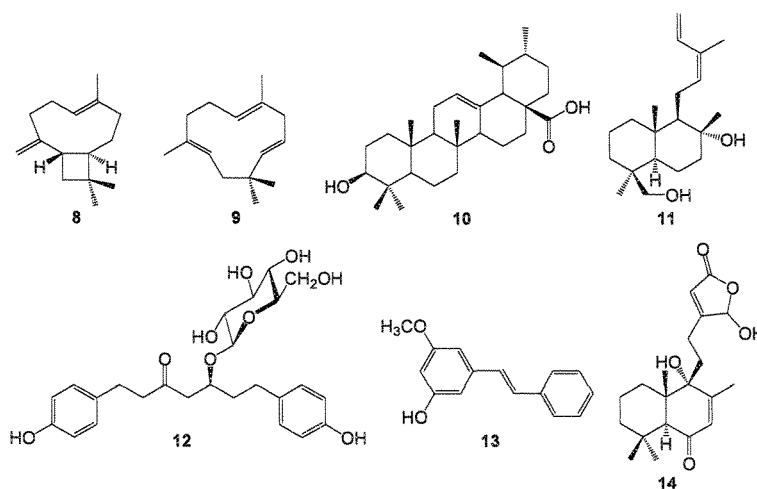
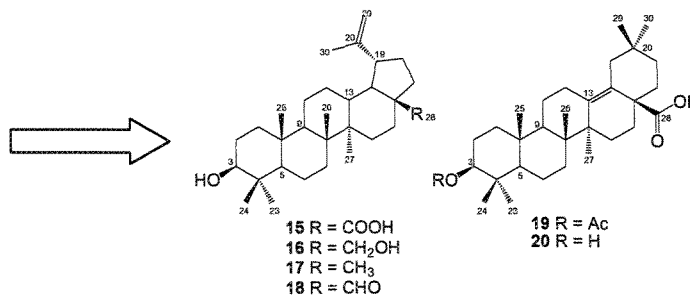


Figure 2. Structures de produits naturels anticancéreux (**8-14**) isolés de la forêt boréale

Dans le cadre de mon projet de thèse, nous nous sommes intéressés au potentiel anticancéreux contenu dans les écorces externes du bouleau blanc (bouleau à papier), arbre feuillu couramment rencontré dans la forêt boréale québécoise [Marie-Victorin, 2002] et largement utilisé par l'industrie forestière. Les écorces de bouleau de l'Amérique du Nord constituent la source naturelle la plus abondante sur Terre en composés triterpéniques de type lupane tels que l'acide bétulinique (**15**), le bétulinol (**16**), le lupéol (**17**) et l'aldéhyde bétulinique (**18**), et de type oléanane tels que l'acide 3-acétyloléanolique (**19**) et l'acide oléanolique (**20**) [Krasutsky, 2006]. Comme l'indique le tableau 2, le bétulinol (**16**) est de loin le triterpène le plus abondant de l'extrait au CH_2Cl_2 des écorces externes de *B. papyrifera* avec une teneur déterminée par GC/MS de 72,4% [Kolomitsyn *et al.*, 2007]. Il est intéressant de souligner que ces composés peuvent être extraits directement à partir des résidus des usines de sciage lesquels sont habituellement brûlés pour produire de l'énergie.

Tableau 2. Triterpènes majoritaires (15-20) isolés des écorces externes de *B. papyrifera*



Triterpènes extractibles ^a	Analyse par GC/MS (%)
Acide bétulinique (15)	5,4
Bétulinol (16)	72,4
Lupéol (17)	5,9
Aldéhyde bétulinique (18)	1,3
Acide 3-acétyloléanolique (19)	1,6
Acide oléanolique (20)	0,3

^a Extrait total au CH₂Cl₂.

Les agents chimiothérapeutiques utilisés actuellement en clinique agissent selon divers mécanismes comme par exemples en perturbant la division cellulaire (mitose) ou en causant des lésions à l'ADN nucléaire [da Rocha *et al.*, 2001]. Ainsi, l'un des problèmes inhérents associés au traitement par chimiothérapie réside dans la faible sélectivité des agents antitumoraux utilisés en clinique causant de sévères effets secondaires chez les patients (nausées, pertes de cheveux, affaiblissement du système immunitaire, etc.). Dans ce contexte, de récentes études ont montré que l'acide bétulinique (15) et ses dérivés sont capables d'inhiber sélectivement la croissance d'un large éventail de cellules cancéreuses humaines sans affecter les cellules normales [Zuco *et al.*, 2002; Kessler *et al.*, 2007]. L'activité antitumorale du

triterpène **15** a également été démontrée lors d'études *in vivo* sur des souris porteuses de tumeurs murines sans effets secondaires marqués chez les organes vitaux à des doses aussi élevées que 500 mg/kg de poids corporel [Pisha *et al.*, 1995; Zuco *et al.*, 2002]. Il est également intéressant de mentionner que le bevirimat (**21**, PA-457) (Figure 3), un analogue non-toxique de l'acide bétulinique (**15**) estérifié en C-3, sera bientôt utilisé chez l'humain en vue de traiter le VIH de type I selon un nouveau mode d'action dit inhibiteur de la maturation du virus [Salzwedel *et al.*, 2007].

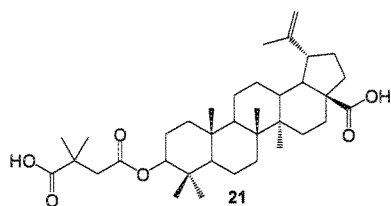


Figure 3. Structure du bevirimat (**21**), un inhibiteur de la maturation du VIH

Nonobstant leur potentiel pharmacologique prometteur [Cichewicz *et al.*, 2004; Eiznhamer *et al.*, 2004], le développement clinique des triterpènes de type lupane est entravé par leur très faible solubilité dans l'eau (0,02 µg/mL pour **15**) [Jäger *et al.*, 2007] et leur coefficient de partition élevé ($\log P > 6$) [Thibeault *et al.*, 2007]. Ceci complique la préparation de formulations administrables et diminue grandement leur biodisponibilité dans l'organisme lors d'études *in vivo* sur animaux [Udeani *et al.*, 1999]. Afin d'accroître l'hydrosolubilité de l'acide bétulinique (**15**) et ses dérivés et ainsi améliorer leurs propriétés pharmacocinétiques (ADME: absorption, distribution, métabolisation et élimination), certains groupes de recherche ont entrepris de greffer des sections polaires tels que des phthalates [Kvanisca *et al.*, 2005] et acides aminés [Jeong *et al.*, 1999; Saxena *et al.*, 2006] aux positions C-3 et/ou C-28 du squelette triterpénique. Pour notre part, nous nous sommes tournés vers la synthèse de saponines triterpéniques [Gauthier *et al.*, 2006a; Thibeault *et al.*, 2007], c'est-à-dire de triterpènes porteurs de sections sucres solubles dans l'eau. Les saponines sont une classe de produits naturels largement répandus dans la nature [Sparg *et al.*, 2004]. Plusieurs espèces végétales utilisées en médecine traditionnelle orientale pour traiter certaines pathologies, comme par exemple le cancer [Rao *et al.*, 2000] et les maladies liées à l'inflammation [Sparg *et al.*, 2004], sont riches en

saponines [Qin, 1998] lesquelles, à l'état pur, exercent des activités biologiques très variées (antitumorale, antibactérienne, hémolytique, etc.). Cependant, l'isolement de saponines à partir d'une matrice végétale constitue encore aujourd'hui un procédé long et fastidieux et seulement de petites quantités de produits sont obtenues sous une forme pure [Bruneton, 1995]. La synthèse chimique représente donc une alternative réaliste afin de préparer une grande quantité et variété de saponines pour des études biopharmaceutiques plus approfondies [Yu *et al.*, 2007].

Lors de mon projet de maîtrise, une première série de glycosides triterpéniques monodesmosidiques (porteurs d'une seule section osidique) d'acide bétulinique (**15**), de bétulinol (**16**) et de lupéol (**17**) ont été synthétisés et évalués *in vitro* afin de déterminer leur activité cytotoxique sur un large éventail de cellules cancéreuses humaines [Gauthier *et al.*, 2006a; Gauthier, 2006b]. Les relations de structure-activité ont montré que, entre autres choses, l'ajout d'une section α -L-rhamnopyranose en position C-3 augmentait de manière significative la cytotoxicité de l'acide bétulinique (**15**) en plus de lui conférer une sélectivité supérieure sur les cellules cancéreuses du poumon (A549) et du côlon (DLD-1) en comparaison avec les cellules saines du fibroblaste (WS1). Ces résultats prometteurs ont fait l'objet de deux publications dans *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [Gauthier *et al.*, 2006a; Thibeault *et al.*, 2007] et une demande de brevet a été déposée au Canada et aux États-Unis en vue de protéger le caractère innovant de cette recherche [Pichette *et al.*, 2008a].

Ainsi, le présent projet de doctorat représente la suite logique de mes travaux de maîtrise. Alors que le chapitre premier plaçait l'étude dans une problématique de recherche globale au niveau du cancer et des agents anticancéreux d'origine naturelle, le chapitre 2 dresse un portrait relativement complet de la littérature à propos de l'isolement et de la synthèse des saponines en général et plus spécifiquement des saponines triterpéniques à génine de type lupane. Le chapitre 2 est subdivisé en trois sections principales: 1) les saponines triterpéniques, 2) les triterpènes de type lupane, et 3) les saponines de type lupane. Il est bon de mentionner que les première et troisième parties de ce chapitre feront l'objet d'une

publication en tant que revue de littérature [Gauthier *et al.*, 2008a] et que, à notre connaissance, aucun travail de ce genre n'a été publié jusqu'à ce jour.

Le chapitre 3 représente une partie importante de cette thèse de doctorat. Les résultats présentés sous la forme d'un article publié dans le journal *Tetrahedron* [Gauthier *et al.*, 2008b] relatent d'une manière détaillée la première synthèse de deux saponines anticancéreuses à génine acide bétulinique (**15**) porteuses de sections α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranose ainsi que la synthèse de plusieurs analogues arabinosidés. Ces molécules naturelles sont retrouvées dans certaines plantes utilisées en médecine traditionnelle orientale telles que *Pulsatilla koreana* afin de combattre le cancer, la malaria et la dysentérie amébique.

Le chapitre 4, quant à lui, est rédigé sous la forme d'un article scientifique accepté pour publication à *Journal of Natural Products* [Gauthier *et al.*, 2008c]. Il décrit succinctement la synthèse d'une série de saponines bidesmosidiques, c'est-à-dire porteuses de deux sections osidiques, à génines acide bétulinique (**15**) et bétulinol (**16**) ainsi que les relations de structure-activité mises en évidence après l'évaluation de la cytotoxicité *in vitro* des composés cibles sur des cellules cancéreuses humaines en culture. Les résultats innovants de ce chapitre font l'objet d'une demande de brevet préliminaire en instance à l'international [Pichette *et al.*, 2008b].

Le chapitre 5 est rédigé sous la forme d'un article scientifique à soumettre prochainement à un journal spécialisé en chimie bioorganique. L'objectif principal de ce travail consistait à évaluer, *in vitro*, à la fois l'activité hémolytique et la cytotoxicité de plusieurs saponines monodesmosidiques et bidesmosidiques de type lupane afin d'être en mesure de cibler la molécule présentant la plus faible toxicité sur les globules rouges pour une évaluation *in vivo* ultérieure sur souris porteuses de tumeurs murines ou humaines. Certaines saponines de type oléanane reconnues pour leur fort pouvoir hémolytique précédemment isolées par le Dr Vakthang Mshvildadze et contenant des sections sucres similaires à la série lupane ont également été testées et les activités ont été comparées avec celles des saponines

synthétisées. De plus, lors de cette étude, un test à la calcéine-AM a été réalisé pour évaluer l'action perméabilisante des saponines de type lupane et oléanane sur la membrane des cellules cancéreuses de manière à obtenir une idée préliminaire de leur mécanisme d'action.

Les chapitres 6 et 7 présentent des travaux réalisés en partie par des étudiants au baccalauréat en chimie dans le cadre de stages d'été. Le chapitre 6 décrit les travaux de synthèse qui ont mené à la préparation de saponines d'acide bétulinique (**15**), de bétulinol (**16**) et de lupéol (**17**) contenant une section chacotriosidique. Lors de ce travail, cette section osidique particulière retrouvée à la position C-3 de la dioscine, une saponine stéroïdique au fort potentiel antitumoral, a été greffée pour la première fois sur le squelette lupane selon une approche par glycosylations successives. De plus, tous les composés ainsi que les dérivés de réarrangement de type germanicane ont été évalués *in vitro* pour leurs activités cytotoxique et hémolytique. Ce manuscrit sera soumis prochainement à *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*.

Le chapitre 7, quant à lui, décrit les résultats obtenus en vue de synthétiser des dérivés acyl glucuronides en position C-28 de l'acide bétulinique (**15**) pouvant servir en tant que prodrogues pour le traitement du cancer lors d'une stratégie PMT (*Prodrug MonoTherapy*). Cette stratégie consiste à activer sélectivement l'agent thérapeutique au niveau du tissu atteint par l'action d'enzymes. L'objectif principal de ces travaux consistait à élaborer une méthodologie de synthèse afin de préparer les métabolites glucuronidés du bevirimat (**21**, PA-457), un agent anti-VIH dérivé de l'acide bétulinique (**15**) sur le point d'être approuvé et mis en marché par la compagnie américaine Panacos Pharmaceuticals. Les résultats préliminaires de ce chapitre ont été soumis à *Tetrahedron Letters* [Gauthier *et al.*, 2008d].

Finalement, le chapitre 8, dernière partie de cette thèse, présente la discussion générale et les principales conclusions posées à l'issue de ce projet de doctorat dans le domaine de la synthèse des saponines anticancéreuses. Ce chapitre dresse également le portrait de quelques perspectives futures envisageables qui pourraient faire suite à ce projet de recherche.

CHAPITRE 2

REVUE DE LA LITTÉRATURE

2.1. LES SAPONINES TRITERPÉNIQUES

2.1.1. Généralités

Les saponines ou saponosides sont une classe spécifique de métabolites secondaires, produits naturels abondamment retrouvés dans le règne végétal [Sparg *et al.*, 2004]. Structuralement parlant, les saponines sont constituées d'un squelette stéroïdique ou triterpénique porteur d'une (monodesmoside) ou de plusieurs (bidesmoside, tridesmoside) sections sucres. La nature des sections osidiques retrouvées à l'intérieur des saponines est très variée, mais elles sont habituellement constituées de D-glucose, D-galactose, L-rhamnose, D-xylose, D-fucose et acide D-glucuronique [Bruneton, 1995]. Leur nom provient du latin *sapo* signifiant "savon" en raison de leurs propriétés à former des solutions moussantes en présence d'eau. La grande diversité structurale des saponines peut être expliquée par leurs origines biosynthétiques variées. En effet, à partir de l'oxydosqualène à 30 carbones, la biosynthèse des génines triterpéniques et stéroïdiques est effectuée selon diverses voies métaboliques suivie de l'assemblage des différentes sections osidiques par des enzymes telles que les glycosyltransférases et les glycosidases. Par la suite, des modifications subséquentes peuvent avoir lieu sur la saponine dont, entre autres, des oxydations, réarrangements, méthylations et estérifications [Vincken *et al.*, 2007] ce qui augmentent d'autant plus la possibilité de variations structurales à l'intérieur de cette classe de produits naturels. Depuis l'avènement de la RMN à haut champ permettant l'élucidation des structures chimiques complexes, des milliers de

saponines différentes ont été isolées et identifiées [Sahu *et al.*, 2001]. Il est estimé que près de la moitié des plantes terrestres pourraient contenir des saponines [Qin, 1998]. Plusieurs espèces de plantes largement utilisées en médecine traditionnelle orientale telles que le ginseng (*Panax ginseng*) et la réglisse (*Glycyrrhiza glabra*) contiennent des saponines, plus particulièrement de type triterpénique. Ceci a amené Liu *et al.* [2002] à stipuler que les activités biologiques observées en médecine traditionnelle orientale pourraient être exclusivement dues à la présence des saponines ainsi que des composés polyphénoliques.

2.1.2. Activités Biologiques

Reconnues pour avoir un fort potentiel pharmacologique, les saponines ont été intensivement étudiées au cours des dernières années. La communauté scientifique a démontré un intérêt marqué envers cette classe de métabolites secondaires afin d'accélérer le processus lié à leur développement biopharmaceutique [Francis *et al.*, 2002]. En effet, les saponines à génines stéroïdiques et triterpéniques exercent des activités biologiques très variées telles qu'hémolytique, hypocholestérolimique, immunostimulant, molluscicide, anti-inflammatoire, antifongique, antibactérienne, antiparasitaire, cytotoxique et antitumorale, pour ne nommer que celles-ci [Rao *et al.*, 2000; Francis *et al.*, 2002; Sparg *et al.*, 2004]. Bien que leurs fonctions à l'intérieur des plantes ne soient pas entièrement comprises, il a été démontré que les saponines jouent un rôle essentiel dans la protection des plantes contre les espèces pathogènes [Francis *et al.*, 2002]. Les sections suivantes (2.1.2.1 et 2.1.2.2) traiteront plus particulièrement des activités hémolytique, cytotoxique et antitumorale des saponines qui sont en lien avec le présent projet de thèse. Le lecteur désirant avoir des informations supplémentaires concernant les autres activités biologiques pourra consulter les références précédemment citées.

2.1.2.1. Activité Hémolytique

Depuis longtemps, les saponines sont reconnues pour leur capacité à induire la formation de pores au travers des membranes cellulaires et ainsi entraîner l'hémolyse

des globules rouges (érythrocytes) [Seeman *et al.*, 1973]. Cette propriété a amené la mise en place de tests hémolytiques permettant la détection des saponines dans les extraits de plantes [Sparg *et al.*, 2004]. Toutefois, la forte activité hémolytique de la plupart des saponines a freiné considérablement leur développement clinique en raison de leur toxicité potentiel lors de traitements donnés sous la forme d'injections intraveineuses. Le mécanisme exact par lequel les saponines entraînent la rupture de la membrane des érythrocytes n'est pas encore parfaitement établi [Francis *et al.*, 2002]. Certains auteurs ont posé l'hypothèse selon laquelle les saponines interagissent avec la couche lipidique des membranes cellulaires [Melzig *et al.*, 2001] pour former des complexes insolubles avec le cholestérol menant à la perméabilisation des cellules et à la perte subséquente de l'hémoglobine dans le milieu extracellulaire [Baumann *et al.*, 2000]. En revanche, une étude a mis en évidence un mécanisme différent dans lequel l'hémolyse des globules rouges serait causée par l'interaction des saponines avec l'aquaporine CHIP28 résultant en une augmentation du transport des molécules d'eau vers l'intérieur de la cellule [Winter, 1994]. De surcroît, une autre étude a démontré que l'activité lytique envers la membrane de liposomes causée par des saponines d'acide oléanolique (**20**) glycosylées aux positions C-3 et C-28 pouvait survenir en l'absence de cholestérol membranaire [Hu *et al.*, 1996].

2.1.2.2. Activités Cytotoxique et Antitumorale

Plusieurs saponines triterpéniques et stéroïdiques exercent des activités cytotoxiques avec des valeurs d'IC₅₀ variant entre 1 ng•mL⁻¹ à 20 µg•mL⁻¹ selon la nature de la saponine, de la partie osidique et des lignées cellulaires utilisées. De très bonnes revues de littérature ont d'ailleurs été publiées à ce sujet [Lacaille-Dubois, 2000; Rao *et al.*, 2000]. L'apoptose ou suicide cellulaire programmé semble être le mécanisme par lequel la majorité des saponines entraînent la mort des cellules cancéreuses. Plusieurs études récentes ont montré que l'apoptose cellulaire est enclenchée par l'action des saponines sur la membrane mitochondriale induisant l'expression de facteurs pro-apoptotiques [Haridas *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2005].

La saponine OSW-1 (**22**, Figure 4) ou 3 β ,16 β ,17 α -trihydroxycholest-5-en-22-one 16-O-[(2-O-(4-méthoxybenzoyl)- β -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-2-O-acétyl- α -L-arabinopyranoside], un cholestane acétylé isolé des bulbes de *Ornithogalum saundersiae*, est l'une des saponines stéroïdiques les plus cytotoxiques connues jusqu'à ce jour avec une valeur d'IC₅₀ inférieure à 1 nM surpassant l'activité des agents anticancéreux utilisés en clinique. Des études *in vitro* ont montré qu'OSW-1 (**22**) inhibe très fortement la croissance d'un large éventail de cellules cancéreuses tout en exerçant qu'une très faible toxicité envers les cellules saines [Deng *et al.*, 1999]. Motivés par le potentiel anticancéreux prometteur de cette saponine, différents groupes de recherche ont effectué la synthèse totale d'OSW-1 (**22**) durant la dernière décennie [Deng *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2005; Xue *et al.*, 2008]. Des études de structure-activité ont également été entreprises soit par modifications de la génine stéroïdique [Matsuya *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2004] ou de la partie osidique [Tang *et al.*, 2007; Wojtkielewicz *et al.*, 2007] afin de trouver des dérivés encore plus cytotoxiques. Ainsi, le groupe du professeur Biao Yu a complété la synthèse de plusieurs dérivés oxygénés dont la saponine **23** (Figure 4) présentant un profil de cytotoxicité jusqu'à 25 fois supérieur à OSW-1 sur certaines lignées cancéreuses [Shi *et al.*, 2004].

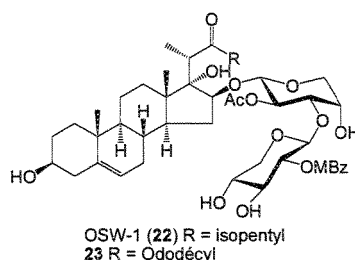


Figure 4. Structure d'OSW-1 (**22**) et d'un dérivé oxygéné (**23**)

Une autre saponine stéroïdique, la dioscine (**24**, Figure 5), a attiré l'attention des chercheurs dans le domaine de la synthèse de glycosides. Cette saponine isolée d'un grand nombre de légumes et plantes de la médecine traditionnelle orientale exerce un vaste spectre d'activités biologiques (antitumorale, antivirale, antifongique et anti-inflammatoire) [Yu *et al.*, 2002]. Différentes synthèses totales et semi-synthèses de la dioscine (**24**) ont également été entreprises [Deng *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2002; Zou

et al., 2003]; celles-ci seront discutées plus loin dans le texte (section 2.1.4.1.2.). La structure de la section osidique (chacotriose) de cette saponine est très particulière. Elle consiste en une section D-glucose substituée aux positions O-2' et O-4' par des sucres de type L-rhamnose. Une étude du groupe de Biao Yu a mis en évidence que les fonctions hydroxyles aux positions 6 et 8 du L-rhamnose en H-4' représentent les groupements polaires clés responsables de l'activité antitumorale de la dioscine (**24**) [Li *et al.*, 2003]. À la lumière de ces résultats, ce groupe a préparé trois dérivés fluorescents de la dioscine (**24**) exerçant trois niveaux différents de cytotoxicité (non actif, peu actif, et actif) [Wang *et al.*, 2007]. Le potentiel cytotoxique de ces dérivés s'est révélé être en lien direct avec leur capacité à diffuser à l'intérieur des cellules cancéreuses. En effet, la présence de composés actifs a été détectée dans des organelles acides spécifiques du cytoplasme cellulaire tandis que pour le dérivé inactif aucune fluorescence n'a été mesurée. Il est très intéressant de noter qu'aucune interaction prolongée avec la membrane lipidique n'a été montrée lors de cette étude. Ces résultats laissent donc présager une diffusion rapide des dérivés à l'intérieur du cytoplasme par l'entremise de canaux protéiques [Wang *et al.*, 2007].

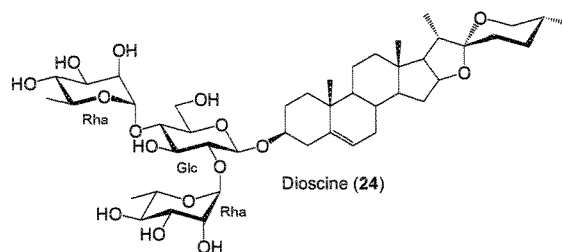


Figure 5. Structure de la dioscine (**24**), une saponine de la médecine traditionnelle orientale

2.1.3. Isolement de Saponines

Tel que mentionné précédemment, les saponines ne peuvent être isolées d'une matrice végétale en une seule étape sauf pour de rares exceptions. Étant donné qu'elles se retrouvent sous la forme de mélanges complexes, plusieurs séparations sur différents supports solides doivent être effectuées pour parvenir au résultat escompté [Sahu *et al.*, 2001]. De plus, la forte polarité, la relative fragilité et les

différences structurales mineures entre des composés de masse moléculaire élevée ($>1000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) font qu'il est souvent long et difficile d'obtenir une saponine pure et homogène. Aussi, ces molécules cristallisent très mal en raison de leurs propriétés hygroscopiques et, par le fait même, ne donnent que très rarement des points de fusion nets et sans décomposition [Bruneton, 1995].

À première vue, étant donné la bonne solubilité de la plupart des saponines dans l'eau [Walthelm *et al.*, 2001], il serait juste de penser qu'une macération ou un chauffage à reflux à l'aide de ce solvant polaire permettra leur extraction. Cependant, la lyophilisation subséquente de l'extrait peut entraîner l'hydrolyse des bidesmosides. Par conséquent, l'extraction des saponines se fait habituellement à l'aide d'alcools comme le méthanol ou l'éthanol à différentes concentrations dans l'eau. En se référant à de nombreuses publications récentes en ce qui a trait à l'isolement de ces molécules [Koike *et al.*, 1999; Plasman *et al.*, 2000; Ye *et al.*, 2000; Gaidi *et al.*, 2001; Elbandy *et al.*, 2002; Zou *et al.*, 2003], une méthode d'isolement standard peut être établie en suivant la démarche expérimentale ci-dessous. Toutefois, cette méthode se veut générale et non universelle, étant donné les difficultés qui peuvent être rencontrées dans l'isolement des saponines pour un type de plante en particulier. Voici les principales étapes à suivre (voir l'annexe 1 pour l'organigramme):

1. Sécher à l'azote liquide la matrice végétale et la broyer finement.
2. Extraire à reflux ou par macération à température ambiante avec MeOH.
3. Concentrer l'extrait sous pression réduite.
4. Suspender l'extrait dans l'eau distillée.
5. Extraire successivement avec EtOAc et *n*-BuOH en séparant les deux phases.

À ce point, la fraction aqueuse et la fraction soluble dans le *n*-BuOH contiennent la majeure partie des saponines. Cependant, certaines saponines moins polaires peuvent se retrouver dans la fraction EtOAc.

6. Charger la fraction soluble dans le *n*-BuOH sur une colonne de Diaion[®] HP-20 et éluer avec 30, 50, 70 et 100% MeOH_(aq).
7. Combiner les fractions éluées avec 70% MeOH_(aq) possédant les mêmes motifs sur TLC.
8. Charger la fraction sur une colonne contenant du gel de SiO₂ et éluer avec CHCl₃/MeOH/H₂O selon différents ratios, comme par exemple 8:5:1.
9. Effectuer la séparation finale des saponines par HPLC-préparative munie d'une colonne C₁₈ en phase inverse éluee avec un gradient linéaire H₂O/MeOH.
10. Évaporer les solvants sous pression réduite et caractériser la saponine.

Les techniques modernes de RMN à haut champ (à partir de 300 MHz) peuvent être utilisées pour élucider la structure des saponines (¹H, ¹³C, COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, HMBC, etc.) [Agrawal *et al.*, 1985; Agrawal *et al.*, 1992; Agrawal *et al.*, 1996]. De plus, une hydrolyse acide ultérieure confirmera la nature de la génine et des sucres présents dans la partie osidique [Sahu *et al.*, 2001].

2.1.4. Synthèse de Saponines

Dans cette section, il sera question des méthodologies de synthèse organique permettant la préparation de saponines monodesmosidiques (section 2.1.4.1.) et bidesmosidiques (section 2.1.4.2.). Un accent particulier sera porté sur la synthèse de saponines à génines triterpéniques contenant des sections arabinose (section 2.1.4.1.1.) et chactriose (section 2.1.4.1.2.). Aussi, des exemples précis agrémentés de schémas réactionnels détaillés seront décrits en lien avec la synthèse totale de saponines naturelles à haut potentiel pharmacologique.

2.1.4.1. Synthèse de Monodesmosides

Dès le début des années 1980, la communauté scientifique a montré un intérêt marqué envers la synthèse de saponines monodesmosidiques. À cette époque, les

méthodes de synthèse utilisées impliquaient pour la plupart des sucres peracétylés et activés en position anomérique par des halogènes tels que le brome [Atopkina *et al.*, 1988; Saito *et al.*, 1991] et le fluor [Pikul *et al.*, 1997]. Cette méthode de glycosylation dite de Koenigs-Knorr nommée ainsi en l'honneur de ses inventeurs [Koenigs *et al.*, 1901] fait intervenir des quantités stoechiométriques de sels d'argent dispendieux comme promoteurs de la réaction (Ag_2O , AgOTf , etc.) et ne donnent que rarement des rendements élevés en produits glycosylés.

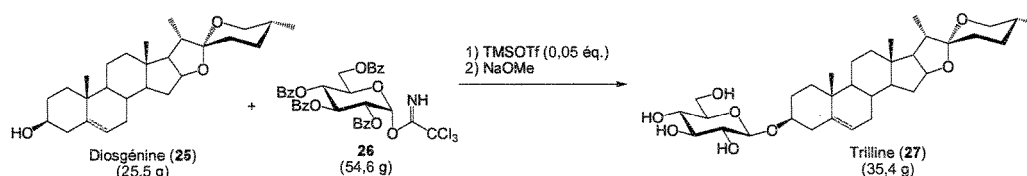


Figure 6. Synthèse pratique de la trilline (27)

Vers la fin des années 1990, un groupe de chercheurs chinois dirigé par le Dr. Biao Yu publia un article dans le *Journal of Organic Chemistry* relatant la glycosylation à hauts rendements de génines triterpéniques et stéroïdiques [Deng *et al.*, 1999]. Ces travaux ont montré que l'utilisation de sucres perbenzoylés activés par la fonction trichloroacétimide selon la méthode de Schmidt [1994] permettait l'obtention de produits glycosylés dans des rendements quasi-quantitatifs lorsque la réaction se déroulait en présence du promoteur trifluorométhanesulfonate de triméthylsilyle (TMSOTf). Ainsi, 35,4 g de trilline (27), une saponine stéroïdique bioactive, ont pu être préparés quantitativement par la glycosylation de la diosgénine (25) avec le 2,3,4,6-tétra-*O*-benzoyl- α -D-glucopyranosyl trichloroacétimide (26) suivie de la déprotection subséquente des benzoyles en milieu basique (Figure 6). Les auteurs stipulent que deux facteurs sont essentiels au bon déroulement de la réaction: les groupements protecteurs benzoyles et le TMSOTf. L'utilisation de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ comme promoteur engendre généralement un mélange de produits complexes. Depuis la publication de cet article, l'emploi des sucres perbenzoylés activés par les trichloroacétimides est devenu monnaie courante dans le domaine de la synthèse des saponines et de leurs analogues [Wang *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2007].

2.1.4.1.1. Synthèse d'Arabinosides

L' α -hédérine (**28**), nommée hédéragénine 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside, aussi connue sous le nom de kalopanaxsaponine A ou sapindoside A, est une saponine à génine triterpénique reconnue en tant que composé actif de plusieurs espèces de plantes [Mshvildadze *et al.*, 2001; Barthomeuf *et al.*, 2002; Rooney *et al.*, 2005]. Des études *in vivo* ont montré que l' α -hédérine (**28**) peut augmenter significativement l'espérance de vie de souris porteuses de tumeurs de différentes natures (leucémie, poumon et côlon) [Muthu Kumara *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2001; Bang *et al.*, 2005]. La section α -L-Rhap(1 \rightarrow 2)- α -L-Arap en position C-3 est reconnue comme étant la section responsable de l'activité anticancéreuse de l' α -hédérine (**28**) et autres saponines monodesmosidiques à génine de type oléanane [Lee *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2001; Barthomeuf *et al.*, 2002; Bang *et al.*, 2005]. Une activité antimutagène *in vitro* de la saponine **28** a également été démontrée envers l'aflatoxine B₁ (AFB₁), la doxorubicine et le carbendazime [Lee *et al.*, 2000; Villani *et al.*, 2001]. De plus, l' α -hédérine (**28**) possède une très forte activité hémolytique (HD₅₀ 20 μ g/mL) supérieure au mélange de saponines vendu comme standard par la compagnie Sigma-Aldrich® [Chwalek *et al.*, 2006].

La synthèse de l' α -hédérine (**28**) a été entreprise par un groupe de chercheurs français de l'Université de Reims. Ceux-ci ont opté pour une méthode de synthèse convergente, c'est-à-dire qu'ils ont préparé préalablement la section disaccharidique suivi de son couplage avec un dérivé protégé de l'hédéragénine [Plé *et al.*, 2004]. Ainsi, tel que schématisé à la figure 7, le L-arabinose (**29**) commercial a été transformé en 4-méthoxybenzyl α -L-arabinopyranoside (**30**) selon une procédure de synthèse en quatre étapes dans un rendement de 51%. Le dérivé **31** a ensuite été obtenu à partir de **30** par la protection sélective des fonctions hydroxyles en positions 3 et 4, l'allylation de la position 2, la déprotection de l'isopropylidène (73%, trois étapes), la benzylation des positions 3 et 4 (87%) et, finalement, la désallylation de la position 2 (68%). Le couplage du trichloroacétimidate **32** avec la fonction hydroxyle libre de l'accepteur **31** en présence de TMSOTf a permis l'obtention du

disaccharide protégé **33** dans un excellent rendement de 95%. Par la suite, le trichloroacétimide cible (**34**) a été préparé par la déprotection du groupement MPM et l'activation subséquente de la position anomérique à l'aide de CCl_3CN et DBU (81%, deux étapes).

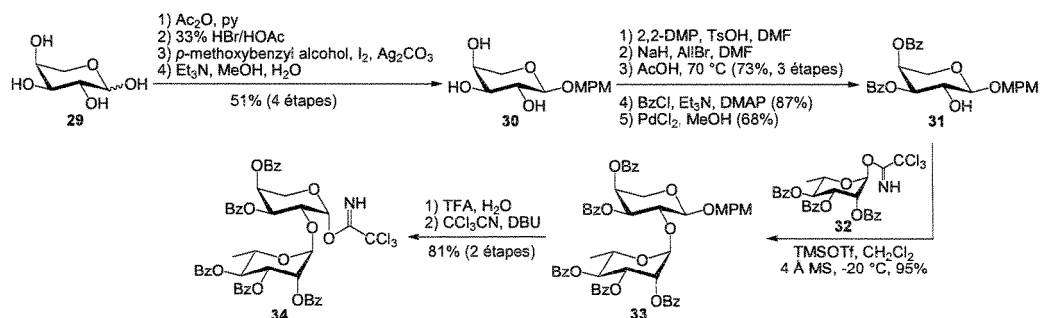


Figure 7. Synthèse du 2,3,4-tri-*O*-benzoyl- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-3,4-di-*O*-benzoyl- α -L-arabinopyranosyl trichloroacétimide (**34**)

Pour le couplage du trichloroacétimide **34** avec le dérivé hédéragénine protégé **35**, deux méthodes ont été utilisées (Figure 8). La première méthode (**A**) se déroulant dans le CH_2Cl_2 avec TMSOTf comme promoteur de la réaction a résultée en un mélange de glycosides bêta (**36**, 81%) et alpha (**37**, 8%). Ce résultat était prévisible en raison de la présence de la section rhamnose en position 2' de l'arabinose qui ne permet pas l'effet du groupement participant [Kim *et al.*, 2005]. Les auteurs ont donc utilisé le propionitrile (méthode **B**), un solvant reconnu pour promouvoir la formation de β -glycosides en l'absence de groupements participants [Schmidt *et al.*, 1990]. Ainsi, dans ces conditions expérimentales, l'anomère alpha (**37**) a été isolé majoritairement (72%). La déprotection subséquente des groupements protecteurs du dérivé **37** a finalement permis d'obtenir l' α -hédérine (**28**) dans un rendement de 91% en deux étapes. En utilisant une méthode convergente similaire, le même groupe de recherche a réalisé la synthèse de plusieurs analogues de l' α -hédérine (**28**) [Plé *et al.*, 2005].

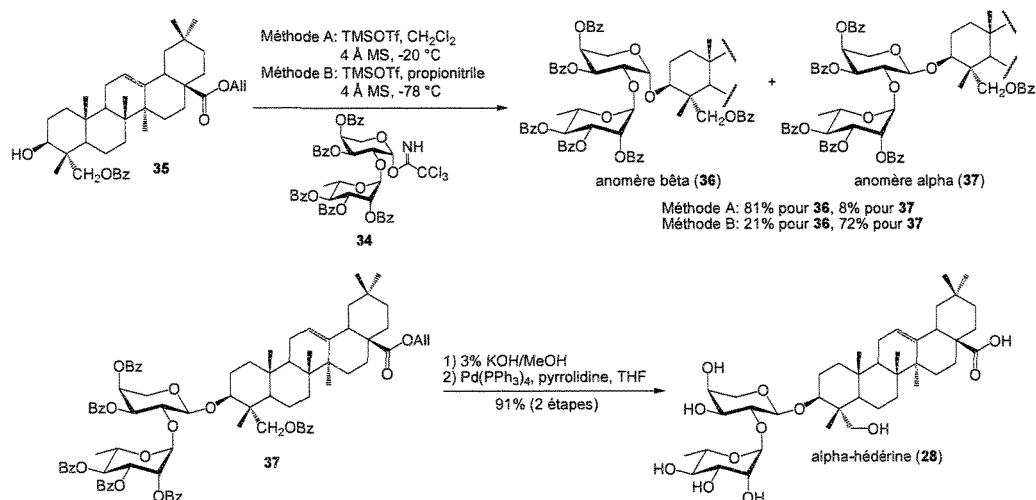


Figure 8. Synthèse de l' α -hédérine (28) selon une approche convergente

Un article publié en 2006 dans le journal *Carbohydrate Research* [Cheng *et al.*, 2006] décrit la synthèse de la β -hédérine (38), une saponine à génine acide oléanolique (20) contenant une section α -L-Rhap(1 \rightarrow 2)- α -L-Arap en C-3, qui exerce une activité anticancéreuse *in vitro* supérieure à l' α -hédérine (28) [Barthomeuf *et al.*, 2002]. Pour ce faire, les chercheurs ont utilisé une méthode linéaire dite par glycosylations successives (Figure 9). L'acide oléanolique C-28 benzylé (39) a été couplé avec le 2,3,4-tri-*O*-benzoyl- β -L-arabinopyranosyl trichloroacétimidate (40) en présence de TMSOTf pour donner l'arabinoside 41 (94%) qui a été subséquentement déprotégé (42, 97%). La protection des groupements hydroxyles en positions 3' et 4' du dérivé 42 suivie de la glycosylation avec le TCA 32 à basse température (-78°C) avec $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ comme promoteur a résulté en la formation de la saponine protégée diglycosidique 44 (79%). Finalement, le clivage des groupements isopropylidène (98%), benzyle et benzoyles (86%, deux étapes) a mené à la formation de la β -hédérine (38) avec la configuration anomérique 1,2-*trans* désirée.

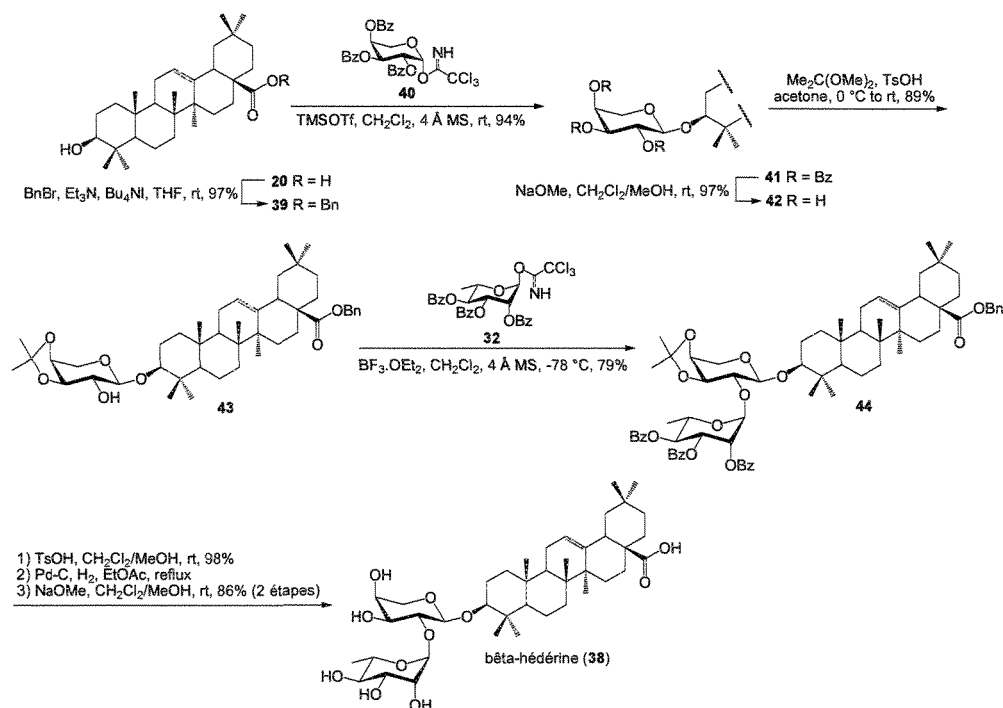


Figure 9. Synthèse de la β -hédérine (38) selon une approche linéaire

À partir du dérivé totalement protégé 44, ce même groupe de recherche a entrepris la synthèse de l'hédéracolchiside A₁ (45) (Figure 10). L'unique différence structurale entre 45 et la β -hédérine (38) consiste en la présence d'une section D-glucose en position 4' de l'arabinose. L'hédéracolchiside A₁ (45) est reconnu pour sa forte activité anticancéreuse [Barthomeuf *et al.*, 2002; Gerkens *et al.*, 2007] en lien avec sa capacité à former des pores dans les membranes cellulaires [Debiton *et al.*, 2004; Mazzucchelli *et al.*, 2008]. La synthèse a donc débuté par le clivage de l'isopropylidène de la molécule 44 à l'aide de TsOH pour fournir 46 (98%). Ensuite, une série de protections-déprotections successives a mené à la formation de l'accepteur 47 dans un rendement global de 66% en quatre étapes. La glycosylation de 47 avec le TCA 26 en présence de TMSOTf a permis la formation de la saponine protégée trisaccharidique 48 (71%). Il est à noter qu'un large excès de TMSOTf (2,5 éq.) a dû être employé à cette étape afin d'obtenir un rendement satisfaisant. L'hédéracolchiside A₁ (45) a finalement été synthétisé par la déprotection des groupements benzyle et benzoyles de la molécule 48 (70%, deux étapes). Au

moment d'écrire ces lignes, ces mêmes chercheurs publiaient une amélioration de leur synthèse de la saponine naturelle **45** impliquant la glycosylation directe du dérivé **46** [Yan *et al.*, 2008].

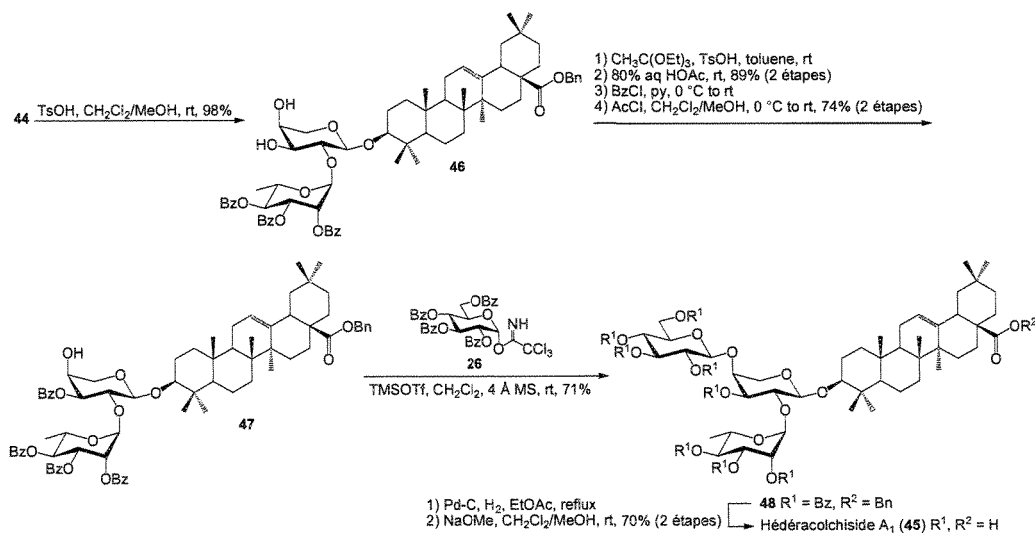


Figure 10. Synthèse de l'hédéracolchiside A₁ (**45**)

Récemment, un groupe de recherche a émis l'hypothèse selon laquelle la section α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)-[β -D-glucopyranosyl-(1→4)]- α -L-arabinopyranoside à la position C-3 d'une génine triterpénique telle que l'acide oléanolique (**20**) pourrait accroître son activité anticancéreuse et sa biodisponibilité *in vivo* [Bang *et al.*, 2007]. De plus, les auteurs stipulent que cette section trisaccharidique particulière pourrait être utilisée afin d'augmenter l'activité et la solubilité de différents agents antitumoraux connus. Bang et ses collaborateurs ont donc effectué la synthèse de cet oligosaccharide au départ de l'allyle β -L-arabinopyranoside (**49**) tel qu'illustré à la figure 11. Ainsi, le traitement de **49** avec 2,2-DMP et TsOH a permis l'obtention du dérivé **50** dans un rendement quantitatif. L'accepteur **50** a été mis en présence du TCA donneur **32** et la réaction de glycosylation catalysée par TMSOTf a généré le disaccharide protégé **51** (63%). Ensuite, le dérivé **52** a été préparé dans un rendement global de 48% (cinq étapes) par la déprotection de l'isopropylidène suivie d'une série de protections-déprotections similaire à la synthèse de l'hédéracolchiside A₁ (**45**). Le

couplage de **52** avec le TCA **26** dans des conditions usuelles de glycosylation a généré le dérivé **53** pleinement protégé. Étonnamment, bien que les auteurs mentionnent que la synthèse du TCA **54** soit possible, la préparation de cette molécule n'est pas décrite dans l'article. Ce dérivé (**54**) pourrait ensuite servir comme sucre donneur pour le couplage avec diverses molécules hydroxylées (HO-DRUG) afin de bonifier leur hydrosolubilité et activité biologique.

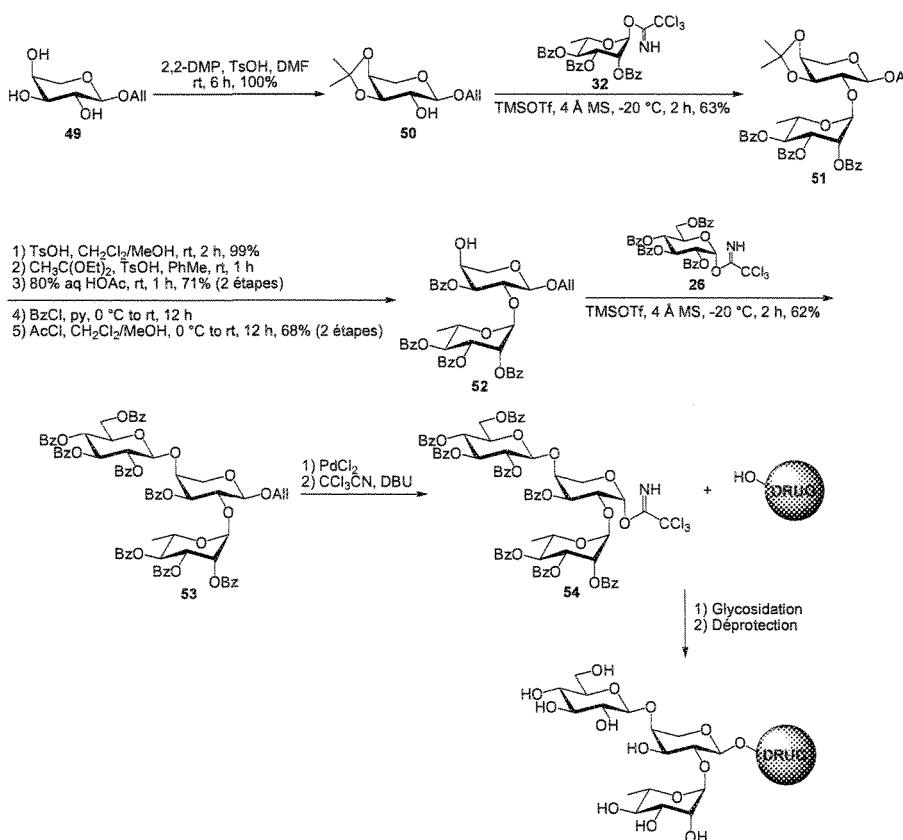


Figure 11. Synthèse de la section α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)-[β -D-glucopyranosyl-(1→4)]- α -L-arabinopyranoside (**54**)

2.1.4.1.2. Synthèse de Chacotriosides

Tel que mentionné à la section 2.1.2.2., la dioscine (**24**), une saponine stéroïdique bioactive, contient une portion trisaccharidique particulière à la position C-3 nommée chacotriose. La première synthèse de la dioscine (**24**) a été rapportée en 1999 par le

groupe de Biao Yu [Deng *et al.*, 1999a]. Celle-ci consiste tout d'abord au couplage de la diosgénine (**55**) avec l'éthyl 2,3-di-*O*-benzoyl-4,6-*O*-benzylidène-1-thio-β-D-glucopyranoside (**56**) en présence de NIS et AgOTf comme promoteurs de la réaction pour donner le glycoside **57** (50%) (Figure 12). Les fonctions benzoyles de ce dernier ont ensuite été hydrolysées et l'hydroxyle équatoriale en position C-3' a été converti régioselectivement en pivaloyle (Piv). Le couplage de **58** avec le TCA acétylé **59** à l'aide de BF₃•OEt₂ a permis l'obtention dans un rendement quantitatif du glycoside disaccharidique **60**. Cette molécule a ensuite été traitée avec TsOH afin de cliver le groupement 4,6-benzilidène puis l'hydroxyle primaire en C-6' a été benzoylée pour donner **61** (60%, deux étapes). Le couplage de **61** avec le TCA **59** a généré le chacotrioside pleinement protégé **62** (89%) et, finalement, l'hydrolyse avec NaOH a permis la préparation de la dioscine **24** (100%).

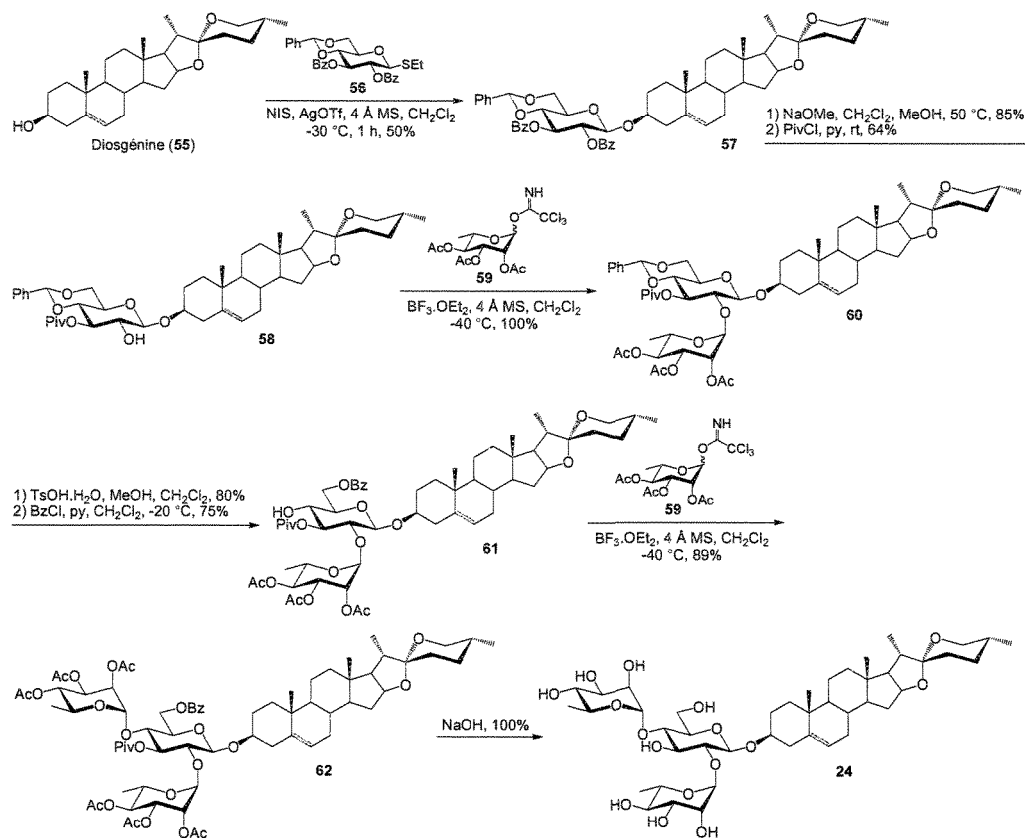


Figure 12. Première synthèse de la dioscine (**24**) selon une approche linéaire

Quelques années plus tard, le groupe de Biao Yu a mis au point une nouvelle classe de sucres activés: les trifluorophénylacétimidates (TFA) [Yu *et al.*, 2001b]. L'utilité des sucres donneurs TFA dans une réaction de glycosylation a été montrée lors de la seconde synthèse de la dioscine (**24**) publiée par ce groupe selon une approche linéaire [Yu *et al.*, 2002]. Ainsi, tel que schématisé à la figure 13, la diosgénine (**55**) a été couplée avec le TFA **63** en présence de TMSOTf pour donner **64** (92%). La déprotection de **64** suivi de la pivaloylation régiosélective [Jiang *et al.*, 1998] des groupements hydroxyyles en C-3' et C-6' a fourni **65** (60%, deux étapes). Ce dernier a ensuite été glycosylé simultanément aux positions C-2' et C-4' avec le TFA **66** (66%). La déprotection des groupements pivaloyles et acétyles sur la molécule **67** a permis l'obtention de la dioscine (**24**) en seulement cinq étapes de synthèse.

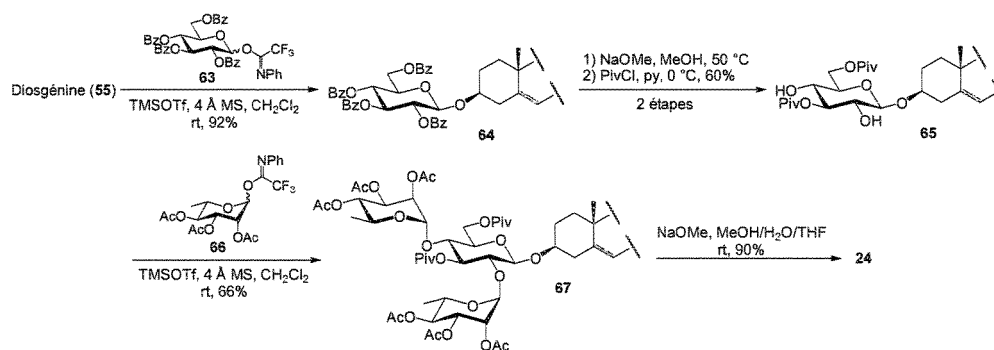


Figure 13. Seconde synthèse de la dioscine (**24**) selon une approche linéaire

Dernièrement, l' α -dioscine (**68**), un analogue de la dioscine (**24**) possédant une liaison glycosidique non-naturelle 1,2-*cis*, a été préparée afin d'évaluer son activité anticancéreuse *in vitro* [Miyashita *et al.*, 2007; Miyashita *et al.*, 2008]. Pour ce faire, les chercheurs ont élaboré une approche de synthèse convergente (Figure 14) dans laquelle la section chacotriose est préalablement synthétisée avant le couplage avec la diosgénine (**55**). Ainsi, le D-glucose (**69**) a été mis en présence de l'enzyme β -glucosidase et de l'alcool allylique afin de générer l'allyle β -D-glucopyranoside (**70**, 45%). Ce dernier a été pivaloylé régiosélectivement pour donner **71** (69%) qui a été glycosylé simultanément aux positions C-2' et C-4' avec le TCA **59** en présence de $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ selon la méthode inverse de Schmidt *et al.* [1991]. La déprotection de l'allyle sur la molécule **72** a donné le dérivé **73** qui a été subséquentment activé en

TCA (74). À ce stade, les chercheurs ont tenté le couplage du TCA 74 avec la diosgénine (55) en utilisant le $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ comme promoteur. Après la déprotection, deux saponines ont été isolées du milieu réactionnel dans un ratio α/β de 1:0,44 soit la dioscine (24) et l' α -dioscine (68). Il est intéressant de souligner que les tests de cytotoxicité préliminaires ont montré que la liaison glycosidique 1,2-*trans* est nécessaire afin de préserver l'activité anticancéreuse de la dioscine (24).

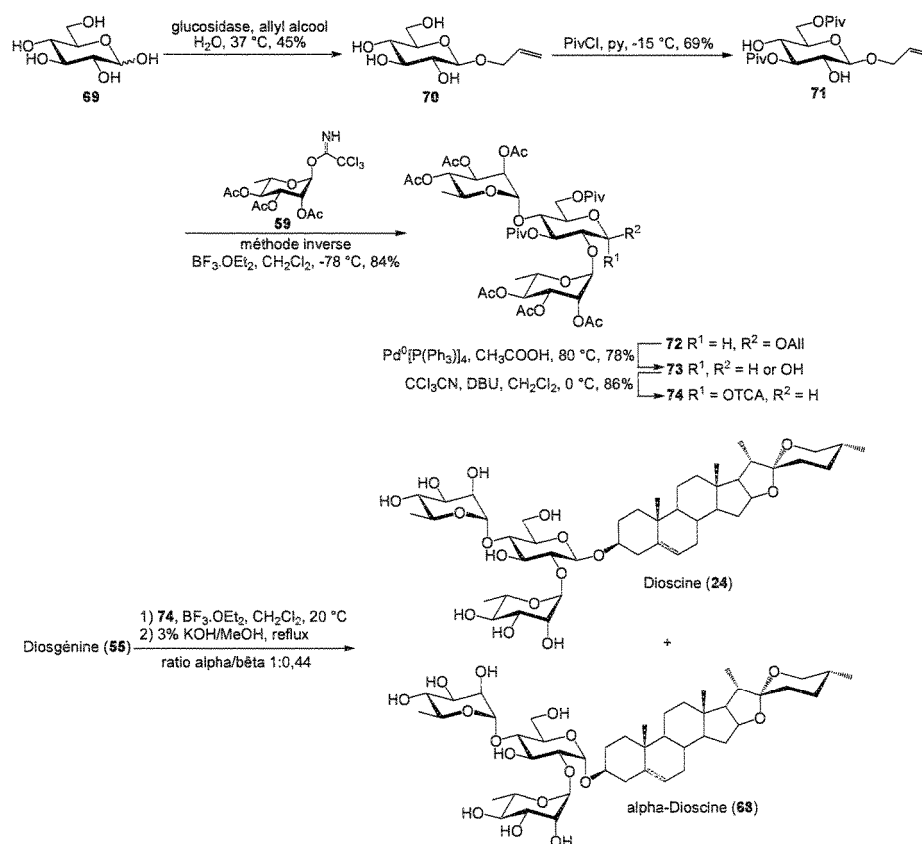


Figure 14. Synthèse de la dioscine (24) selon une approche convergente

2.1.4.2. Synthèse de Bidesmosides

Les bidesmosides, saponines contenant deux sections osidiques, sont reconnus pour exercer une activité hémolytique plus faible que les monodesmosides correspondants ce qui les rend très attrayants d'un point de vue pharmacologique [Voutquenne *et al.*, 2002]. La première synthèse d'une saponine bidesmosidique à génine triterpénique (**75**, Figure 15) a été rapportée par Yu et ses collaborateurs à la fin des années 90 dans le *Journal of the American Chemical Society* [Yu *et al.*, 1999]. Toutefois, l'osladine, un bidesmoside à génine stéroïdique [Yamada *et al.*, 1995] et certains bidesmosides de type lupane (voir section 2.3.2.) ont été synthétisés bien avant cette date par des groupes japonais et russes, respectivement. La synthèse du bidesmoside **75** a débuté par la glycosylation à basse température du 28-trityl oléanolate (**76**) avec le TCA **40**. Après 20 minutes de réaction, le groupement trityle a été clivé par une simple élévation de la température du milieu réactionnel pour générer *in situ* le monodesmoside **77**. La fonction acide carboxylique de ce dernier (**77**) a réagi avec le TCA **78** sans ajout supplémentaire de promoteur pour fournir le bidesmoside **79**. Dans un deuxième milieu réactionnel, les sucres activés **59** et **80** ont été mis en présence de TMSOTf afin de produire le disaccharide **81**. Par la suite, le groupement trityle du bidesmoside **79** a immédiatement réagi pour former **82** après l'ajout simultané de **81** et des acides de Lewis TMSOTf (1,5 éq.) et NIS (3,0 éq.). Les groupements protecteurs acétyles et benzoyles de la molécule isolée **82** ont ensuite été hydrolysés et la saponine bidesmosidique **75** a été obtenue dans un rendement global de 45% après seulement deux purifications par chromatographie sur colonne de gel de silice. L'avantage certain de cette méthodologie réside dans l'approche par glycosylations successives et l'utilisation de deux milieux réactionnels permettant la formation *in situ* des produits glycosylés minimisant ainsi le nombre d'étapes de purification.

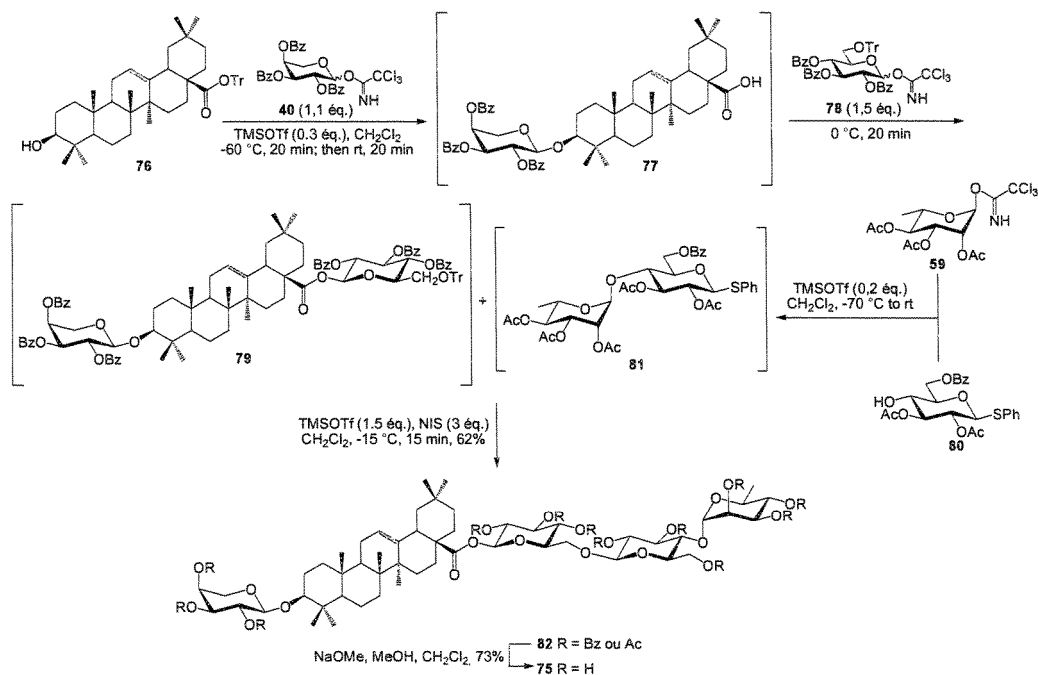


Figure 15. Synth\u00e8se d'une saponine bidesmosidique (**75**) par glycosylations successives

2.1.4.2.1. Synth\u00e8se d'Arabinosides Naturels

Deux bidesmosides (**83** et **84**, Figure 16) contenant une section arabinose directement branch\u00e9e \u00e0 la position C-3 ont \u00e9t\u00e9 synth\u00e9tis\u00e9s par un groupe de chercheurs chinois [Wang *et al.*, 2005]. Ces mol\u00e9cules isol\u00e9es des plantes m\u00e9dicinales *Fagonia indica* et *F. arabica* poss\u00e8dent une g\u00e9nine de type acide ursolique (**10**) qui est reconnue pour ses propri\u00e9t\u00e9s anticanc\u00e9reuse et anti-inflammatoire [Dufour *et al.*, 2007].

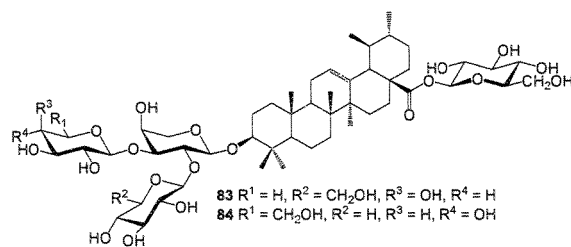


Figure 16. Saponines bidesmosidiques (**83** et **84**) \u00e0 g\u00e9nine de type acide ursolique

La synthèse de la saponine **84** (Figure 17) a commencé par la réaction de glycosylation par catalyse en phase hétérogène [Bliard *et al.*, 1994] de l'acide ursolique (**10**) avec le sucre donneur bromé **85**. L'ester-glycoside **86** ainsi obtenu (99%) a été mis en contact avec le disaccharide TCA **87** et le TMSOTf pour générer **88** (91%). Le traitement de **88** avec un mélange hydrazine/acide acétique a permis la déprotection du groupement levuniloyl (Lev). Finalement, le bidesmoside naturel **84** a été obtenu dans un rendement de 98% (deux étapes) après la glycosylation de la fonction hydroxyle libre du bidesmoside **89** avec le TCA **90** suivie de l'hydrolyse des groupements protecteurs.

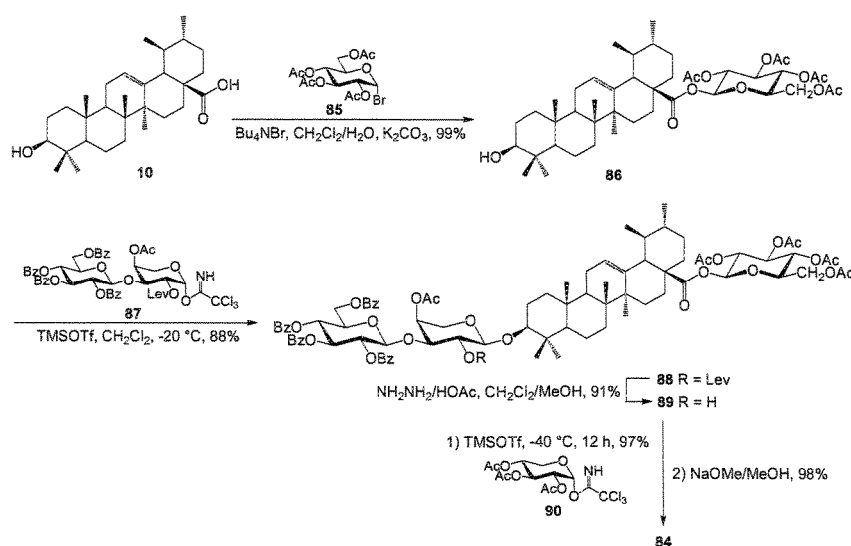


Figure 17. Synthèse d'une saponine bidesmosidique (**84**) à génine acide ursolique

2.1.4.2.2. Synthèse par Glycorandomisation

La glycorandomisation est une approche de synthèse qui consiste à utiliser une banque de sucres activés afin de créer de façon aléatoire une grande diversité de glycosides d'une molécule à intérêt pharmacologique [Yu *et al.*, 2001a]. Dernièrement, cette approche a été appliquée pour la préparation de saponines bidesmosidiques de la kryptogénine (**91**, Figure 18), un stéroïde mimétique du cholestérol utilisé dans la recherche sur le métabolisme des acides biliaires [Liu *et al.*, 2007]. La méthodologie est relativement simple. L'aglycone **91** a été mis en

contact avec les sucres donneurs TCA **26** et **92** dans des proportions équivalentes. À la suite de la déprotection, quatre glycosides bidesmosidiques (**93-96**) ont été formés et isolés par HPLC munie d'une colonne préparative. En appliquant cette approche avec d'autres sucres activés, les chercheurs ont pu obtenir une banque de plus de 15 saponines bidesmosidiques qu'ils ont testées pour leur activité anticancéreuse *in vitro*.

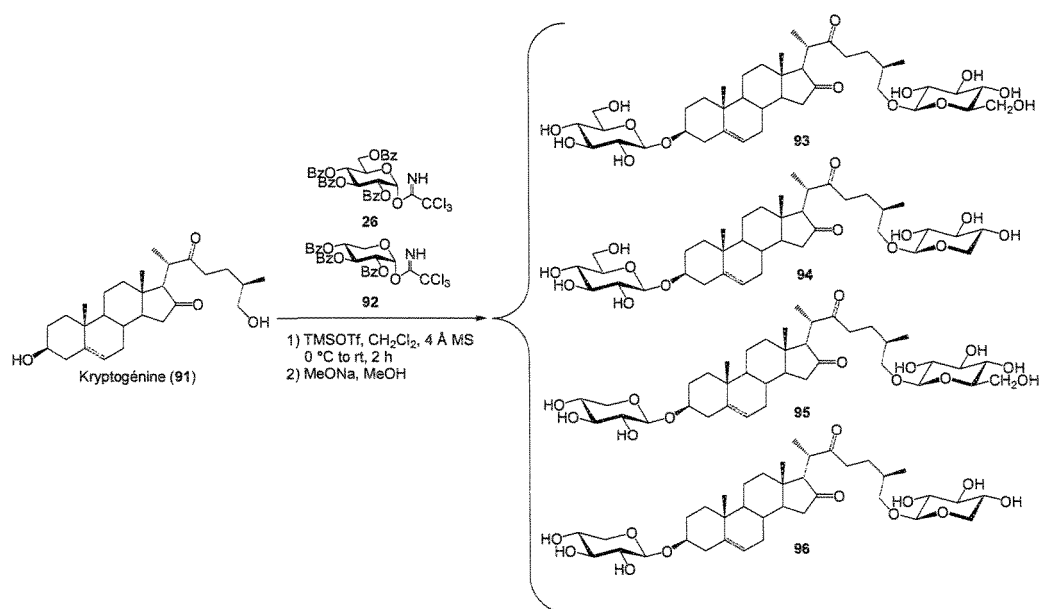


Figure 18. Synthèse de bidesmosides (**93-96**) par glycorandomisation

2.1.4.2.3. Synthèse de Bidesmosides Glucuronidés

L'isolement de saponines bidesmosidiques naturelles contenant une section acide D-glucuronique branchée directement à la position C-3 d'une génine triterpénique a été fréquemment rapportée dans la littérature [Tan *et al.*, 1999]. Le groupe de Biao Yu a entrepris la synthèse de ce type de composés naturels (**97** et **98**, Figure 19) [Peng *et al.*, 2004a; Peng *et al.*, 2004b] dont le ginsenoside Ro (**98**). Il est pertinent de mentionner que la molécule **98** est la seule saponine de type oléane décrite à ce jour dans le ginseng (*Panax ginseng*), une plante abondamment utilisée en médecine traditionnelle orientale [Peng *et al.*, 2004a].

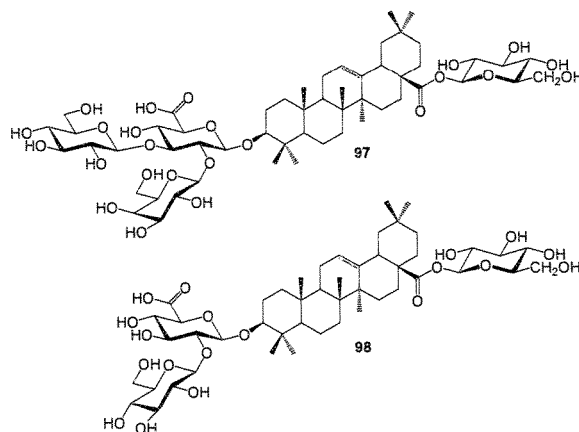


Figure 19. Saponines bidesmosidiques de type oléanane (**97** et **98**) contenant une section acide D-glucuronique

La synthèse du ginsenoside Ro (**98**) est décrite à la figure 20. Tout d'abord, l'acide ursolique (**20**) protégé par un groupement TBDPS (**99**, 92%) a été couplé avec le sucre TFA **100** sous des conditions standards de glycosylation. Les fonctions TBDPS et AZMB du monodesmoside **101** (87%) résultant ont ensuite été déprotégées pour donner **102** (70%, deux étapes). Il est intéressant de noter que la fonction AZMB [2-(azidométhyl)benzoyl] est un nouveau type de groupement protecteur pouvant être clivé sélectivement en présence de fonctions acétyles, benzoyles et autres esters sous les conditions de Staudinger [Wada *et al.*, 2001]. La double glycosylation de l'accepteur **102** avec le sucre donneur TFA **63** en présence de TMSOTf a permis l'obtention du bidesmoside protégé **103**. Les fonctions acétyles de ce dernier ont ensuite été déprotégées et l'alcool primaire en C-6' de **104** a été oxydé régiosélectivement à l'aide de TEMPO et $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ [Lin *et al.*, 2004]. L'hydrolyse des groupements protecteurs a finalement permis de générer la saponine bidesmosidique cible (**98**, 43%, deux étapes).

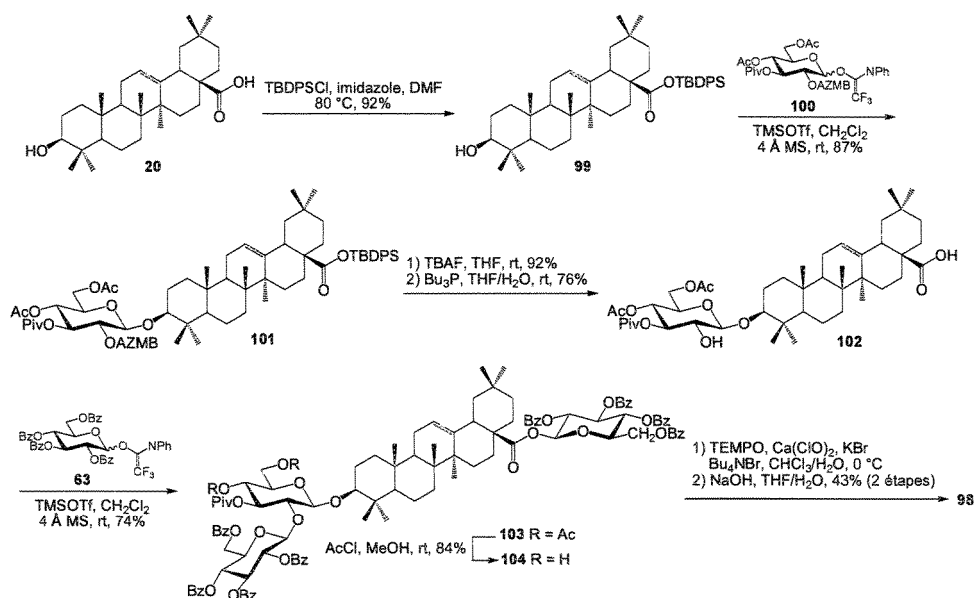


Figure 20. Synthèse d'un ginsenoside Ro (**98**) porteur d'une section acide D-glucuronique

2.1.4.2.4. Synthèse du Flaccidoside II

Le rhizome d'*Anemone flaccida* ou Di Wu, une plante de la médecine traditionnelle chinoise utilisée comme anti-poison, contient des saponines triterpéniques en tant que composés bioactifs. Le flaccidoside II (**105**) a été obtenu des extraits éthanoliques de *A. flaccida* et est considéré comme l'une des molécules actives de Di Wu [Cheng *et al.*, 2008]. D'un point de vue structural, cette saponine est constituée d'un aglycone de type acide oléanolique (**20**), une section disaccharidique branchée (2'-OH) en C-3 et une section trisaccharidique linéaire en C-28. Cette dernière section, α -L-rhamnopyranosyl-(1→4)- β -D-glucopyranosyl-(1→6)- β -D-glucopyranoside, est une moitié sucre fréquemment retrouvée chez les saponines triterpéniques naturelles (voir section 2.3.1.). La synthèse de cette molécule (Figure 21) débute par la réaction du trityle oléanolate (**76**) avec le sucre donneur 3,4-di-O-benzoyl-1-thio- β -D-xylopyranoside (**106**) en présence des acides de Lewis TMSOTf et NIS [Cheng *et al.*, 2008]. Le glycoside résultant (**107**, 70%) a ensuite été couplé avec le TCA **32** pour donner **108** (75%). À ce stade de la synthèse, la fonction ester

de trityle a été clivée à l'aide d'acide acétique 80% (**109**) et la molécule a été mise en présence du TCA trisaccharidique **110** afin de générer le bidesmoside pleinement protégé **111** (78%). L'hydrolyse finale des groupements benzoyles et acétyles a conduit à la formation du flaccidoside II (**105**, 96%) dont les données physico-chimiques concordent avec celles de la littérature.

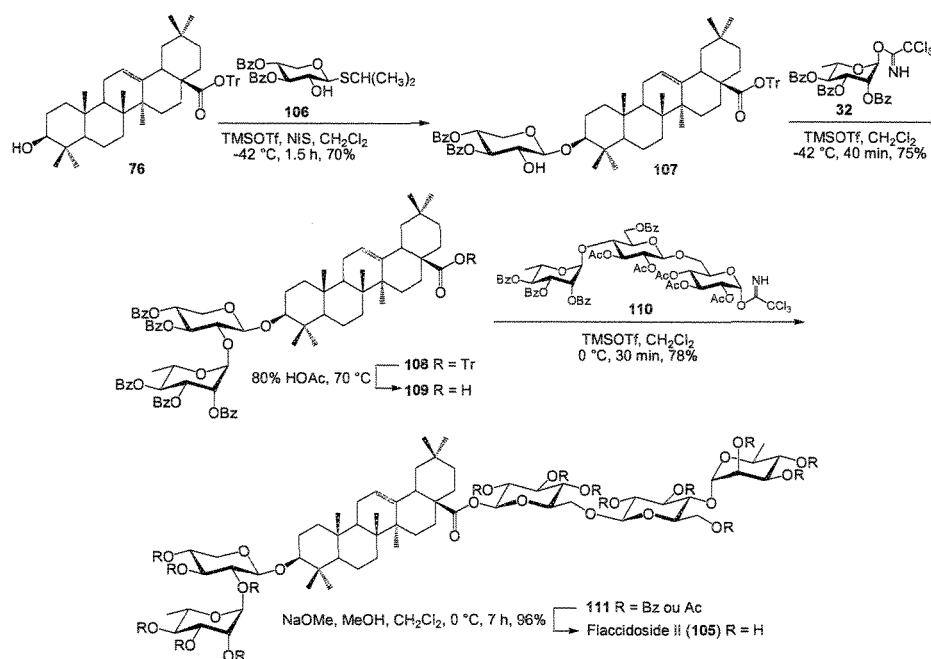


Figure 21. Synthèse du flaccidoside II (**105**) porteur d'une section osidique Rhap(1→4)Glc(1→6)Glc(1→6) en C-28

2.1.4.2.5. Synthèse Totale de QS-21A_{api}

QS-21A_{api} (**112**) est un constituant mineur contenu dans les extraits de l'arbre sud-américain *Quillaja saponaria*. Cette saponine bidesmosidique (**112**) est reconnue pour son fort potentiel en tant qu'adjuvant de vaccins. En effet, il a été montré cliniquement que QS-21A_{api} (**112**) agit en prolongeant la réponse immunitaire chez les patients lors de diverses thérapies vaccinales [Kim *et al.*, 2006]. Au niveau structural, ce bidesmoside complexe contient un noyau triterpénique de type acide quillaïque avec deux sections oligosaccharidiques (un trisaccharide branché et un

tétrasaccharide linéaire) dont l'une est liée à une chaîne d'acides gras glycosylée. Quelques articles ont été publiés concernant la synthèse de la section trisaccharidique branchée [Zhu *et al.*, 2004; Eleutério *et al.*, 2006; Schimmel *et al.*, 2006], mais c'est un groupe de chercheurs américains qui ont réussi la première synthèse totale de QS-21A_{api} (**112**) [Kim *et al.*, 2006]. Brièvement, la condensation entre le tétrasaccharide **114** et l'acide **113** sous les conditions de Yamaguchi [Inanaga *et al.*, 1979] a fourni l'ester glycosylé **115** (90%) qui a été converti en TCA **116** (56%) (Figure 22). La glycosylation de l'accepteur allylé **117** avec le TCA trisaccharidique **118** a été effectuée en utilisant le B(C₆F₅)₃ ce qui a mené à la formation du monodesmoside protégé **119** (59%) avec une sélectivité satisfaisante au niveau du lien glycosidique (ratio $\beta/\alpha = 7:1$). Des réactions de protection-déprotection ont permis l'obtention du dérivé **120** contenant une fonction acide carboxylique libre qui a pu être couplée avec le TCA **116** par la promotion de BF₃•OEt₂ pour donner le bidesmoside protégé **121** dans un rendement de 70%. Finalement, une petite quantité (≈ 1 mg) de QS-21A_{api} (**112**) a été obtenue sous une forme pure suite au clivage des différents groupements protecteurs de **121**.

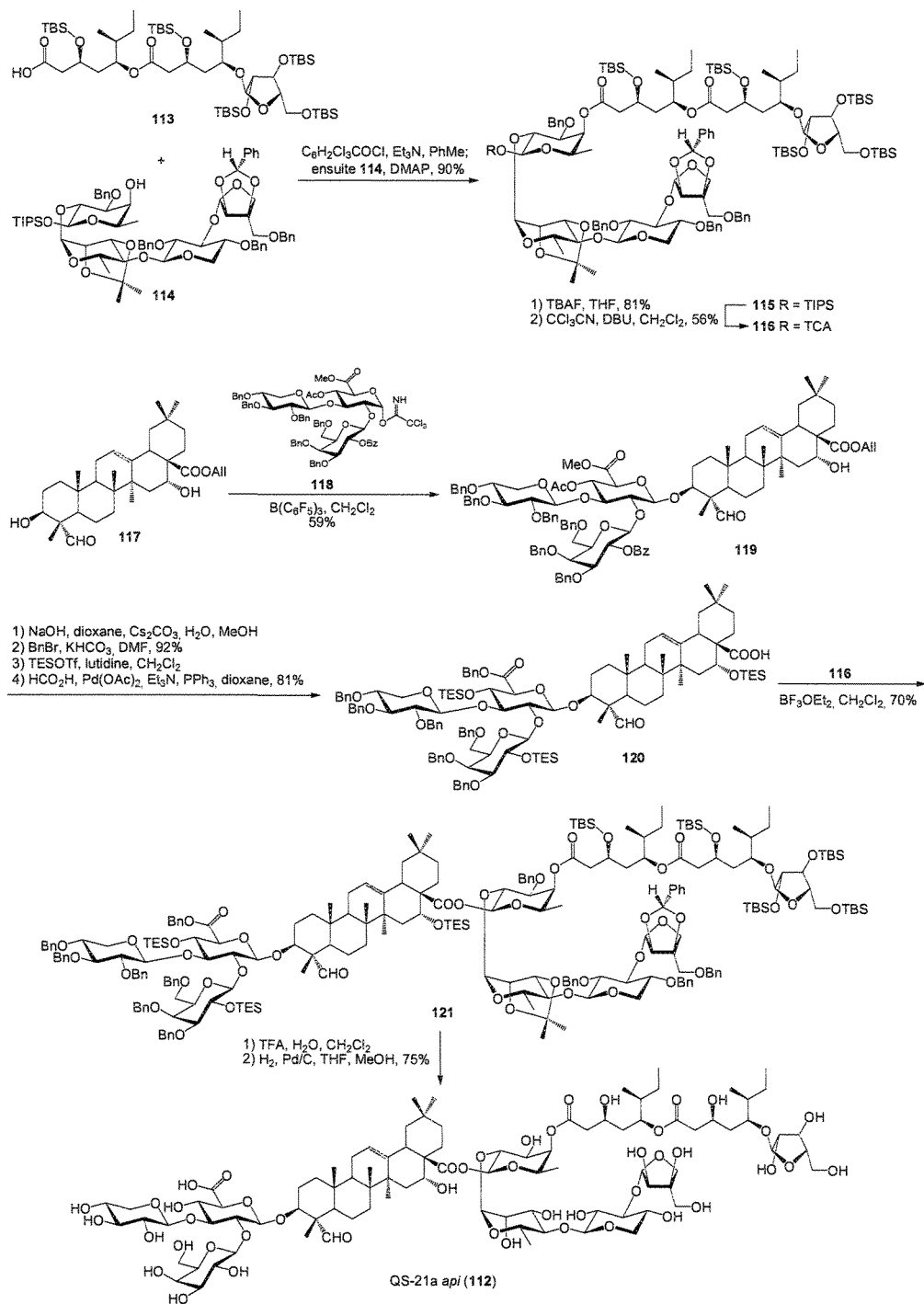


Figure 22. Synthèse totale convergente de l'adjuvant de vaccins QS-21A_{apti} (112)

2.1.4.2.6. Synthèse Totale du Lobatoside E

L'isolement de saponines bidesmosidiques cycliques a été très peu souvent rapporté dans la littérature scientifique [Bruneton, 1995]. À ce jour, seulement une dizaine de ces composés ont été isolés des plantes médicinales chinoises *Bolbostemma paniculatum* et *Actinostemma lobatum*. Le lobatoside E (**122**) fait partie de cette classe unique de produits naturels. Ce bidesmoside cyclique (**122**) inhibe fortement la croissance des cellules cancéreuses humaines du poumon (A549), du côlon (SW-620) et du mélanome (SK-MEL-5) avec des valeurs d'IC₅₀ comprises entre 0,14 et 0,36 µM. Récemment, le groupe de Biao Yu a entrepris la synthèse totale du lobatoside E (**122**, Figure 23) [Zhu *et al.*, 2008]. Tout d'abord, la molécule triterpénique **123** a été obtenue suite à la fonctionnalisation des positions C-2 et C-23 de l'acide oléanolique (**20**) à l'aide d'une approche linéaire impliquant la cyclopalladation [García-Granados *et al.*, 2007] comme étape déterminante de la voie de synthèse. Le couplage de **123** avec le sucre bromé **124** sous des conditions de catalyse en phase hétérogène [Bliard *et al.*, 1994] a produit **125** (80%). Ce dernier a ensuite été mis en présence du TCA **126** afin de générer le bidesmoside protégé **127** dans un excellent rendement de 96%. Le clivage de la fonction chloroacétyle (CA) en position C-2' suivi du couplage avec le TCA silylé **129** a permis l'obtention du bidesmoside branché **130** (65%). Une fois l'acétyl enlevé (**131**, 97%), le disaccharide activé **132** a été couplé avec **131**. Le groupement Bz en position C-2'' de la molécule **133** (81%) a été interchangé par un groupement Bn (**134**, 51%, deux étapes) et la fonction TBDPS a été clivée afin de pouvoir condenser l'hydroxyle libre (6''-OH) avec l'acide **135** sous les conditions de Yamaguchi pour donner **136** (96%). Le macrocycle du bidesmoside a été réalisé par la déprotection du groupement PMB de la section L-rhamnose (**137**, 95%) suivie de la condensation avec l'acide présent en position 6 de la section D-galactose. À la suite de cette réaction, deux bidesmosides cycliques épimériques ont été obtenus (**138** et **139**, 50-60%) et ont pu être séparés par chromatographie sur colonne de gel de silice. Finalement, le clivage des groupements protecteurs benzylés par une réaction d'hydrogénation a mené à la formation du bidesmoside cible (**122**) et de son épimère **140** dans un rendement de 80%.

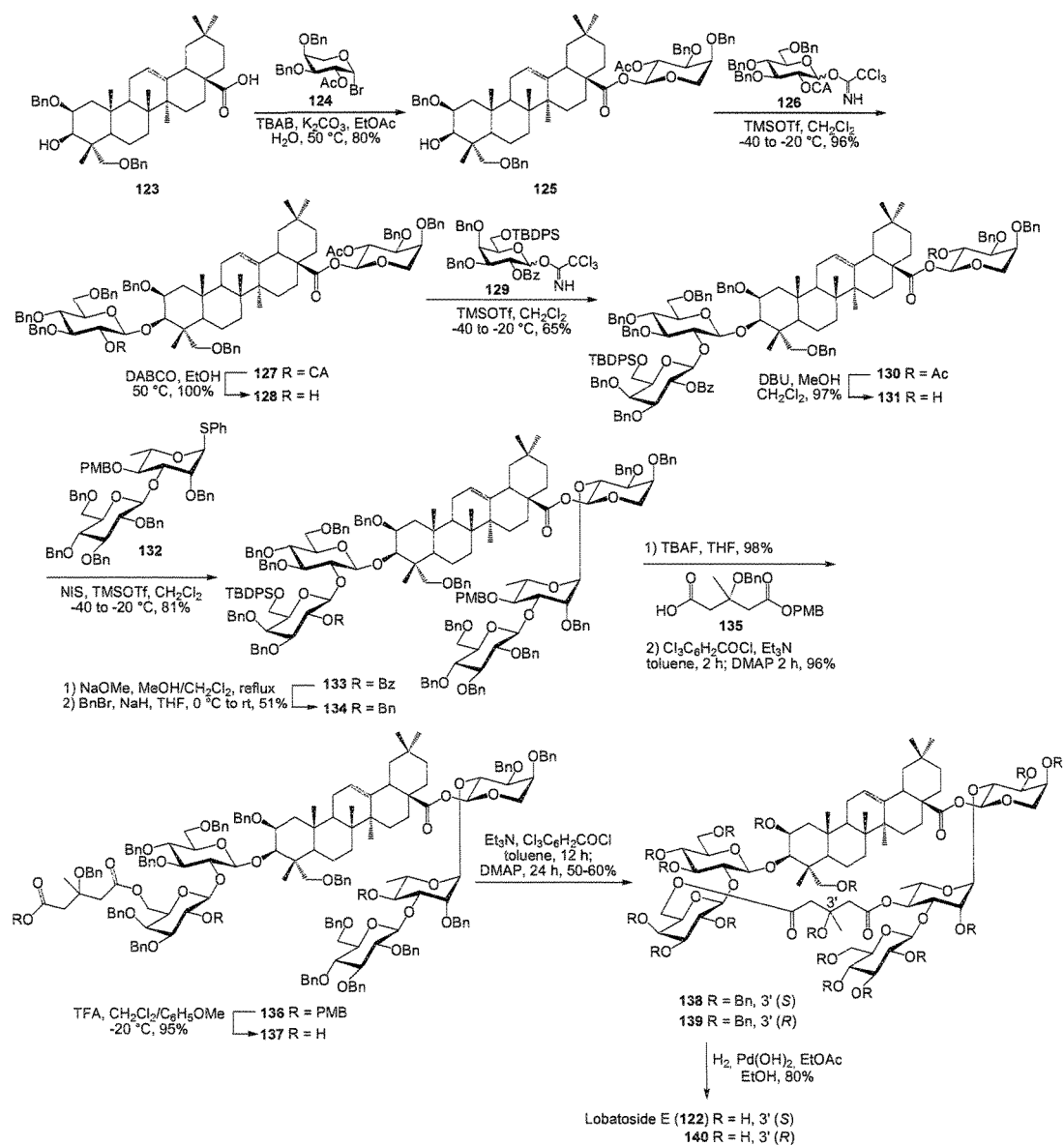


Figure 23. Synthèse totale du lobatoside E (122), un bidesmoside cyclique anticancéreux

2.2. LES TRITERPÈNES DE TYPE LUPANE

2.2.1. Généralités

L'acide bétulinique (**15**) et le bétulinol (**16**) (Tableau 2, Chapitre 1) sont les représentants les plus étudiés d'une classe de métabolites secondaires appelés les triterpènes de type lupane. Dérivant biosynthétiquement de la cyclisation du (3S)-2,3-époxy-2,3-dihydrosqualène, les triterpènes constituent l'une des classes de produits naturels les plus diversifiées avec plus de 4 000 squelettes répertoriés jusqu'à ce jour [Bruneton, 1995]. Le bétulinol (**16**) connu aussi sous le nom de betulin, trochton et coryli-résinol est l'un des premiers produits naturels isolés (1788) d'une espèce végétale [Hayek *et al.*, 1989]. Les écorces de différentes espèces de bouleau telles que *Betula utilis* [Chari *et al.*, 1968], *B. cordifolia*, *B. populifolia*, *B. x caerulea* [O'Connel *et al.*, 1988], *B. platyphylla* [Fuchino *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2003], *B. davurica* [Fuchino *et al.*, 1998a], *B. ovalifolia* [Fuchino *et al.*, 1998b], *B. schmidtii* [Fuchino *et al.*, 1998c], *B. alleghaniensis* [Habiyaemye *et al.*, 2002] et *B. papyrifera* [O'Connel *et al.*, 1988; Gauthier *et al.*, 2006; Kolomitsyn *et al.*, 2007] contiennent tous des quantités appréciables de bétulinol (**16**). Pour sa part, l'acide bétulinique (**15**), moins abondant dans le bouleau [Krasutsky, 2006], est largement distribué dans les fruits, légumes, plantes médicinales et autres espèces végétales réparties à la grandeur du globe [Eiznhamer *et al.*, 2004]. Une étude a révélé que le triterpène **15** est le principal constituant retrouvé dans les sous-produits de l'industrie du liège (11,7 g/kg) [Sousa *et al.*, 2006]. L'acide bétulinique (**15**) est habituellement synthétisé par oxydation à partir du bétulinol (**16**) qui est disponible commercialement et à bas prix (section 2.2.3.).

En raison de la grande valeur thérapeutique des triterpènes de type lupane (section 2.2.2.), plusieurs méthodes de dosage de l'acide bétulinique (**15**) et du bétulinol (**16**) dans des extraits végétaux ont été mises au point ces dernières années [de Oliveira *et al.*, 2002; Gu *et al.*, 2006]. Par exemple, l'acide bétulinique (**15**) a été identifié dans les écorces de platane (*Platanus acerifolia*) et du bouleau blanc (*B. pendula*) à l'aide de la TLC, GC-MS et ¹H NMR [Galgon *et al.*, 1999]. Aussi, l'analyse quantitative

(dosage) par GC après dérivation (silylation) a révélé que le composé **15** est présent à 3,3% p/p dans l'écorce de platane [Galgon *et al.*, 1999]. D'autres chercheurs se sont également penchés sur le dosage simultané de l'acide bétulinique (**15**) et du bétulinol (**16**) dans les écorces du bouleau blanc (*B. platyphylla suk.*) par HPLC en phase inverse en fonction du type de solvant d'extraction. Il est intéressant de noter que les extraits à l'éthanol 95% ont permis d'atteindre les plus hauts niveaux en composés triterpéniques **15** et **16** [Zhao *et al.*, 2007].

Le squelette hydrocarboné non-polaire des triterpènes de type lupane similaire à celui du cholestérol ne leur confère qu'une très faible solubilité aqueuse. À cet effet, une étude récente a révélé que l'hydrosolubilité de l'acide bétulinique (**15**) et de l'acide oléanolique (**20**) est inférieure à $0,02 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ [Jäger *et al.*, 2007]. Toutefois, les auteurs ont montré que, dans une solution alcaline à pH 11,5 contenant du tampon phosphate trisodique 10 mM, la solubilité de ces triterpènes augmentent drastiquement ($77,2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pour **10** et $40,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ pour **15**). La formulation de l'acide bétulinique (**15**) dans un médium peu toxique est évidemment indispensable pour son utilisation à des fins thérapeutiques [Strickley, 2004]. À cet effet, un groupe de recherche a tenté de résoudre ce problème en solubilisant l'acide bétulinique (**15**) à l'intérieur de liposomes, de microscopiques vésicules amphiphiliques, c'est-à-dire à la fois solubles dans les graisses et l'eau [Bang Son *et al.*, 1998].

2.2.2. Activités Biologiques

Les triterpènes de type lupane dont l'acide bétulinique (**15**) et le bétulinol (**16**) ont attiré l'attention de la communauté scientifique ces dernières années en raison de leurs multiples activités pharmacologiques. Tel que décrit dans les nombreuses revues de littérature publiées à ce sujet [Hayek *et al.*, 1989; Baglin *et al.*, 2003a; Patočka, 2003; Setzer *et al.*, 2003; Cichewicz *et al.*, 2004; Eiznhamer *et al.*, 2004; Ovesná *et al.*, 2004; Bi *et al.*, 2005; Sami *et al.*, 2005; Yogeewari *et al.*, 2005; Dzubak *et al.*, 2006; Krasutsky, 2006; Mukherjee *et al.*, 2006; Tolstikova *et al.*, 2006a; Tolstikova *et al.*, 2006b; Sporn *et al.*, 2007], l'acide bétulinique (**15**) et ses dérivés exercent des activités pharmaceutiques très diversifiées: anti-inflammatoire,

antimalaria, anti-VIH, cytotoxique, anticancéreux, antibactérien, analgésique, etc. La section 2.2.2.1. suivante traitera plus spécifiquement des activités cytotoxique et antitumorale de l'acide bétulinique (15) en lien avec le présent projet de doctorat. De plus, dans la section 2.2.2.2., il sera brièvement question de l'activité anti-VIH du lupane 15 et de ses dérivés les plus actifs tels que le bevirimat (21).

2.2.2.1. Activités Cytotoxique et Antitumorale

En 1995, un groupe de chercheurs américains publia une étude dans *Nature Medicine* dans laquelle ils ont rapporté l'activité anticancéreuse de l'acide bétulinique (15) sélective au mélanome humain [Pisha *et al.*, 1995]. Dans cette étude, la capacité de l'acide bétulinique (15) à prévenir l'apparition de tumeurs a également été démontrée lors de tests *in vivo* sur des souris porteuses de tumeurs du mélanome. De plus, un traitement intrapéritonéale avec le triterpène 15 à partir du 41^e jour après l'injection des cellules cancéreuses a permis de faire régresser la croissance des tumeurs d'environ 80% en comparaison avec le groupe contrôle [Pisha *et al.*, 1995]. Des études subséquentes ont révélé que le potentiel anticancéreux de l'acide bétulinique (15) pouvait être étendu à d'autres types de lignées cellulaires dérivées des types de cancer les plus prévalents dans la population humaine (poumon, côlon, sein, prostate, cerveau, etc.) [Schmidt *et al.*, 1997; Fulda *et al.*, 1999; Fulda *et al.*, 2000; Zuco *et al.*, 2002; Jung *et al.*, 2007; Kessler *et al.*, 2007]. Noda et ses collaborateurs [1997] ont posé l'hypothèse selon laquelle l'activité anticancéreuse sélective de l'acide bétulinique (15) envers les cellules leucémiques L1210 pourrait être attribuable au pH acide ($\leq 6,8$) retrouvé dans le milieu de culture. Par le fait même, les chercheurs stipulent que cette caractéristique pourrait être mise à profit afin de traiter les tumeurs solides avec l'acide bétulinique (15) étant donné que le pH à l'intérieur des tissus tumoraux est généralement plus acide que celui des tissus normaux.

Tel que mentionné dans l'introduction de cette thèse, l'intérêt pour l'acide bétulinique (15) et ses dérivés réside dans leur non-toxicité envers les cellules saines. À cet effet, l'étude *in vivo* de Pisha *et al.* [1995] sur souris porteuses de tumeurs murines a révélé que le traitement avec l'acide bétulinique (15) n'induisait aucune

toxicité, métastases ou anomalies structurales chez les organes vitaux des souris. Quelques années plus tard, une seconde étude *in vivo* a confirmé la non-toxicité de l'acide bétulinique (15), c'est-à-dire qu'aucune toxicité apparente ou perte de poids n'a été décelée chez le groupe de souris traitées en comparaison avec le groupe contrôle [Zuco *et al.*, 2002]. Dernièrement, un article publié dans *Cancer Letters* par un groupe de chercheurs néerlandais a encore une fois confirmé la résistance de certaines cellules saines (cellules B activées, lymphocytes T et cellules mononucléaires périphériques sanguines) envers le traitement avec l'acide bétulinique (15) [Kessler *et al.*, 2007]. De plus, les triterpènes de type lupane n'ont montré aucune activité hémolytique envers les globules rouges à des concentrations aussi élevées que 500 μ M [Yamashita *et al.*, 2002].

À lumière de ces résultats prometteurs, plusieurs chercheurs se sont lancés à la recherche du mécanisme d'action par lequel l'acide bétulinique (15) entraîne la mort des cellules cancéreuses. Brièvement, les résultats de ces travaux ont montré que l'acide bétulinique (15) induisait l'apoptose ou mort cellulaire programmée de certaines cellules cancéreuses par la perte du potentiel mitochondrial provoquant ainsi le largage de facteurs apoptogéniques solubles tels que le cytochrome *c* pouvant activer les caspases et endonucléases indépendamment du statut du gène p53 [Schmidt *et al.*, 1997; Fulda *et al.*, 1998; Fulda *et al.*, 1999; Wick *et al.*, 1999; Fulda *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 2003; Fulda *et al.*, 2005; Galgon *et al.*, 2005].

2.2.2.2. Activité Anti-VIH

En 1994, un groupe de chercheurs a publié un article dans le *Journal of Natural Products* relatant l'isolation de composés triterpéniques dont l'acide bétulinique (15) à partir de l'extrait méthanolique des feuilles de *Syzygium claviflorum* [Fujioka *et al.*, 1994]. Lors de cette étude, l'activité anti-VIH des composés isolés a été évaluée et il s'est avéré que l'acide bétulinique (15) a inhibé significativement la réplication du virus du SIDA dans des cellules infectées de type lymphocytes H9. Pendant la même année, des chercheurs français et belges ont publié un article dans la prestigieuse revue *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

America qui révélait le mécanisme d'action anti-VIH de l'acide bétulinique (**15**) et de certains dérivés synthétiques. En résumé, les auteurs ont montré que le triterpène **15** s'oppose à la pénétration du virus du SIDA en empêchant l'étape de la fusion membranaire préalable à cette pénétration [Mayaux *et al.*, 1994]. Peu de temps après, Kashiwada et ses collaborateurs [1996] ont découvert le bevirimat (**21**) ou PA-457, nommé systématiquement acide 3-*O*-(3',3'-diméthylsuccinyl) bétulinique, suite à une étude de synthèse et de relations structure-activité de plusieurs dérivés estérifiés du triterpène **15**. Les résultats des tests *in vitro* ont révélé que le bevirimat (**21**) exerce une activité anti-VIH exceptionnelle ($EC_{50} < 3,5 \times 10^{-4} \mu M$) envers les lymphocytes T9 infectés en comparaison avec les agents utilisés en clinique. Des études cliniques de phase II conduites par le *National Institute of Health* des États-Unis sont présentement en cours afin de prouver l'efficacité chez les sidéens d'une formulation orale du bevirimat (**21**) développée par la compagnie américaine Panacos (voir le site internet: www.panacos.com). Durant les dernières années, d'autres études ont été menées afin de trouver des agents anti-VIH de nature triterpénique encore plus actifs que **21** [Evers *et al.*, 1996; Soler *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2006]. À cet effet, il est intéressant de mentionner qu'un dérivé C-28 aminé de l'acide glycyrrhétinique porteur de la chaîne 3',3'-diméthylsuccinyl en position C-3 a exercé une forte activité anti-VIH ($EC_{50} = 0,0085 \mu M$) envers une souche du virus résistante au bevirimat (**21**) [Yu *et al.*, 2006].

2.2.3. Synthèse de l'Acide Bétulinique

Peu après la découverte de ses propriétés anti-mélanomes [Pisha *et al.*, 1995], certains chercheurs ont mis au point des semi-synthèses de l'acide bétulinique (**15**) en tirant profit de l'abondance du bétulinol (**16**) dans les écorces de bouleau [Krasutsky, 2006]. Tout d'abord, le groupe de Pezzuto [Kim *et al.*, 1997] a réussi la conversion de **16** en **15** (Figure 24) selon une approche impliquant l'oxydation des fonctions alcools primaire (C-28) et secondaire (C-3) avec le réactif de Jones (CrO_3/H_2SO_4) suivie d'une réduction subséquente de la cétone de l'acide bétulinique

(141). Le rendement global est de l'ordre de 71% (deux étapes) en épimère β après la recrystallisation.

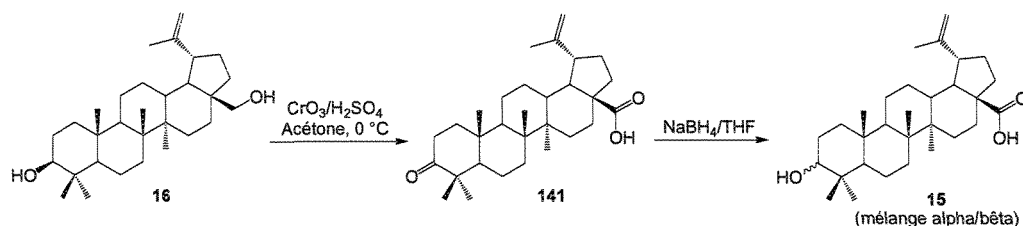


Figure 24. Synthèse de l'acide bétulinique (15) par le groupe Pezzuto

Une voie de synthèse en deux étapes consistant à l'oxydation régiosélective de la fonction alcool primaire (C-28) du bétulinol (16) a été développée par notre groupe de recherche. Celle-ci consiste en 1) l'oxydation de 16 en aldéhyde bétulinique (18) par l'action du CrO_3 adsorbé sur gel de silice et 2) l'oxydation de l'aldéhyde en acide par ajout de KMnO_4 (Figure 25) [Pichette *et al.*, 2004]. Cette méthode possède l'avantage que l'acide bétulinique (15) est obtenu uniquement sous la forme de l'épimère β sans recrystallisation nécessaire.

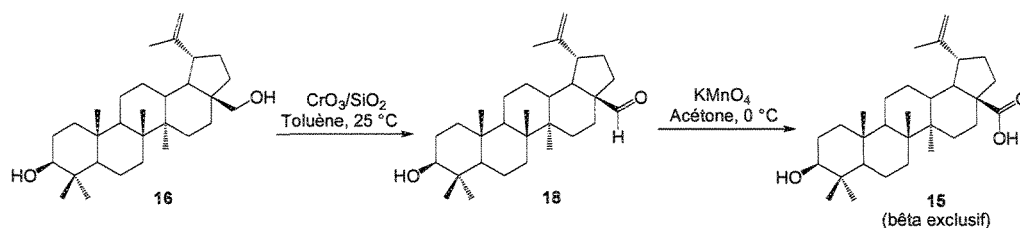


Figure 25. Synthèse de l'acide bétulinique (15) par le groupe Pichette

Une autre approche de synthèse consistant en une modification de la procédure utilisée par Krasutsky et ses collaborateurs [2001] a également été publiée par notre groupe de recherche (Figure 26) [Thibeault *et al.*, 2007]. Brièvement, les fonctions alcools du bétulinol (16) ont été acétylées (142, 100%) et la fonction acétyle en C-28 a été déprotégée sélectivement (143, 86%). Par la suite, l'oxydation par PCC a mené à la formation de l'aldéhyde 144 (96%) qui a été subséquemment oxydé en l'acide 145 (81%) par l'action combinée de NaClO_2 et NaH_2PO_4 . L'acide bétulinique (15) a

ensuite été obtenu après la déprotection de l'acétyl en position C-3 de **145** sous des conditions d'hydrolyse basique.

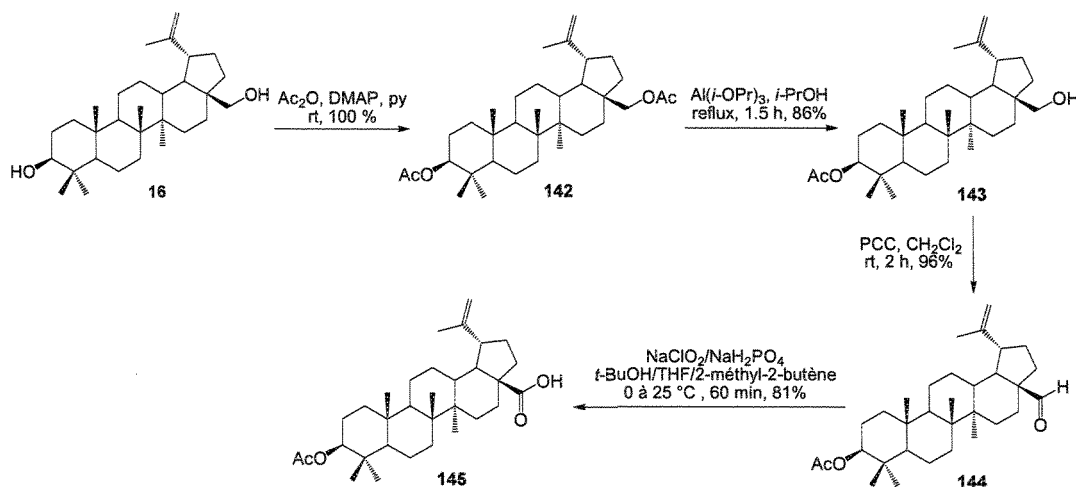


Figure 26. Synthèse de l'acide 3-acétyl bétulinique (**145**) par le groupe Pichette

Afin d'augmenter les rendements globaux et de faciliter la préparation de l'acide bétulinique (**15**) à plus grande échelle, un groupe allemand a récemment rapporté la synthèse en une seule étape de **15** à partir de **16** [Csuk *et al.*, 2006]. L'approche consistait en l'oxydation sélective de l'alcool primaire du bétulinol (**16**) en acide carboxylique par l'utilisation de 4-acétimido-TEMPO/ $\text{NaCl}_2\text{O}/\text{NaClO}$ (Figure 27). L'acide bétulinique (**15**) a ainsi été obtenu dans un rendement de 86% après recristallisation. Il est intéressant de noter que l'utilisation du TEMPO non-substitué conduit à la formation préférentielle de l'aldéhyde bétulinique (**18**) dans un rendement de 92%.

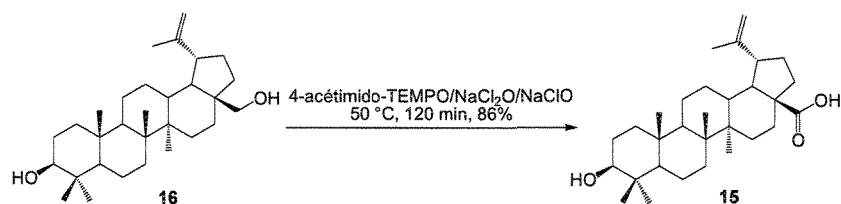


Figure 27. Synthèse de l'acide bétulinique (**15**) en une seule étape avec le 4-acétimido-TEMPO

2.2.4. Dérivés Synthétiques Anticancéreux

Durant la dernière décennie, des centaines de dérivés triterpéniques de type lupane ont été synthétisés et leur activité anticancéreuse évaluée. Plusieurs revues de littérature ont d'ailleurs été publiées en ce qui a trait aux relations de structure-activité de l'acide bétulinique (**15**) et de ses dérivés [Cichewicz *et al.*, 2004; Dzubak *et al.*, 2006; Mukherjee *et al.*, 2006]. Dans cette section, il sera question de quelques études qui ont rapporté la synthèse et l'activité anticancéreuse de dérivés substantiellement plus polaires et actifs que l'acide bétulinique (**15**).

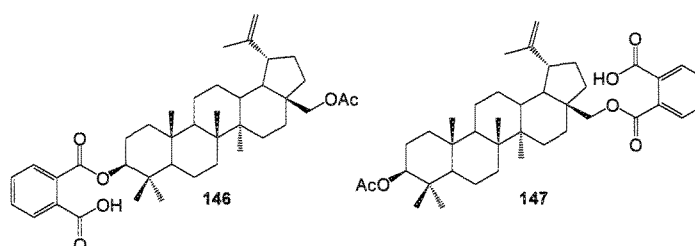


Figure 28. Dérivés hémiphthalates (**146** et **147**) cytotoxiques du bétulinol (**16**)

Un groupe de recherche de la République Tchèque a effectué la synthèse de dérivés phthalates de l'acide bétulinique (**15**) et du bétulinol (**16**) [Kvasnica *et al.*, 2005]. Dans la majorité des cas, l'ajout d'une section phthalate en position C-3 ou C-28 du squelette lupane a eu pour effet une augmentation significative de l'activité cytotoxique envers différentes lignées cellulaires cancéreuses. Le 3 β -O-acétyl bétulinol hémiphthalate (**146**) et le 28-O-acétyl bétulinol hémiphthalate (**147**) (Figure 28) représentent les dérivés les plus actifs d'une série d'une trentaine de composés. Selon les auteurs, les dérivés hémiphthalates **146** et **147** sont très polaires et se dissolvent très facilement dans les solvants qu'ils ont utilisés lors des tests de cytotoxicité (10% DMSO dans H₂O).

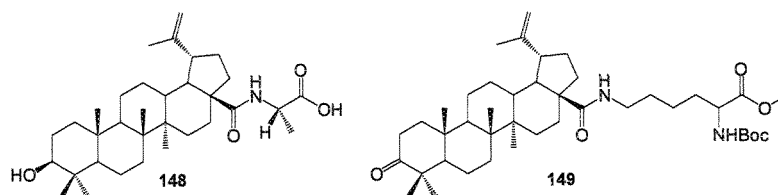


Figure 29. Dérivés aminés (**148** et **149**) anticancéreux de l'acide bétulinique (**15**)

L'acide bétulinique (**15**) a également été couplé en position C-28 avec divers acides aminés naturels [Jeong *et al.*, 1999]. Les résultats des tests de cytotoxicité ont révélé que l'ajout d'une section alanine augmentait d'environ trois fois l'activité de l'acide bétulinique (**15**) envers la lignée cellulaire humaine du mélanome (SK-MEL-2). De plus, la solubilité aqueuse estimée pour le dérivé **148** (Figure 29) est environ cinquante fois supérieure à celle de l'acide bétulinique (**15**). Dans le même ordre d'idées, des chercheurs ont récemment effectué la synthèse d'un dérivé Boc-lysine de l'acide bétulinique (**149**) [Saxena *et al.*, 2006]. La molécule a été testée pour son activité anticancéreuse *in vivo* sur des souris porteuses de tumeurs de la prostate. Après une injection intrapéritonéale quotidienne pendant 17 jours du dérivé **149** à une dose de 30 mg/kg, les souris traitées ont montré une inhibition de 92% de la croissance de la tumeur en comparaison avec le groupe contrôle (Figure 30).

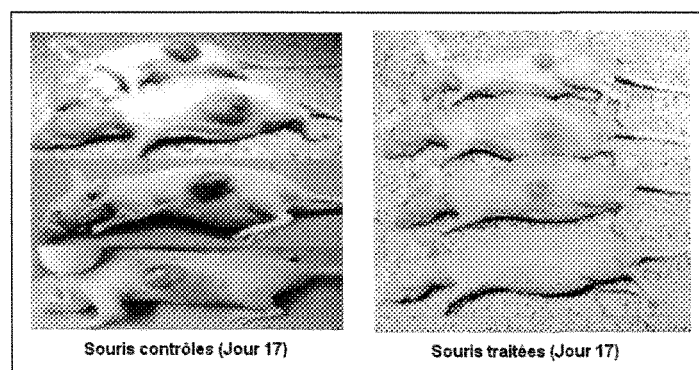


Figure 30. Souris traitées avec le dérivé Boc-lysine (**149**) de l'acide bétulinique (**141**)

2.3. LES SAPONINES DE TYPE LUPANE

2.3.1. Isolement et Activités Biologiques

Il est connu que les saponines triterpéniques à génine de type lupane tel que l'acide bétulinique (**15**) sont beaucoup moins répandues dans le règne végétal que celles à squelette oléanane [Krasutsky, 2006]. Une recherche de la littérature scientifique à l'aide de Chemical Abstract[®], Web of Science[®] et SCOPUS[®] nous a permis d'identifier les différentes saponines de type lupane répertoriées jusqu'à aujourd'hui. La figure 31 représente la structure des aglycones tandis que le tableau 3 répertorie les saponines en fonction de l'espèce végétale, de la nature de l'aglycone (**I** à **XIX**) et des sections sucres retrouvées aux positions C-3 et/ou C-28.

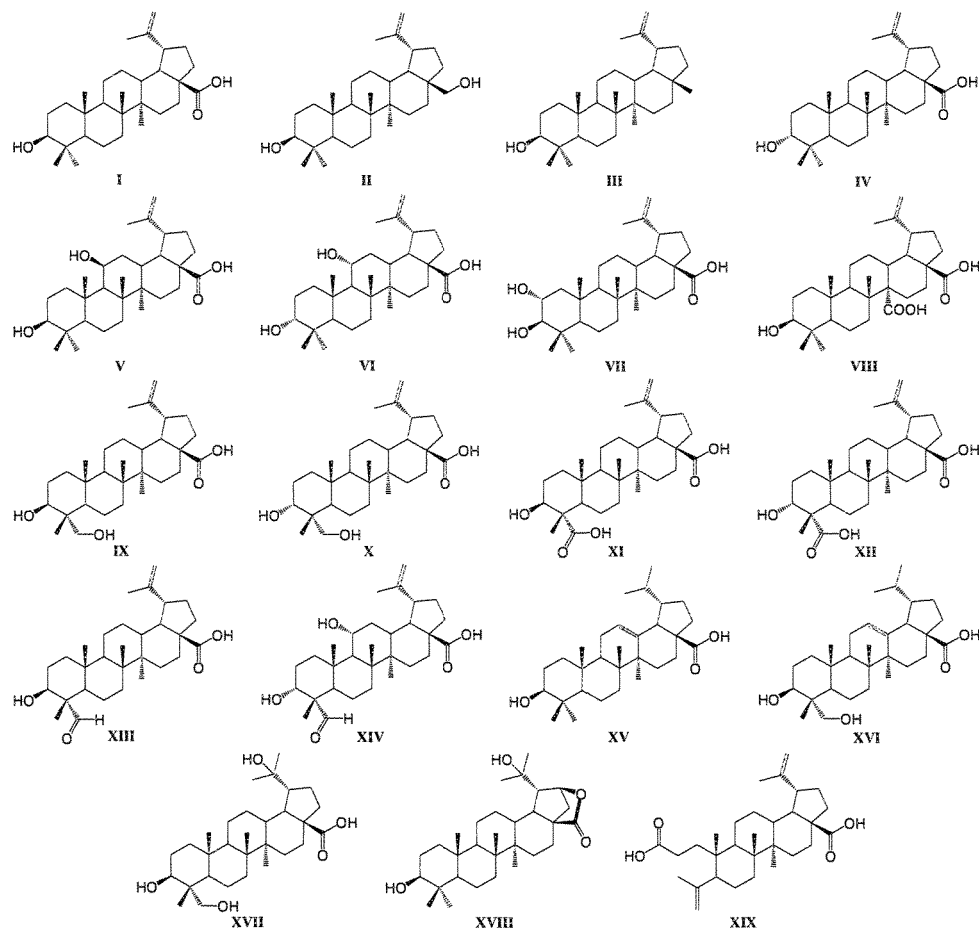


Figure 31. Aglycones de type lupane retrouvés dans les saponines naturelles

Tableau 3. Saponines triterpéniques naturelles de type lupane

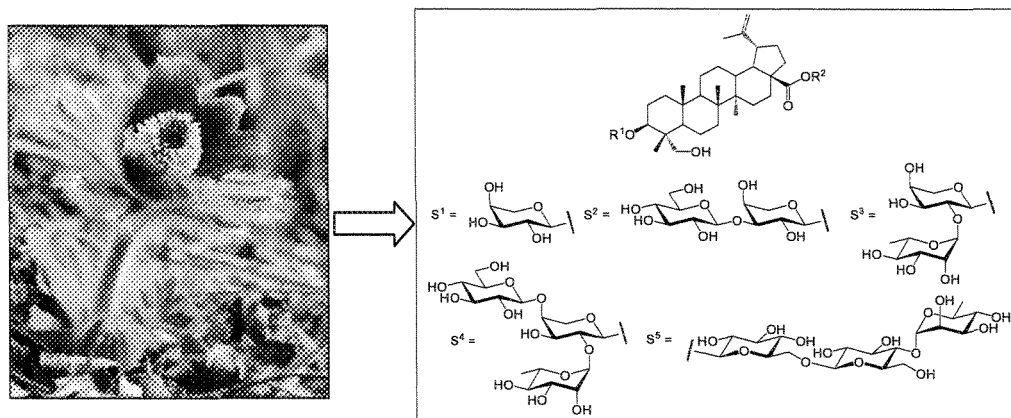
Espèce végétale	Saponine (génine)	Section Sucres		Références
		C-3	C-28	
<i>Acacia leucophloea</i>	(I)	Mal	-	Mishra, 1985
<i>Acanthopanax koreanum</i>	(VI)	-	Rha(1-4)Glc(1-6)Glc	Yook, 1998
	Acankoreoside C (VI)	Glc	Rha(1-4)Glc(1-6)Glc	Chang, 1999
<i>Acanthopanax gracilistylus</i>	Wujiapioside B (X)	-	Rha(1-4)Glc(1-6)Glc	Yook, 2002
	Acankoreoside C (VI)	Glc	Rha(1-4)Glc(1-6)Glc	Yook, 2002
	Acantrifoside A (VI)	-	Rha(1-4)Glc(1-6)Glc	Yook, 2002
	(IV)	-	Rha(1-4)Glc(1-6)Glc	Yook, 2002
	Acankoreoside D (XIV)	-	Rha(1-4)Glc(1-6)Glc	Chang, 1999
<i>Acanthopanax sessiliflorus</i>	Sessiloside (XIX)	-	Rha(1-4)Glc(1-6)Glc	Yoshizumi, 2006
<i>Acanthopanax trifoliatus</i>	(VI)	-	Rha(1-4)Glc(1-6)Glc	Yook, 1998
<i>Acanthus illicifolius</i>	(III)	Ara/(1-4)Glc	-	Minocha, 1981
<i>Amoora rohituka</i>	(II)	Xyl	-	Jain, 1984
<i>Anomospermum grandifolium</i>	(VIII)	-	Glc(1-2)[Xyl(1-3)]Xyl(1-2)Glc	Plaza, 2003
<i>Bersama engleriana</i>	(I)	Glc(1-2)GlcA	Glc	Tapondjou, 2006
<i>Bupleurum frutescens</i>	Frutesaponin A (XI)	Rha(1-4)Glc(1-6)Glc	-	Just, 1998
	Frutesaponin B (XI)	Rha(1-4)Glc	Glc	Just, 1998
	Frutesaponin C (XI)	Rha(1-4)Glc(1-6)Glc	Glc	Just, 1998
<i>Campsiandra guayanensis</i>	(I)	Xyl(1-2)Xyl	3(IsoVal)Rha	Braca, 2006
	(I)	Xyl(1-2)Glc	3(IsoVal)Rha	Braca, 2006
	(VII)	Xyl(1-2)Xyl	3(IsoVal)Rha	Braca, 2006
<i>Cordia obliqua</i>	(III)	Rha	-	Srivastava, 1983
<i>Cussonia racemosa</i>	(I)	Glc	Glc(1-2)Glc	Harinantenaina, 2002
	Cussosaponin A (I)	Glc	Ara(1-2)Glc	Harinantenaina, 2002
	Cussosaponin B (I)	Gal(1-2)Ara	Rha(1-4)Glc(1-6)Glc	Harinantenaina, 2002
	Cussosaponin C (I)	Rha(1-2)Ara	Rha(1-4)Glc(1-6)Glc	Harinantenaina, 2002
<i>Dillenia pentagyna</i>	(I)	Rha	-	Tiwari, 1980b
<i>Oplopanax elatus</i>	(I)	Glc	Rha(1-4)Glc(1-6)Glc	Wang, 1994
<i>Oreopanax guatemalensis</i>	(I)	Glc	Glc(1-6)Glc	Melek, 2002
	(I)	Glc	Rha(1-4)Glc(1-6)Glc	Melek, 2002
<i>Pavonia zeylanica</i>	(I)	Ara/(1-2)Rha(1-4)Glc	-	Tiwari, 1980a
<i>Pulsatilla chinensis</i>	Pulsatilloside C (IX)	-	Rha(1-4)Glc(1-6)Glc	Ye, 1998
	(I)	Rha(1-2)Ara	Rha(1-4)Glc(1-6)Glc	Mimaki, 2001
	(IX)	Rha(1-2)[Glc(1-4)]Ara	Rha(1-4)Glc(1-6)Glc	Mimaki, 2001
	(IX)	Rha(1-2)[Glc(1-4)Glc(1-4)]Ara	Rha(1-4)Glc(1-6)Glc	Mimaki, 2001
	(XVII)	Rha(1-2)Ara	Rha(1-4)Glc(1-6)Glc	Mimaki, 2001
	Chinensioside A (IX)	Rha(1-2)Ara	-	Glebko, 2002
	Chinensioside B (IX)	Rha(1-2)[Glc(1-4)]Ara	Rha(1-4)Glc(1-6)Glc	Glebko, 2002
	Pulsatilloside A (IX)	Ara	-	Ye, 2002
	Pulsatilloside B (IX)	Rha(1-2)Ara	-	Ye, 2002
	Pulsatilloside D (IX)	Glc(1-3)Ara	Rha(1-4)Glc(1-6)Glc	Ye, 2002
	Pulsatilloside E (IX)	Rha(1-2)[Glc(1-4)]Ara	Rha(1-4)Glc(1-6)Glc	Ye, 2002
	Anemoside B ₄ (IX)	Rha(1-2)Ara	Rha(1-4)Glc(1-6)Glc	Ye, 2002
<i>Pulsatilla koreana</i>	(IX)	Rha(1-2)[Glc(1-4)]Ara	-	Bang, 2005a
	(IX)	Glc(1-3)Rha(1-2)Ara	-	Bang, 2005a
	(IX)	Glc(1-4)Ara	-	Bang, 2005a
	(I)	Glc(1-4)Ara	-	Bang, 2005a
	(I)	Glc(1-3)Rha(1-2)Ara	-	Bang, 2005a
<i>Schefflera divaricata</i>	(I)	Xyl(1-2)GlcA	-	De Tommasi, 1997
	(IX)	Xyl(1-2)[Glc(1-3)]GlcA	-	De Tommasi, 1997
	(IX)	Xyl(1-2)GlcA	-	De Tommasi, 1997
	(IX)	GlcA	-	De Tommasi, 1997

Espèce végétale	Saponine (génine)	Section Sucres		Références
		C-3	C-28	
<i>Schefflera divaricata</i>	(IX)	Glc(1-3)GlcA	-	De Tommasi, 1997
	(XIII)	Xyl(1-2)GlcA	-	De Tommasi, 1997
	(XIII)	Glc(1-3)GlcA	-	De Tommasi, 1997
	(XIII)	GlcA	-	De Tommasi, 1997
<i>Schefflera fagueti</i>	(XV)	Glc(1-3)Rha(1-2)Ara	Rha(1-4)Glc(1-6)Gal	Cioffi, 2003
	(XV)	Rha(1-2)Ara	Rha(1-4)Glc(1-6)Gal	Cioffi, 2003
	(XVI)	Glc(1-3)Rha(1-2)Ara	Rha(1-4)Glc(1-6)Gal	Cioffi, 2003
	(XVI)	Rha(1-2)Ara	Rha(1-4)Glc(1-6)Gal	Cioffi, 2003
<i>Schefflera lucanitha</i>	(I)	Rha(1-2)Glc(1-2)GlcA	-	Taylor, 1994
	(I)	Rha(1-2)Xyl(1-2)GlcA	-	Taylor, 1994
<i>Schefflera octophylla</i>	(IV)	Glc	-	Kitajima, 1989
	(XII)	-	Rha(1-4)Glc(1-6)Glc	Kitajima, 1989
	(IV)	Glc	-	Sung, 1991
	(IV)	Glc	Rha(1-4)Glc(1-6)Glc	Sung, 1991
<i>Schefflera rotundifolia</i>	(I)	Rha(1-2)Ara	Glc	Braca, 2004
	(I)	Ara	Glc	Braca, 2004
<i>Schefflera venulosa</i>	(I)	Glc(1-2)Glc	-	Purohit, 1991
<i>Stenocereus eruca</i>	Erucasaponin A (I)	Rha(1-2)[Rha(1-3)]MeGlcA	Rha	Okazaki, 2007
	Stellatoside B (XVIII)	Xyl(1-2)Glc(1-2)MeGlcA	-	Okazaki, 2007

Quelques constats généraux peuvent être établis à la suite de l'analyse des données colligées dans le tableau 3:

- L'acide bétulinique (I) est l'aglycone le plus souvent retrouvé (23×) suivi de l'acide 23-hydroxybétulinique (IX, 17×), de l'acide 3 α ,11 α -hydroxybétulinique (VI, 5×) et de l'acide 3 α -bétulinique (IV, 4×) ou acide épi-bétulinique.
- Une seule saponine à base de bétulinol (II) a été isolée [Jain *et al.*, 1984]. Il s'agit du bétulinol 3 β -O- β -D-xylopyranoside.
- Les saponines monodesmosidiques portent leur section sucre habituellement en C-3 (29×) plutôt qu'en C-28 (9×).
- La section sucre en position C-28 des bidesmosides (31×) est généralement de nature Rha(1 \rightarrow 4)Glc(1 \rightarrow 6)Glc (24×) tandis que celle en C-3 est plus variée.
- Les saponines de type lupane se retrouvent principalement dans les genres *Schefflera* (23×) et *Pulsatilla* (17×). À l'intérieur de ces genres, la section Rha(1 \rightarrow 2)Ara en position C-3 est récurrente.

Très peu d'études ont rapporté l'activité biologique des saponines de type lupane. En effet, à notre connaissance, seulement quelques articles traitent de l'activité [Just *et al.*, 1998; Yoshizumi *et al.*, 2006], et plus particulièrement de la cytotoxicité [Cioffi *et al.*, 2003; Bang *et al.*, 2005] de ces saponines naturelles. À cet égard, des saponines mono- et bidesmosidiques (**150-155**) isolées des racines de *Pulsatilla chinensis* contenant une génine acide 23-hydroxybétulinique (**156, IX**) ont été testées pour leur activité anticancéreuse *in vitro* [Ye *et al.*, 2002]. Les résultats présentés dans le tableau 4 sous la forme d'IC₅₀ montrent que les saponines monodesmosidiques **150** (pulsatilloside A) et **151** (pulsatilloside B ou anémoside A₃) contenant, respectivement, des sections Arap et Rhap(1→2)Arap sont celles qui inhibent le plus fortement la croissance des lignées cellulaires cancéreuses K-562 (leucémie) et HeLa (cancer de l'utérus) surpassant l'activité des acides bétulinique (**15**) et 23-hydroxybétulinique (**156**). Il est intéressant de noter que le monodesmoside **152** contenant une section sucre en C-28 est la molécule la moins active de cette série. Des études supplémentaires ont établi que les pulsatillosides A (**150**) et B (**151**) sont capables de protéger les cellules PC12 contre l'apoptose induite par le cyanure de sodium et/ou une carence en glucose [Gao *et al.*, 2003].

Tableau 4. Activité anticancéreuse de saponines naturelles isolées de *P. chinensis*

Composé	R ¹	R ²	IC ₅₀ (μM)	
			K-562	HeLa
150	S ¹	H	3,3	6,8
151	S ³	H	7,3	8,4
152	H	S ⁵	41,2	56,4
153	S ³	S ⁵	20,3	18,6
154	S ²	S ⁵	21,0	15,4
155	S ⁴	S ⁵	18,3	14,0
156	H	H	8,6	11,2
15	-	-	12,3	13,2

Des chercheurs italiens ont isolé des saponines triterpéniques de types oléanane et lupane des feuilles de *Schefflera rotundifolia*, une plante utilisée en médecine traditionnelle orientale [Braca *et al.*, 2004]. Parmi ces molécules, deux saponines bidesmosidiques à génine acide bétulinique (**157** et **158**) (Figure 32) ont inhibé la croissance de certaines lignées cellulaires (J774.A1, WEHI-164 et HEK-293). L'étude préliminaire de cytotoxicité a révélé que les saponines de type lupane **157** et **158** sont les constituants les plus actifs isolés de cette plante. Il est à noter que la synthèse de ces saponines a été effectuée dans le cadre de ce projet de doctorat (voir chapitres 3 et 4).

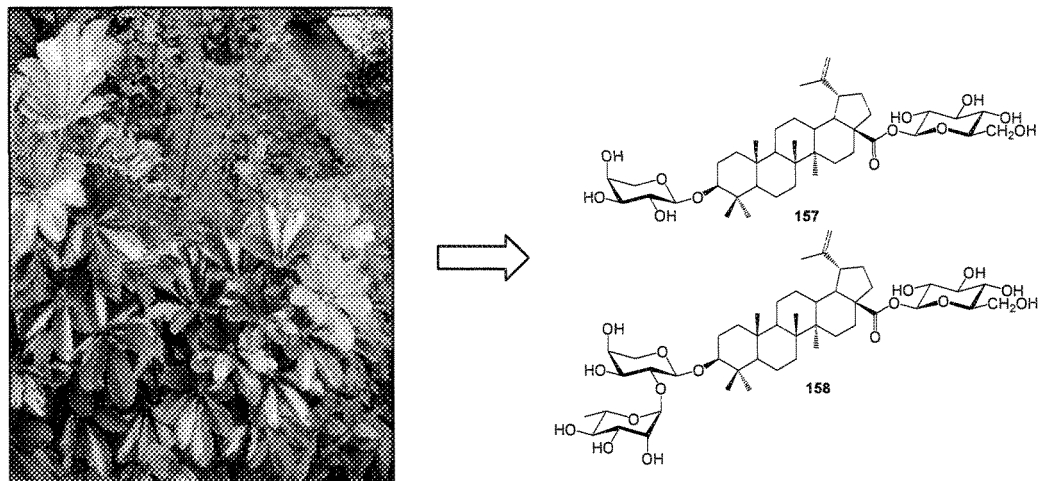


Figure 32. Saponines bidesmosidiques (**157** et **158**) de type lupane isolées de *S. rotundifolia*

2.3.2. Synthèse de Saponines de Type Lupane

2.3.2.1. Groupes Russes

L'une des premières synthèses de glycosides triterpéniques de type lupane a été publiée en 1973 par un groupe de chercheurs de l'académie des sciences de l'ancienne U.R.S.S. [Uvarova *et al.*, 1973]. Plusieurs saponines mono- et bidesmosidiques (**162-167**) à génine bétulinol (**16**) ont ainsi été préparées par l'utilisation des sucres orthoesters peracétylés de type glucose (**160**) et maltose (**161**) en présence de $\text{Hg}(\text{Br})_2$ dans le CH_3NO_2 . Il est pertinent de mentionner que les liaisons glycosidiques étaient de nature β (1,2-*trans*-glycosides) pour toutes les saponines synthétisées peracétylées (Figure 33) comme c'est le cas généralement avec l'utilisation des sucres orthoesters [Levy *et al.*, 2006].

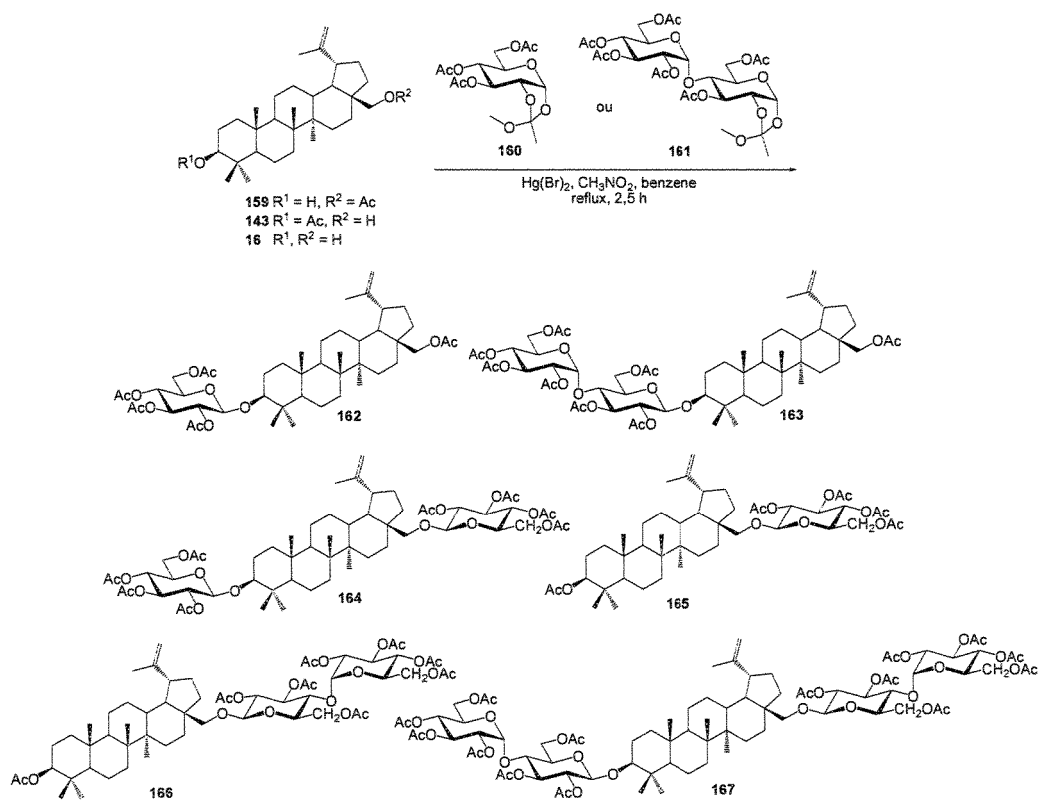


Figure 33. Synthèse de glycosides peracétylés de bétulinol (**162-167**) par la méthode des sucres orthoesters

Quelques années plus tard, les mêmes chercheurs ont rapporté à nouveau la synthèse de 1,2-*trans*-glucosides de bétulinol (**142**, **162**, **164** et **168**) [Uvarova *et al.*, 1980] en utilisant les conditions de Koenigs-Knorr [1901]. Cette fois-ci, le couplage du bétulinol (**16**) avec le sucre bromé **85** catalysé par $Hg(CN)_2$ a permis l'obtention de produits monodesmosidiques minoritaires en C-28 (**168**, 6,5%) et en C-3 (**162**, 29,6%) et d'un bidesmoside majoritaire (**164**, 45,6%). La présence d'un groupement participant acétyle en position 2 du sucre activé **85** était évidemment nécessaire pour la formation de liaisons glycosidiques naturelles de type β (Figure 34).

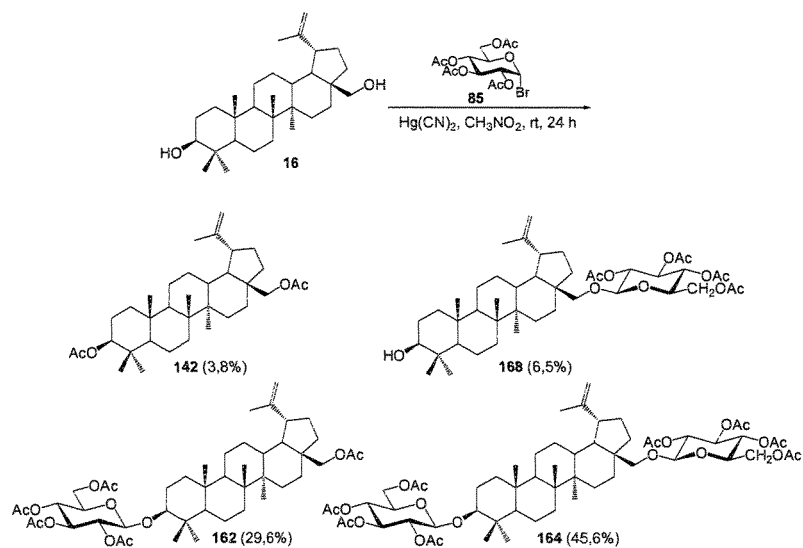


Figure 34. Synthèse de glycosides peracétylés de bétulinol (**142**, **162**, **164** et **168**) par la méthode de Koenigs-Knorr

Flekhter et ses collaborateurs [2000] ont rapporté la synthèse de 2-désoxy- α -L-glycosides de bétulinol (**171** et **172**) via les sucres de type glycols **169** et **170** en conditions de catalyse acide (Figure 35). Après la déprotection des groupements acétyles (KOH/MeOH), les saponines non-naturelles **171** et **172** ont été obtenues avec d'excellents rendements (72-84%, deux étapes) en l'absence d'anomères β et de produits de réarrangements.

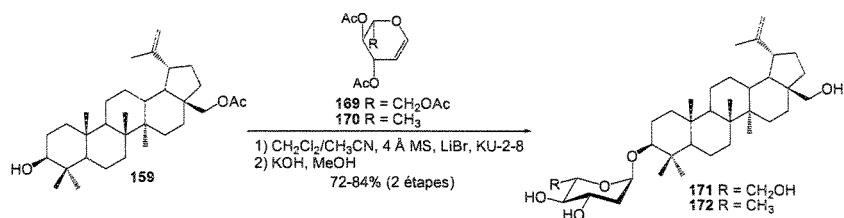


Figure 35. Synthèse de 2-désoxy- α -L-glycosides de bétulinol (**171** et **172**)

Des saponines d'acide bétulinique (**15**) à sections D-glucose ont été préparées par un groupe de chercheurs russes [Samoshina *et al.*, 2003]. Leur méthodologie de synthèse consistait au couplage du triterpène **15** avec le sucre bromé **85** en présence d'une quantité stoechiométrique d'oxyde d'argent (Ag_2O) dans la pyridine (Figure

36). Le C-28 glycoside peracétylé résultant (**173**, 94%) a ensuite été déprotégé en **174** (95%). La glycosylation entre **173** et **85** avec Ag_2O comme promoteur de la réaction a généré le bidesmoside peracétylé **175** (61%) qui a été déprotégé en **176** (95%). L'acide 3 β -O- β -D-glucopyranoside bétulinique (**177**, 74%) a finalement été obtenu après l'hydrolyse basique de la saponine **175**.

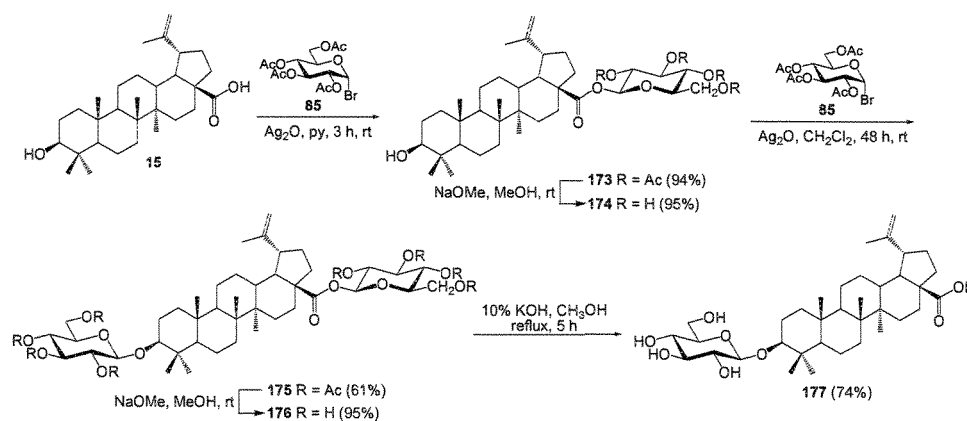


Figure 36. Synthèse de glucosides d'acide bétulinique (**174**, **176** et **177**)

2.3.2.2. Groupes Tchèques

En 1997, Klinitová et ses collaborateurs [1997] de la Charles University de Prague en République Tchèque ont rapporté la préparation d'une série de C-3 et C-28 glycosides triterpéniques de type lupane. En utilisant des conditions standards de glycosylation (sucre bromé **85** et $\text{Hg}(\text{CN})_2$ dans CH_3CN), les chercheurs ont réussi la synthèse du C-3 glycoside de bétulinate de méthyle (**179**, 39%, deux étapes), du C-28 glycoside d'acide bétulinique (**174**, 39%, trois étapes) et du 3,28-bis-glycoside d'acide bétulinique (**176**, 5%, deux étapes) au départ du bétulinate de méthyle (**178**), de l'acide 3-acétyl bétulinique (**145**) et de l'acide bétulinique (**15**), respectivement (Figure 37). Il est à noter que ces conditions réactionnelles dites de Koenigs-Knorr conduisent à la formation du bidesmoside **176** dans un très faible rendement de 5% après deux étapes de synthèse.

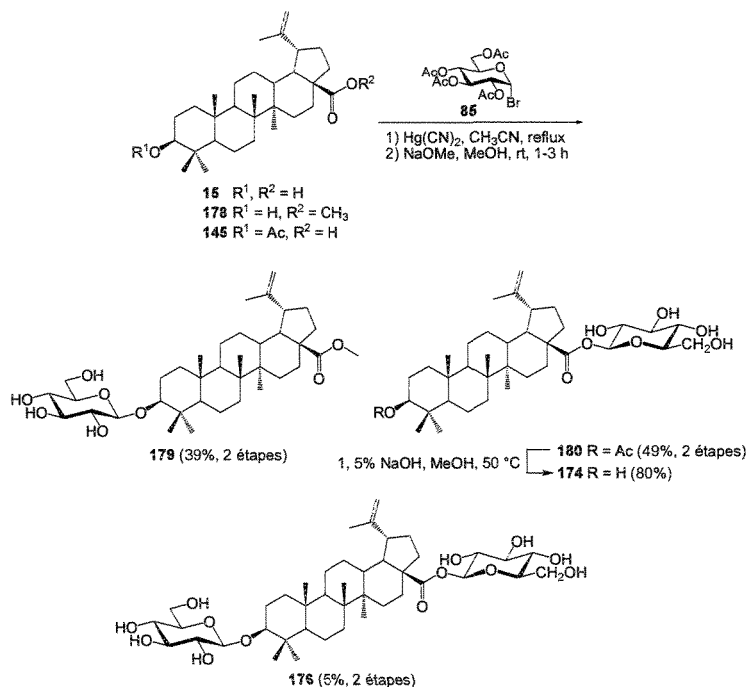


Figure 37. Synthèse de glucosides d'acide bétulinique (**174** et **176**) et de bétulinate de méthyle (**179**)

Récemment, la synthèse de trimannosides 3,6-branchés de lupéol (**17**) et d'acide bétulinique (**15**) a été rapportée dans le journal *Carbohydrate Research* [Cmoch *et al.*, 2008]. Les auteurs stipulent que ce type de sections osidiques pourrait permettre de cibler certaines cellules humaines telles que les macrophages et les cellules dendritiques par l'entremise d'interactions avec des récepteurs protéiques spécifiques au mannose [Pakułski *et al.*, 2005]. Leur voie de synthèse présentée à la figure 38 consistait au couplage du lupéol (**17**) ou de l'acide 3-acétyl bétulinique (**145**) avec le mannose TCA perbenzoylé **181** ou peracétylé **185** en présence du promoteur TMSOTf. Les monodesmosides résultant (**182**, 95%; **186**, 90%) ont ensuite été déprotégés (**183**, 79%; **187**, 90%) et subséquemment couplés aux positions C-3' et C-6' avec le TCA **181**. L'hydrolyse basique (K_2CO_3 , MeOH) des groupements protecteurs a mené à la formation des trimannosides de lupéol (**184**) et d'acide 3-acétyl bétulinique (**188**). Les molécules ont toutes été testées quant à leur capacité à inhiber la croissance de lignées cellulaires cancéreuses humaines. Les résultats ont révélé que les saponines contenant une seule unité osidique (**183** et **187**) exercent des

activités cytotoxiques supérieures à l'acide bétulinique (**15**) et aux trimannosides **186** et **190**.

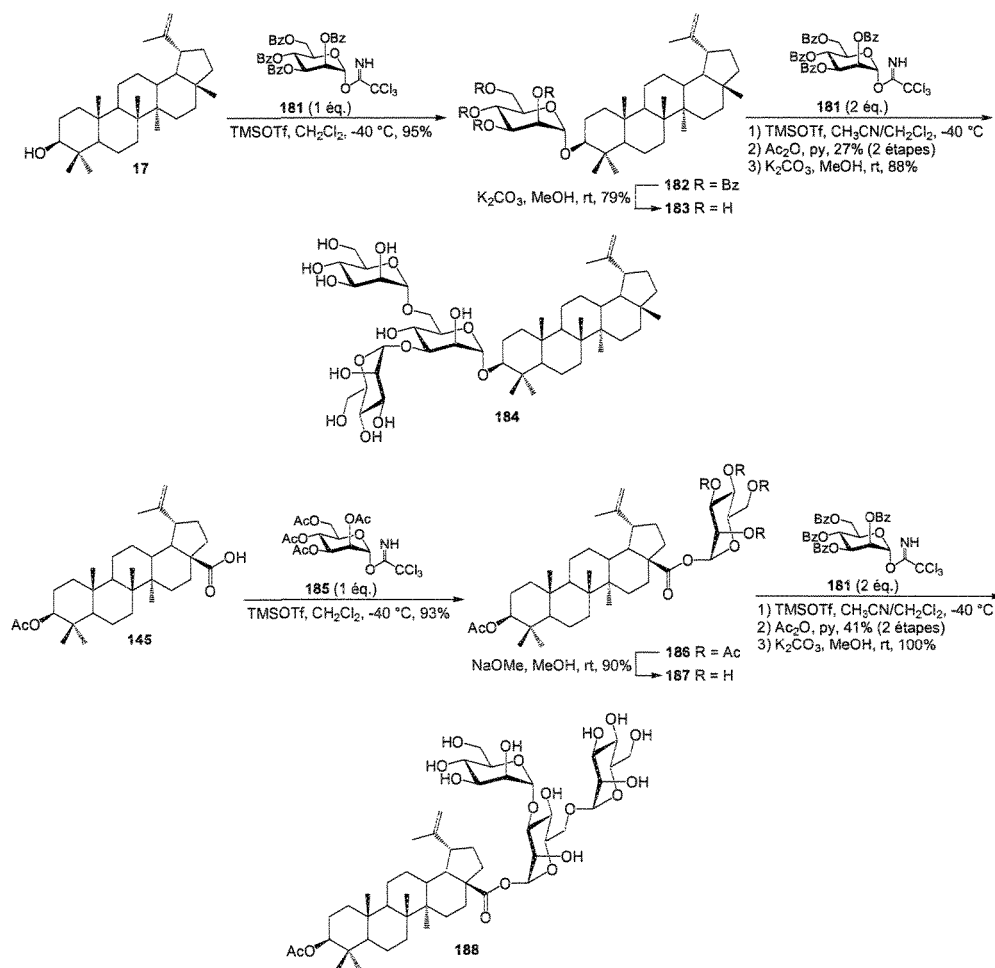


Figure 38. Synthèse de trimannosides 3,6-branchés (**184** et **188**)

2.3.2.3. Autres Groupes

Vers le milieu des années 1990, des chercheurs du laboratoire de Pharmacognosie de l'Université de Reims en France ont publié un court article dans lequel ils décrivent la synthèse d'acyl-glycosides en conditions de transfert de phase [Bliard *et al.*, 1994]. Cette méthodologie qui mène à la formation de 1,2-*trans*-glycosides dans de hauts rendements implique l'utilisation de sucres bromés peracétylés en présence d'un agent catalyseur de transfert de phase (Aliquat 336) dans une solution hétérogène de

$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ 1:1. Selon cette méthode de synthèse, l'acide 28-*O*-2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- β -D-galactopyranosyl bétulinique (**190**) a été préparé sans difficultés avec un excellent rendement de 92% (Figure 39).

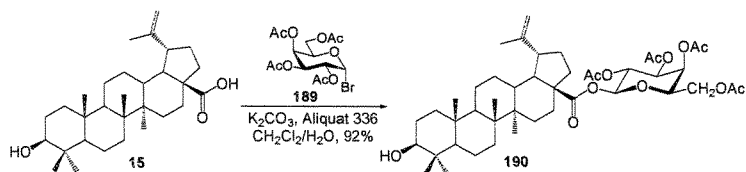


Figure 39. Synthèse d'un C-28 galactoside d'acide bétulinique (**190**) en conditions de transfert de phase

Dans le cadre d'une étude de relations structure-activité anticancéreuse d'une série de dérivés des acides ursolique (**10**) et bétulinique (**15**), des conditions de transfert de phase modifiées ont été appliquées à la synthèse du C-28 glucoside d'acide bétulinique (**174**, Figure 40) [Baglin *et al.*, 2003b]. La saponine obtenue avec un rendement élevé (92%) n'a pas exercé d'activité cytotoxique à la plus haute concentration testée ($\text{IC}_{50} > 500 \mu\text{M}$).

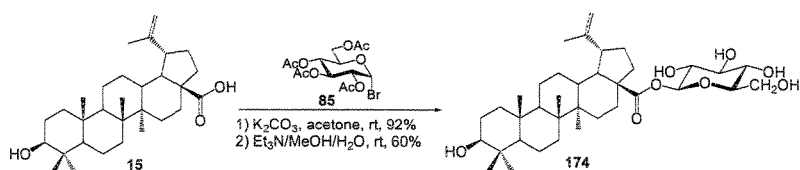


Figure 40. Synthèse du C-28 glucoside d'acide bétulinique (**174**)

La biotransformation de l'acide bétulinique (**15**) par l'action de cellules en suspension du microorganisme *Cunninghamella* NRRL 5695 a été étudiée [Chatterjee *et al.*, 1999]. Après neuf jours d'incubation avec les cellules, le C-28 glucoside **174** a été isolé (0,77%) (Figure 41). Comme dans le précédent cas [Baglin *et al.*, 2003b], les tests de cytotoxicité ont révélé l'absence d'activité anticancéreuse pour ce glycoside ($\text{ED}_{50} > 20 \mu\text{g/mL}$).

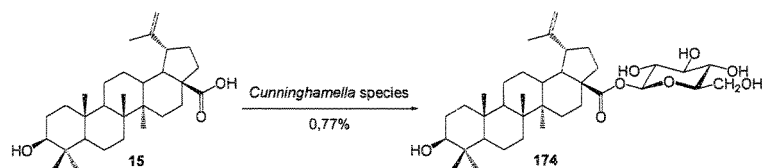


Figure 41. Biotransformation de l'acide bétulinique (15) par *Cunninghamella*

Ohara et ses collaborateurs [1994; 2003] ont synthétisé une série de glucosides linéaires du bétulinol (16) afin d'investiguer les effets de ces saponines sur la germination et la croissance des plantes. Leur approche de synthèse consistait au couplage des sucres bromés peracétylés **85** et **191** avec le 28-acétyl bétulinol (**159**) (Figure 42). Après la déprotection, les glycosides **192** et **193** ont été mis en présence de la cyclodextrine glycosyltransférase (CGTase) de *Bacillus macerans* en tant que donneur d'unités α -glucosyl à l'aide de la cyclodextrine **194**. Ainsi, les saponines **195** à **198** ont été préparées par des réactions de glycosylations enzymatiques successives de **193**. Les relations de structure-activité ont démontré que la longueur de la chaîne osidique semble corrélée avec l'activité inhibitrice de la germination des graines de l'alfalfa (*Medicago sativa*).

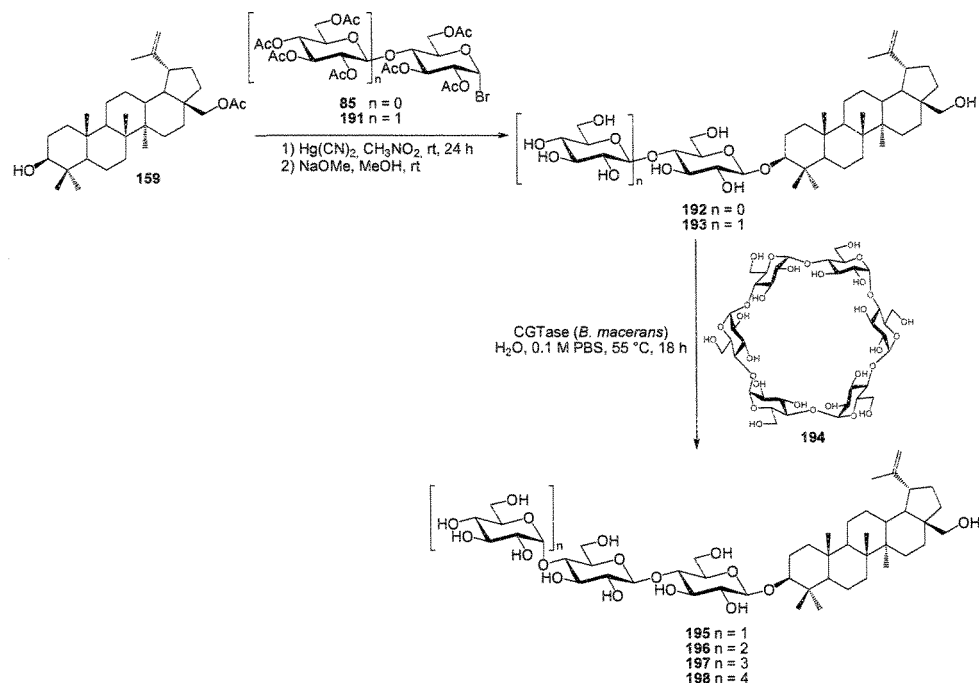


Figure 42. Synthèse de glycosides de bétulinol (192-198) à l'aide de la CGTase

Dernièrement, un article publié dans *Green Chemistry* a montré que, pour la première fois, il était possible de synthétiser des *O*- et *N*-glycosides en utilisant de la fibre de carbone activé (ACF) comme promoteur dans des conditions réactionnelles sans solvant à haute température [Lautrette *et al.*, 2004]. La procédure a été appliquée à la synthèse du ribofuranoside protégé de bétulinol (**201**). Le couplage du dérivé silylé **199** avec le ribofuranose **200** a permis de générer le glycoside **201** dans un rendement de 60% pour une réaction se déroulant pendant 16 heures à 160 °C (Figure 43).

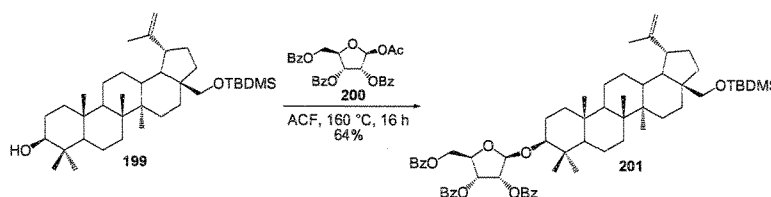


Figure 43. Synthèse du ribofuranoside de bétulinol (**201**) par glycosylation verte

2.3.2.4. Groupe Pichette

Dans le cadre la maîtrise en ressources renouvelables de l'Université du Québec à Chicoutimi, la synthèse de monodesmosides triterpéniques de type lupane et germanicane comportant une seule unité osidique a été entreprise par notre groupe de recherche [Gauthier, 2006b]. Les sucres donneurs D-glucose (**26**), D-galactose (**202**), D-mannose (**181**), D-arabinose (**203**), D-xylose (**92**) et L-rhamnose (**32**) porteurs de groupements benzoyles et activés à la position anomérique par les TCA ont été préparés à l'échelle du gramme (Figure 44). Tel qu'illustré à la figure 45, l'avantage des sucres perbenzoylés au dépend des sucres perbenzylés consiste en la présence d'un groupement carbonyle participant à la position deux ce qui favorise exclusivement la formation de liens glycosidiques naturels 1,2-*trans* [Schmidt, 1994].

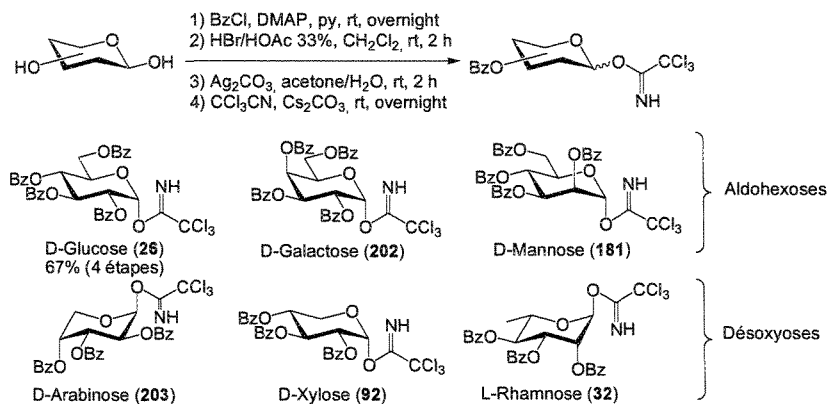


Figure 44. Sucres activés perbenzoylés utilisés pour la synthèse de monodesmosides

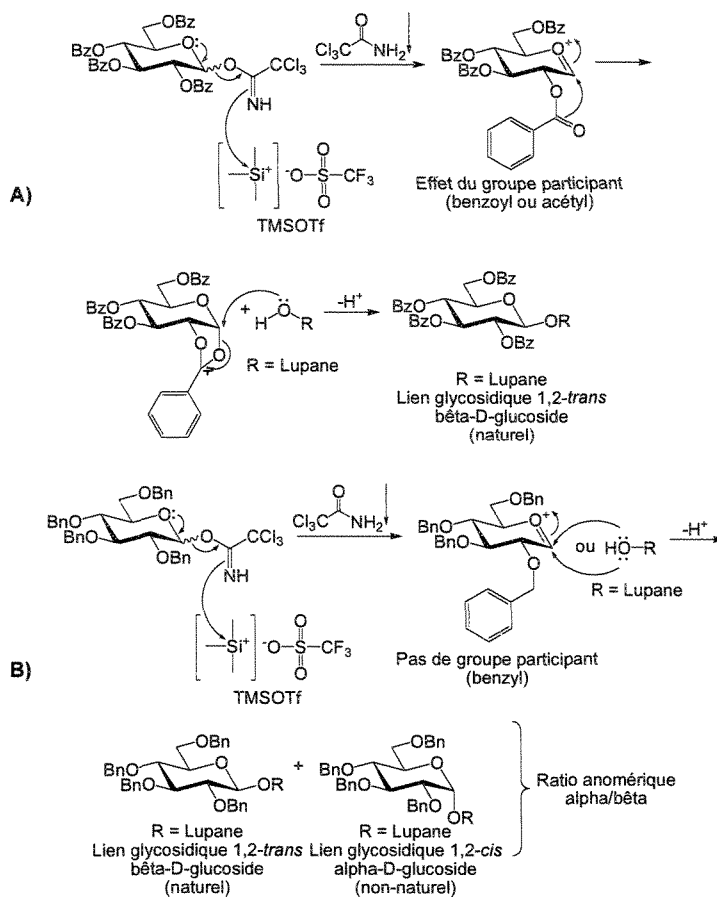


Figure 45. Glycosylation avec (A) ou sans (B) groupements participants

Ces sucres TCA ont été couplés avec différents accepteurs triterpéniques de type lupane (lupéol, bétulinol, acide bétulinique et bétulinate de méthyle) et germanicane (allobétulinol et oxoallobétulinol), dérivés de réarrangement (voir Annexe 2). Par exemple, les glycosides d'acide bétulinique (**205-210**) ont été facilement préparés selon les trois étapes de synthèse schématisées à la figure 46, c'est-à-dire 1) le couplage de l'allyle bétulinate (**204**) avec les TCA catalysé par l'acide de Lewis TMSOTf, 2) l'hydrolyse basique des groupements benzoyles, et 3) le clivage de l'allyle à l'aide de $\text{Pd}^0(\text{PPh}_3)_4$ [Gauthier *et al.*, 2006a; Thibeault *et al.*, 2007].

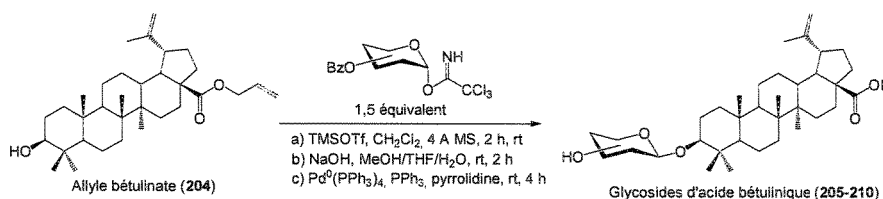


Figure 46. Synthèse des glycosides d'acide bétulinique (**205-210**)

Au total, plus d'une quarantaine de glycosides monodesmosidiques et triterpènes ont été évalués concernant leur capacité à inhiber la croissance des cellules cancéreuses en culture et les relations de structure-activité ont été étudiées (voir Annexes 3 et 4). La figure 47 présente les principaux résultats obtenus à la suite de cette étude. Ainsi, pour la série bétulinol (**16**), l'ajout d'une section osidique à la position C-3 ou C-28 a eu pour effet de diminuer drastiquement l'activité anticancéreuse, et ce, même dans le cas de la saponine naturelle **211** [Jain *et al.*, 1984]. La seule exception concerne le bétulinol 3β - O - α -D-mannopyranoside (**212**) qui a exercé une forte cytotoxicité sur la lignée cellulaire humaine du carcinome du poumon (A549) avec une valeur d' IC_{50} de $7,3 \mu\text{M}$. En revanche, pour les glycosides d'acide bétulinique, les résultats obtenus sont très prometteurs. En effet, l'ajout de sections α -D-arabinopyranose ou α -L-rhamnopyranose en position C-3 de l'acide bétulinique (**15**) a entraîné des gains significatifs au niveau de la cytotoxicité envers les cellules cancéreuses humaines du côlon (DLD-1) et du poumon (A549). L'acide 3β - O - α -L-rhamnopyranoside bétulinique (**210**), une saponine naturelle [Tiwari *et al.*, 1980b], a montré une sélectivité jusqu'à 12 fois supérieure à inhiber la croissance des cellules cancéreuses

par rapport aux cellules saines du fibroblaste humain (WS1). En somme, ces résultats qui ont fait l'objet d'une demande de brevet [Pichette *et al.*, 2008a] indiquent clairement que les glycosides triterpéniques représentent une classe prometteuse d'agents anticancéreux d'origine naturelle et nécessitent donc des investigations supplémentaires.

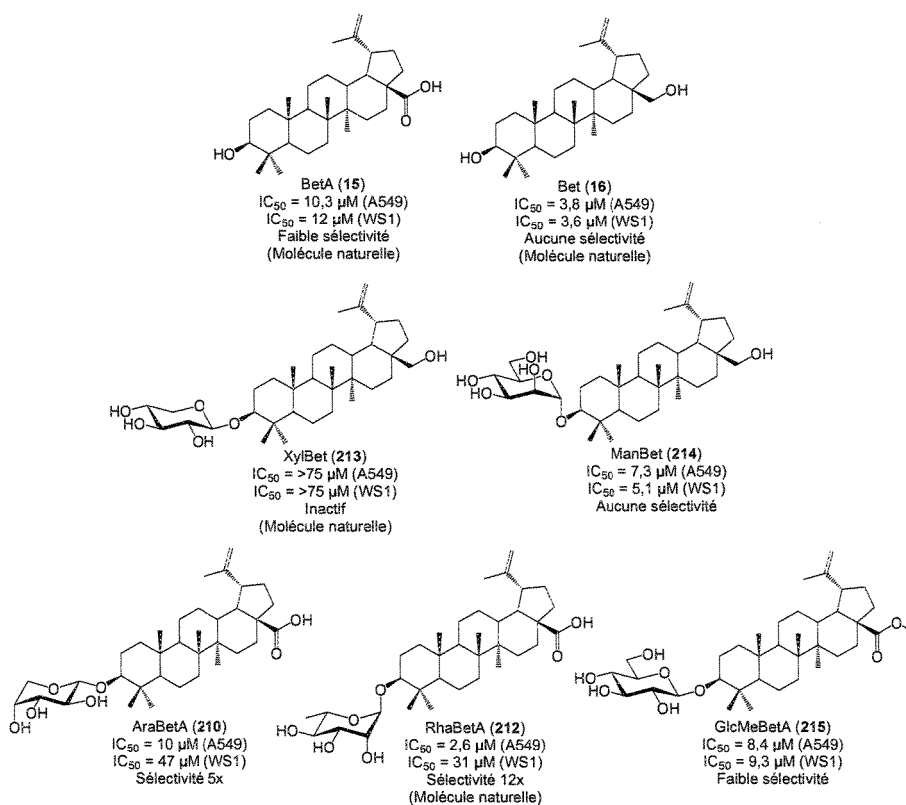


Figure 47. Relations structure-activité des glycosides triterpéniques de type lupane

CHAPITRE 3

**SYNTHESIS OF TWO NATURAL BETULINIC ACID SAPONINS
CONTAINING α -L-RHAMNOPYRANOSYL-(1 \rightarrow 2)- α -L-
ARABINOPYRANOSE AND THEIR ANALOGUES**

**Charles Gauthier, Jean Legault, Serge Lavoie, Simon Rondeau, Samuel
Tremblay and André Pichette***

*Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales, Département des
Sciences Fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, 555 boul. de
l'Université, Chicoutimi (Québec), Canada, G7H 2B1*

(Article publié dans *Tetrahedron* 2008, 64, 7386-7399)

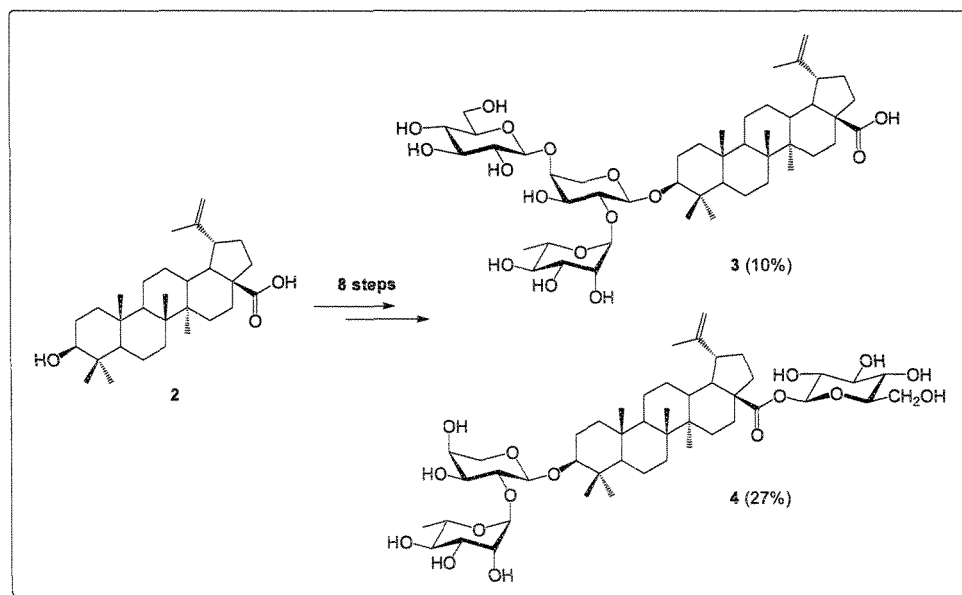
Keywords: Betulinic acid; lupane-type saponin; α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranose; anticancer.

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

CONTRIBUTION DES AUTEURS

L'auteur principal de cet article (C. Gauthier) a rédigé toutes les sections du manuscrit en plus d'effectuer la synthèse et la purification de tous les nouveaux composés. S. Lavoie a contribué à l'analyse RMN détaillée des composés. S. Rondeau et S. Tremblay ont participé, dans le cadre d'un stage d'été, à la synthèse organique et à la purification des composés. J. Legault et A. Pichette sont, respectivement, les co-directeur et directeur du présent projet de thèse.

RÉSUMÉ GRAPHIQUE



RÉSUMÉ

Cet article décrit la première semi-synthèse de deux saponines naturelles à base d'acide bétulinique contenant une section α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside à la position C-3. L'acide bétulinique 3β -O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]- α -L-arabinopyranoside (**3**) isolé des racines de *Pulsatilla koreana* et le 28-O- β -D-glucopyranosyl acide bétulinique 3β -O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside (**4**) isolé des feuilles de *Schefflera rotundifolia* ont été facilement synthétisés à l'aide d'une approche de glycosylations successives dans des rendements globaux de 10% et 27%, respectivement. La voie de synthèse développée fait intervenir huit étapes linéaires en utilisant au départ l'acide bétulinique ainsi que les monosaccharides L-arabinose, L-rhamnose et D-glucose, produits commercialement disponibles. La synthèse d'analogues glycosylés de bétulinol et d'acide bétulinique contenant une section α -L-arabinose est également rapportée dans cet article. Les données physico-chimiques (RMN ^1H , ^{13}C , HR-ESI-MS, $[\alpha]_{\text{D}}$, etc.) mesurées pour la saponine **3** concordait avec celles de la littérature tandis que celles de la saponine **4** ne concordait pas. L'analyse RMN ^1H à haut champ (700 MHz) a confirmé la structure de la saponine synthétique **4**. De plus, la faible valeur des constantes de couplage ($J < 5.4$ Hz) pour les sections α -L-arabinopyranose des saponines synthétiques **4**, **23a** et **23b** semble indiquer une mobilité conformationnelle élevée oscillant entre les conformères chaises $^4\text{C}_1$ et $^1\text{C}_4$. Ces résultats pavent la voie à la préparation de nombreux dérivés de saponines de type lupane en tant qu'agents thérapeutiques potentiels.

ABSTRACT

A concise synthesis of naturally occurring betulinic acid saponins bearing an α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside moiety at the C-3 position is described. Betulinic acid 3 β -O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]- α -L-arabinopyranoside isolated from *Pulsatilla koreana* and 28-O- β -D-glucopyranosyl betulinic acid 3 β -O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside isolated from *Schefflera rotundifolia* were easily synthesized for the first time using a stepwise glycosylation approach. The overall syntheses involved eight linear steps starting from allyl betulinate and commercially available L-arabinose, L-rhamnose and D-glucose. The syntheses of betulin and betulinic acid O-glycoside analogues containing an α -L-arabinose moiety are also reported. These results open the way to the synthesis of various lupane-type saponin derivatives as potentially bioactive compounds.

INTRODUCTION

Natural products (NPs) have attracted increased attention over the last century as an important source of new drug leads for the pharmaceutical industry.¹⁻⁴ In the domain of cancer research, 47% of antitumour compounds approved from 1940 to 2006 are either NPs or their semi-synthetic derivatives.⁵ Saponins are a specific class of NPs widely distributed in the plant kingdom, which consist of a triterpenoid or steroid skeleton bearing one or more sugar chains.⁶ They exhibit numerous pharmacological and biological properties such as anti-inflammatory,⁷ haemolytic,⁸ cytotoxic and antitumour⁹ activities. Since many commonly used traditional Chinese drugs are rich in saponins,¹⁰ some authors considered them responsible along with polyphenols for the majority of biological effects observed in the Chinese medical literature.¹¹ However, the isolation of saponins from plant extracts is often a long and fastidious process and usually only small amounts of products are obtained in a pure and homogeneous form.¹² Therefore, chemical syntheses are needed and appear to be a realistic way to gain access to a broad library of saponin glycoforms in order to study the structure-activity relationships (SARs) of this important class of NPs.¹³

Betulin (**1**) and its C-28 carboxylic derivative betulinic acid (**2**) (Figure 1) are naturally occurring pentacyclic lupane-type triterpenoids that possess multiple pharmacological activities.^{14,15} Betulinic acid (**2**) has the ability to inhibit the growth of various cancerous cell lines *in vitro* without affecting normal cells.¹⁶ The *in vivo* antitumour activity of betulinic acid (**2**) was also confirmed whereas no other toxicity was observed on tumour-bearing mice at doses of 500 mg/kg body weight after intraperitoneal injections.^{17,18} Thus, due to the selective cytotoxicity and favourable therapeutic index, which are in contrast with the majority of antitumor agents actually used in chemotherapy, betulinic acid (**2**) is considered a promising anticancer agent.^{19,20} Nonetheless, further clinical development of betulin (**1**), betulinic acid (**2**) and lupane-type analogues is strongly hampered since they are virtually insoluble in water (0.02 µg/mL for **2**)^{21,22} and possess high partition coefficient values (log P>6) which complicate the preparation of injectable formulations for biological assays and decrease their bioavailability in the

organism.²³ The introduction of polar groups at either C-3 or C-28 positions such as phthalates,²⁴ amino acids^{25,26} or sugar moieties^{27,28} is an interesting avenue to increase the hydrosolubility of lupane-type triterpenoids **1** and **2**. Recently, our preliminary SAR studies have shown that adding an α -L-rhamnopyranose moiety at the C-3 position of **2** resulted in a significant increase of both the water solubility and the *in vitro* cytotoxic activity against human lung carcinoma (A549) and human colon adenocarcinoma (DLD-1) cancer cell lines.²⁷ Therefore, it was postulated that betulinic acid saponins represent an interesting class of potent anticancer agents and require additional investigations.

Lupane-type saponins having betulin (**1**) or betulinic acid (**2**) as aglycones are rarely isolated from a natural source²⁹⁻³¹ and their chemical syntheses are very scarce in the literature.^{27,28,32-37} Betulinic acid 3 β -*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]- α -L-arabinopyranoside (**3**) (Figure 1) is a naturally occurring monodesmosidic saponin isolated from the roots of *Pulsatilla koreana*, which is a plant widely used in Chinese traditional medicine for the treatment of malaria, amoebic dysentery and various cancers.³¹ Saponin **3** exhibited moderate *in vitro* cytotoxicity against A549, SK-OV-3, SK-MEL-2 and HCT15 cancer cell lines and significant *in vivo* anticancer activity against BDF1 mice bearing Lewis lung carcinoma (LLC).^{38,39} The particular trisaccharide chain at the C-3 position of saponin **3** has been shown to be a nontoxic moiety which would increase the activity and water solubility once conjugated to NPs.⁴⁰ Another similar naturally occurring bidesmosidic saponin, 28-*O*- β -D-glucopyranosyl betulinic acid 3 β -*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside (**4**) (Figure 1) isolated from the aerial parts of *Schefflera rotundifolia*, a plant used as folk remedies for the treatment of pain, rheumatic arthritis and lumbago in Asian countries, exhibited noticeable antiproliferative activity against J774.A1, WEHI-164 and HEK-293 cell lines (IC₅₀ 0.32-0.79 μ M).³⁰ Furthermore, betulinic acid and 23-hydroxybetulinic acid saponins bearing an α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranose moiety at the C-3 position have already been isolated from *P. chinensis*, which is one of the most well-known plants used in traditional Chinese medicine.^{29,41-43} Hence, as part of our

efforts to prepare lupane-type saponins as anticancer agents,^{27,28} this report describes the first synthesis of two naturally occurring betulinic acid saponins (**3** and **4**). The syntheses of betulin (**15a**, **15b** and **23a**) and betulinic acid (**19a**, **19b** and **23b**) saponin analogues containing α -L-arabinose are also reported.

RESULTS AND DISCUSSION

To our knowledge, the synthesis of betulinic acid saponins bearing a unique α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl moiety at the C-3 position such as natural saponins **3** and **4** has never been reported until now. Two general synthetic approaches exist in the literature for this particular type of intersugar linkage.¹³ One strategy consists in preparing the disaccharide donor followed by coupling with the triterpene or steroid aglycone.^{44,45} Since, in this case, the arabinose residue does not contain a neighbouring participating group at the C-2 position, the main inconvenience of this convergent glycosylation is the formation of an α/β anomeric mixture which complicates the further purification of intermediates.^{13,44,45} In this work, we adopted the stepwise glycosylation approach in which the arabinose residue containing a C-2 neighbouring participating group was first coupled with the aglycone. This linear strategy was shown to form a stereospecific 1,2-*trans* glycosidic bond¹³ usually found in the linkage of natural triterpenoid saponins.¹² Moreover, stepwise extension of the sugar chain allows the preparation of a great variety of analogues by simply altering the monosaccharide donors.⁴⁶ Thus, such an approach to provide saponin glycoforms may be of further interest for studies regarding the SAR of natural and non-natural saponins and their development as pharmaceutical or biological agents.

Saponins **3** and **4** can be retrosynthetically (Figure 2) disconnected into distinct fragments: the natural lupane-type betulinic acid (**2**) and the commercially available monosaccharides L-arabinose, L-rhamnose and D-glucose. As shown in Figure 2, the benzoyl participating groups were selected as protecting groups for the sugar donors **5-8** since they avoid the formation of *trans*-esterification products^{47,48} in comparison

with the acetyl groups and can be easily removed under alkaline conditions without hydrolysis of the C-28 ester in the aglycone.⁴⁹ In addition, the anomeric position of sugar donors **5**, **6** and **8** was activated by the trichloroacetimidate (TCA) group which was first devised by R.R. Schmidt in the early 1980s⁵⁰ and shown to be ideal donors for the coupling with steroids and triterpenoids using various Lewis acids as promoters such as trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (TMSOTf) or boron trifluoride diethyl etherate (BF₃•OEt₂).⁵¹ While TCA donors are usually used for the preparation of ether-glycosides,^{13,47} we planned to employ the sugar donor bromide **7**⁵² in order to selectively glycosylate the C-28 carboxylic acid function and produce the ester-glycoside at a later stage of the synthesis after assembly of the disaccharide.⁵³

As depicted in Scheme 1, the starting point of our synthesis consisted in the preparation of the known 2,3,4-tri-*O*-benzoyl- β -L-arabinopyranosyl trichloroacetimidate (**8**).^{51,54} Accordingly, the commercial L-arabinose was subjected to perbenzoylation with benzoyl chloride (BzCl) using a catalytic amount of 4-dimethylaminopyridine (DMAP) at 60 °C. The crude residue was then brominated (33% HBr/HOAc) at the anomeric position, hydrolyzed with silver carbonate (Ag₂CO₃) in an acetone/water 20:1 solution and activated using trichloroacetonitrile (CCl₃CN) and 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) to furnish **8** in 38% yield after four steps. However, two anomeric protons signals at δ 6.67 ppm (s) and 6.82 ppm (d, $J_{1,2}$ 3.0 Hz) were visualized in the ¹H NMR spectrum indicating that, unexpectedly, the resulting product was an inseparable mixture of **8** and 2,3,5-tri-*O*-benzoyl- α -L-arabinofuranosyl trichloroacetimidate (**9**)⁵⁵ (R_f 0.67, hexanes/EtOAc 3:1) in a 5:1 ratio. The strong HMBC cross-peaks between the proton H-1 (δ 6.67 ppm) and the carbon C-4 (δ 84.3 ppm) confirmed the presence of the TCA **9** in the mixture. It was further postulated that the furanosyl form of the arabinose residue was produced during the benzoylation step since the conversion of pyranose to furanose in hot pyridine is not unprecedented.⁵⁶ To confirm this hypothesis, in a separate experiment, L-arabinose was perbenzoylated under the previously mentioned conditions but keeping the temperature under 25 °C throughout the

overnight reaction to afford 1,2,3,4-tetra-*O*-benzoyl- β -L-arabinopyranose (**10**, 91%) along with 1,2,3,5-tetra-*O*-benzoyl- α -L-arabinofuranose (**11**)⁵⁶ in only 1% yield. This time, the purification by silica gel (SiO₂) column chromatography allowed the separation because both products **10** and **11** presented a significant difference in their retention factors according to TLC (hexanes/EtOAc 3:1). Afterwards, **10** was brominated and hydrolyzed to furnish **12** (73%, two steps) which was activated with CCl₃CN and DBU to yield **8** (80%) as a pure β -anomeric form without any trace of **9**.

With TCA sugar donor **8** in hand, the next task was its linkage to the 3-OH of the lupane core of betulin (**1**) and betulinic acid (**2**). As previously described, pure **1** (>95%, GC-MS) was obtained by exhaustive extractions in dichloromethane (CH₂Cl₂) of the external bark of *Betula papyrifera* followed by recrystallization.²⁸ The natural carboxylic derivative **2** was then synthesized from **1** following known methodologies.²⁸ Here, the choice of the protecting groups at the C-28 position of triterpenoids **1** and **2** was crucial for the synthetic strategy since benzoyl groups have to be removed under basic conditions without affecting this position. Thus, as revealed in Scheme 2, we planned to temporarily protect the C-28 carboxylic acid position of betulinic acid (**2**) with an allyl ester as already reported by our laboratory in an earlier publication.²⁷ In addition, betulin (**1**) was treated with *tert*-butyldiphenylsilyl chloride (TBDPSCI) in the presence of imidazole and DMAP in refluxing tetrahydrofuran (THF) to yield the new compound **13** (90%) protected at the C-28 primary alcohol position by the most robust among silyl groups.⁵⁷ The regioselectivity of the silylation reaction was confirmed from the upfield shift in the ¹H NMR signal of the proton H-28 (δ 3.81 ppm in **1** to 3.68 ppm in **13**). For the introduction of the arabinose moiety, we chose to use the mixture of TCA donors **8** and **9** in order to obtain both arabinopyranoside and arabinofuranoside saponins which could be of further interest for SAR investigations. Indeed, although the isolation of natural saponins bearing an α -L-arabinofuranosyl residue was already reported,^{58,59} studies regarding their synthesis are scarce.⁶⁰⁻⁶² Consequently, according to Scheme 2, coupling of the acceptor **13** with a mixture of donors **8** and **9**

under the catalytic promotion of TMSOTf in dry CH₂Cl₂ followed by subsequent removal of benzoyl groups using 0.25 N NaOH in a solution of MeOH/THF/H₂O 1:2:1 afforded the C-28 protected betulin 3 β -*O*- α -L-arabinopyranoside **16a** (84%, two steps) along with the 3 β -*O*- α -L-arabinofuranoside **16b** (13%, two steps). Moreover, similar treatment of acceptor **17**, i.e. coupling with donors **8** and **9** and deprotection of the benzoyl groups, furnished allyl betulinate 3 β -*O*- α -L-arabinopyranoside (**18a**, 67%, two steps) together with the 3 β -*O*- α -L-arabinofuranoside **18b** (11%, two steps). The non-natural betulinic acid saponins **19a** and **19b** were obtained in good yields (66% and 71%, respectively) by the subsequent deprotection of the allylic ester in **18a** and **18b** using freshly prepared tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) [Pd⁰(PPh₃)₄], triphenylphosphine (PPh₃) and pyrrolidine in dry THF.⁴⁴ On the other hand, the overnight desilylation of **16a** and **16b** by the action of 1 M tetrabutylammonium fluoride (TBAF) in HOAc 1:1 under reflux⁵⁷ was sluggish affording the target saponins **15a** and **15b** in unoptimized 42% and 37% yields, respectively. Thus, in order to increase the overall yields, the known acceptor 28-acetyl betulin (**14**)²⁷ was coupled with the donors **8** and **9** in a separate experiment and deprotected using the above mentioned methodology to access **15a** (73%, two steps) and **15b** (15%, two steps). As expected, the coupling constant data on the ¹H NMR spectra confirmed the α -anomeric configuration of the glycosidic linkage for all saponins (Arap, d, $J_{1,2}$ 6.1-6.5 Hz, H-1'; Araf, br s, H-1').

In order to achieve the Rhap(1 \rightarrow 2)Arap intersugar linkage, the synthesis started with the regioselective protection of 3'- and 4'-OH of the arabinose moiety (Scheme 3). Accordingly, the treatment of **16a** under the catalytic action of pyridinium *p*-toluenesulfonate (PPTs) in conjunction with 2,2-dimethoxypropane (2,2-DMP)⁴⁸ afforded the isopropylidenedated glycoside **20a** in 60% yield. The treatment of the arabinoside **18a** under similar reaction conditions furnished **20b** (74%). We first attempted to glycosylate the equatorial 2'-OH of **20b** with the known 2,3,4-tri-*O*-benzoyl- α -L-rhamnopyranosyl trichloroacetimidate (**6**)²⁷ using TMSOTf as the promoter at -10 °C to room temperature. Unfortunately, the reaction was sluggish providing the target disaccharide glycoside **21b** in an unsatisfactory 22% yield. One

possible explanation for the moderate yield was the rupture of the isopropylidene group which led to the formation of a complex mixture of products.⁶³ Thus, by modifying the reaction conditions, it was found that the sugar donor **6** could be coupled with the acceptor **20b** under the promotion of the Lewis acid $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ in CH_2Cl_2 at a cryogenic temperature of $-78\text{ }^\circ\text{C}$ in a nearly quantitative yield (99%). Glycosylation of the acceptor **20a** with **6** using the same conditions proceeded smoothly to give the protected disaccharide saponin **21a** in a good yield (78%). Desilylation of **21a** (1 M TBAF/HOAc 1:1, THF, reflux, overnight) and deallylation of **21b** [$\text{Pd}^0(\text{PPh}_3)_4$, PPh_3 , pyrrolidine, THF, room temperature] were then performed under standard experimental conditions to provide C-28 deprotected derivatives **22a** (72%) and **22b** (85%), respectively. The non-natural betulin and betulinic acid saponins **23a** and **23b** bearing an α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl moiety at the C-3 position were successfully obtained after the deprotection of the isopropylidene group using *p*-toluenesulfonic acid monohydrate ($\text{TsOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$) in a dry $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1:2 solution⁶³ followed by removal of the benzoyl groups (NaOH , $\text{MeOH}/\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ 1:2:1) in 84% and 61% yields, respectively, over two steps. As expected, regarding saponins **23a** and **23b**, the two anomeric proton signals on the ^1H NMR spectra indicated the α -anomeric configuration of the rhamnopyranosyl (δ 6.19 ppm, br s, H-1" for **23a**; δ 5.10 ppm, d, $J_{1,2}$ 1.1 Hz, H-1" for **23b**) and arabinopyranosyl (δ 4.94 ppm, d, $J_{1,2}$ 5.4 Hz, H-1' for **23a**; δ 4.54 ppm, d, $J_{1,2}$ 4.6 Hz, H-1' for **23b**) moieties which correspond to the natural 1,2-*trans* glycosidic linkage.⁶⁴ Moreover, the HMBC correlations between the proton H-1" of the rhamnose moiety and the carbon C-2' of the arabinose (δ 76.4 ppm for **23a**; δ 76.8 ppm for **23b**) clearly proved the (1 \rightarrow 2) intersugar linkage.

At this stage of the synthesis, we wished to prepare the natural betulinic acid saponin **3** starting from the fully protected derivative **21b**. According to Scheme 4, the deisopropylidenation was achieved by treatment of **21b** with $\text{TsOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.7 equiv) in a dry $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1:2 solution to afford **24** in 70% yield. Surprisingly, the ^1H NMR spectrum of **24** showed that, once the isopropylidene was removed, the arabinopyranosyl moiety underwent a ring-flipping to adopt preferentially the $^1\text{C}_4$

chair conformation rather than the usual 4C_1 one.⁴⁶ Indeed, the coupling constant of the proton H-1' was relatively small ($J_{1,2}$ 3.3 Hz) in comparison with **21b** ($J_{1,2}$ 7.5 Hz). Recently, this unusual 1C_4 chair conformation was reported in the literature for saponins containing an α -L-arabinopyranose moiety with a bulky group at the C-2'.^{44-46,65} In the 1C_4 conformation, the 4'-OH is in the equatorial position while the 3'-OH is in the axial position. Since it is known that the equatorial hydroxyl groups are more reactive than the axial ones,⁶⁶ we planned to directly glycosylate this position in order to avoid tedious protection-deprotection reactions which would increase the number of steps of the synthesis.^{40,63} Therefore, as shown in Scheme 4, the acceptor **24** was coupled with the known donor 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- α -D-glucopyranosyl trichloroacetimidate (**5**)²⁷ under the promotion of TMSOTf (0.1 equiv) in CH_2Cl_2 at low temperature (-10 °C) to provide the desired protected **25** in 50% corrected yield along with the unreacted **24** (15%). The regioselectivity of this reaction was clearly proved by 2D NMR HMBC analyses which showed a strong correlation between the proton H-1''' of the glucopyranose (δ 5.12 ppm, d, $J_{1,2}$ 7.9 Hz) and the carbon C-4' of the arabinose (δ 76.0 ppm). It is worth noting that the arabinose moiety of the protected saponin **25** adopted the unusual 1C_4 chair conformation as revealed by the small coupling constant of the proton H-1' (δ 4.65 ppm, d, $J_{1,2}$ 3.8 Hz). Subsequent removal of the allyl and benzoyl groups of protected derivative **25** using the above mentioned methodology afforded the natural betulinic acid saponin **3** (60%, two steps) in which the arabinose residue retrieved the typical 4C_1 conformation (δ 4.79 ppm, d, $J_{1,2}$ 6.1 Hz, H-1'). The overall yield for the synthesis was 10% over eight linear steps from allyl betulinate (**17**). The physical and analytical data (1H NMR, ${}^{13}C$ NMR and $[\alpha]^{25}_D$) of **3** were all consistent with those reported for the natural product isolated from the roots of *P. koreana*.³¹

The last step of our work was to incorporate a glucopyranosyl moiety at the C-28 position of **22b** with the aim of synthesizing the natural betulinic acid saponin **4**. As depicted in Scheme 5, the free carboxylic acid derivative **22b** was coupled with the known sugar donor 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- α -D-glucopyranosyl bromide (**7**)⁵² under phase-transfer conditions⁶⁷ using potassium carbonate (K_2CO_3) and

tetrabutylammonium bromide (Bu_4NBr) in a $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ 1:1 solution to give the fully protected derivative **26** (78%). Modifying the reaction conditions such as using the TCA sugar donor **5** in conjunction with TMSOTf or $\text{BF}_3\cdot\text{OEt}_2$ as the promoters did not increase the yield and led to a complex mixture of rearrangement products (data not shown). As expected, the strong HMBC correlation between the proton H-1''' of the glucopyranose (δ 6.03 ppm, d, $J_{1,2}$ 9.7 Hz) and the carbon C-28 of the aglycone (δ 174.1 ppm) revealed that the reaction took place at the C-28 carboxylic acid position. The target natural betulinic acid saponin **4** was finally obtained after the removal of isopropylidene ($\text{TsOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$, dry $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1:2) and benzoyl groups (NaOH , $\text{MeOH}/\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ 1:2:1) in an excellent 82% yield (two steps). The overall yield for the synthesis was 27% over eight linear steps from allyl betulinate (**17**). Surprisingly, it was found that the physical and analytical data (^1H NMR, ^{13}C NMR and $[\alpha]_D^{25}$) of **4** were not consistent with those reported for the natural product isolated from the aerial part of *S. rotundifolia*.³⁰ High-resolution electrospray ionization mass spectra (HR-ESI-MS) and extensive 1D and 2D NMR analyses (^1H , ^{13}C , DEPT-135, COSY, HSQC, HMBC, *J*-resolved, TOCSY, NOESY) on a 700 MHz NMR equipped with a cryogenic probe further proved that the structure of the synthetic saponin **4** was correct (Figure 3).

The ^1H NMR spectra of saponin **4** showed that the coupling constant of the proton H-1' (δ 4.53 ppm, d, $J_{1,2}$ 4.6 Hz) in the arabinopyranose moiety was not characteristic of the standard $^4\text{C}_1$ conformation (δ 4.79 ppm, d, $J_{1,2}$ 6.1 Hz, H-1' for **3**). This particularity was also observed for saponins **23a** and **23b** bearing the same disaccharide residue at the C-3 position (δ 4.52 ppm, d, $J_{1,2}$ 4.6 Hz, H-1' in MeOD). In the course of this work, regarding the preparation of the sugar donor **8**, we found that using K_2CO_3 as a base instead of DBU led to the preferential formation of the known 2,3,4-tri-*O*-benzoyl- α -L-arabinopyranosyl trichloroacetimidate- $^1\text{C}_4$ (**27**)⁴⁴ (Table 1). The proton H-1' of **27** was visualized like a broad singlet on the ^1H NMR spectrum (δ 6.33 ppm) as already reported in the literature for arabinose,^{44-46,52,65} xylose^{68,69} and fucose⁶⁵ adopting this unusual $^1\text{C}_4$ conformation. Hence, a $J_{1,2}$ coupling constant midway between $^4\text{C}_1$ and $^1\text{C}_4$ conformation suggested that the

arabinose residue in saponins **4**, **23a** and **23b** were in a high conformational mobility.^{70,71} It is worth noting that such a phenomenon was recently observed for naturally occurring saponins isolated from *Stryphnodendron fissuratum* having a terminal arabinose moiety.⁷² In order to verify this hypothesis of conformational mobility, we performed a ¹H NMR analysis of saponin **4** in which the temperature was increased from 0 to 100 °C. As shown in Figure 4, the coupling constant values of the proton H-1' decreased ($J_{1,2}$ 5.9-4.1 Hz) with an increase of the temperature. In comparison, the coupling constant values of the proton H-1'' of the glucopyranose moiety were quite similar over the tested temperature range ($J_{1,2}$ 8.2-8.0 Hz). With regards to the saponin **4**, these ¹H NMR data suggested that the equilibrium between the ⁴C₁ and ¹C₄ conformations of the arabinopyranose moiety tend to shift towards the ¹C₄ conformation if the temperature is raised and *vice versa*.

CONCLUSION

In summary, this is the first report of the synthesis of naturally occurring lupane-type saponins bearing an α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)- α -L-arabinopyranose sugar moiety. In this work, betulinic acid 3 β -O- α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)-[β -D-glucopyranosyl-(1→4)]- α -L-arabinopyranoside (**3**) and 28-O- β -D-glucopyranosyl betulinic acid 3 β -O- α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)- α -L-arabinopyranoside (**4**) were synthesized using a stepwise glycosylation approach in 10% and 27% yields, respectively, over eight linear steps starting from allyl betulinate (**17**). It is noteworthy that the arabinose moiety of saponin **4** was in a high conformational mobility between ⁴C₁ and ¹C₄ chair conformations as reflected by the unusual anomeric coupling constant of the proton H-1'. These results open the way for concise and efficient syntheses of a wide range of betulinic acid saponin analogues as pharmaceutical and/or biological agents that can be of further interest in the elaboration of meaningful SAR studies. Work is currently in progress in our laboratory in order to evaluate the *in vitro* haemolytic, anticancer and anti-inflammatory activities of these natural saponins (**3** and **4**) and their analogues (**15a**, **15b**, **19a**, **19b**, **23a** and **23b**) and results will be reported in due course.

EXPERIMENTAL SECTION

General methods

Chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich Co. Canada or Alfa Aesar Co. and were used as received. The usual solvents were obtained from VWR International Co. and were used as received. Air and water sensitive reactions were performed in flame-dried glassware under argon atmosphere. Moisture sensitive reagents were introduced via a dry syringe. Dichloromethane (CH_2Cl_2) and acetone were distilled from anhydrous CaH_2 under an argon atmosphere. Tetrahydrofuran (THF) was distilled from sodium/benzophenone ketyl under an argon atmosphere. Methanol (MeOH) was distilled from Mg and I_2 under an argon atmosphere. Analytical thin-layer chromatography was performed with silica gel 60 F₂₅₄, 0.25 mm pre-coated TLC plates (Silicycle, Québec, Canada). Compounds were visualized using UV₂₅₄ and cerium molybdate (2 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_4(\text{NH}_4)_4$, 5 g $\text{MoO}_4(\text{NH}_4)_2$, 200 mL H_2O , 20 mL H_2SO_4) with charring. Flash column chromatography was carried out using 60-230 mesh silica gel (Silicycle, Québec, Canada) or high performance flash chromatography system (HPFC-Analogix F12-40) equipped with a silica gel column (F12-M, 8 g). All of the chemical yields generally represent the highest result obtained for three independent experiments. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a Bruker Avance spectrometer at 400 MHz (^1H) and 100 MHz (^{13}C), equipped with a 5 mm QNP probe. Elucidations of chemical structures were based on ^1H , ^{13}C , COSY, TOCSY, HMBC, HSQC, *J*-resolved, NOESY and DEPT-135 experiments. Signals are reported as m (multiplet), s (singlet), d (doublet), t (triplet), dd (doublet of doublet), dq (doublet of quadruplet), ddd (doublet of doublet of doublet), ddt (doublet of doublet of triplet), br s (broad singlet) and coupling constants are reported in hertz (Hz). The chemical shifts are reported in parts per million (δ) relative to residual solvent peak or TMS. The labile OH NMR signals appearing sometimes were not listed. Optical rotations were obtained using sodium D line at ambient temperature on a Rudolph Research Analytical Autopol IV automatic polarimeter. High-resolution electrospray ionization mass spectra (HR-

ESI-MS) and high field NMR analyses (500 and 700 MHz) were obtained at the Department of Chemistry, Université de Montréal, Québec, Canada.

2,3,4-Tri-O-benzoyl- β -L-arabinopyranosyl trichloroacetimidate (8) and 2,3,5-tri-O-benzoyl- α -L-arabinofuranosyl trichloroacetimidate (9)

To a cooled solution (ice/water bath) of L-arabinose (10.0 g, 66.6 mmol) in anhydrous pyridine (140 mL) with DMAP (81 mg, 0.67 mmol) as catalyst was slowly added BzCl (46 mL, 400 mmol) over 30 min. The mixture was stirred overnight at 60 °C and then quenched with MeOH (20 mL). Then, the solvents were evaporated under reduced pressure to afford a yellow oily residue which was taken up in EtOAc, washed with 10% HCl (4 \times), saturated NaHCO₃ solution and brine. The solvents of the dried solution (MgSO₄) were evaporated under reduced pressure to give a residue which was used immediately for the next reaction without further purification. To a solution of the crude benzoylated arabinose derivative (32.5 g, 57.4 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (168 mL) was added HBr/HOAc (40.2 mL, 33%) under an argon atmosphere. The mixture was stirred at room temperature for 2 h, then washed with saturated NaHCO₃ solution (3 \times) and brine. The solvents of the dried solution (MgSO₄) were evaporated under reduced pressure and the resulting residue was taken up in acetone (264 mL) and water (10.3 mL). Ag₂CO₃ (21.4 g, 77.4 mmol) was added portionwise and the hydrolysis was performed for 1 h at room temperature with constant stirring. The mixture was subsequently filtered through a bed of Celite® and the solvents of the dried solution (MgSO₄) were evaporated under reduced pressure. The resulting crude residue was dissolved in wet CH₂Cl₂ (459 mL), then DBU (4.3 mL, 29 mmol) and CCl₃CN (46.0 mL, 459 mmol) were added sequentially. The mixture was stirred for 4 days at room temperature and the solvents were evaporated under reduced pressure to give a dark red oily residue which was purified by flash chromatography (isocratic hexanes/EtOAc 9:1) to afford an inseparable mixture of **8** and **9** (15 g, 38%, four steps) as a white crystalline powder in a 5:1 ratio as confirmed by NMR. *R*_f 0.67 (hexanes/EtOAc 3:1). ¹H and ¹³C NMR

spectral data of **8**⁴⁴ and **9**⁵⁵ in the mixture were in agreement with those published in the literature.

1,2,3,4-Tetra-O-benzoyl- β -L-arabinopyranose (10) and 1,2,3,5-tetra-O-benzoyl- α -L-arabinofuranose (11)

To a cooled solution (ice/water bath) of L-arabinose (1.00 g, 6.66 mmol) in anhydrous pyridine (15.3 mL) with DMAP (8 mg, 0.07 mmol) as catalyst was slowly added BzCl (5.0 mL, 43 mmol) over 30 min. The mixture was stirred overnight at room temperature and then quenched with MeOH (2 mL) while keeping the temperature at 0 °C. Then, the solvents were evaporated under reduced pressure to afford a yellow oily residue which was taken up in EtOAc, washed with 10% HCl (4 \times), saturated NaHCO₃ solution and brine. The solvents of the dried solution (MgSO₄) were evaporated under reduced pressure to give a residue which was purified by flash chromatography (hexanes/EtOAc 9:1 to 7:3) to furnish **10** (3.44 g, 91%) as a white foam along with **11** (43 mg, 1%) as a colourless solid.

10: R_f 0.50 (hexanes/EtOAc 3:1); $[\alpha]_D^{25}$ +291.2 (c 0.1, CHCl₃). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 8.17-7.27 (m, 20 H, H-Ar), 6.87 (br s, 1H, H-1), 6.07 (s, 2H, H-2, H-3), 5.90 (s, 1H, H-4), 4.41 (d, J = 13.1 Hz, 1H, H-5), 4.19 (dd, J = 13.4, 1.8 Hz, 1H, H-5). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 165.8-164.7 (4 \times CO), 133.8-128.4 (C-Ar), 91.1 (C-1), 69.5 (C-4), 68.2 (C-3), 67.8 (C-2), 65.0 (C-5). HR-ESI-MS m/z 589.1464 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₃H₂₆O₉Na: 589.1469).

11: R_f 0.58 (hexanes/EtOAc 3:1); $[\alpha]_D^{25}$ -12.8 (c 0.1, CHCl₃). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 8.17-7.27 (m, 20 H, H-Ar), 6.77 (br s, 1H, H-1), 5.82 (d, J = 0.6 Hz, 1H, H-2), 5.68 (dt, J = 3.5, 0.9 Hz, 1H, H-3), 4.84 (m, 2H, H-4, H-5), 4.74 (dd, J = 12.7, 6.5 Hz, 1H, H-5). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 166.2-164.6 (4 \times CO), 133.8-128.3 (C-Ar), 99.8 (C-1), 83.9 (C-4), 80.9 (C-2), 77.5 (C-3), 63.7 (C-5). HR-ESI-MS m/z 589.1466 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₃H₂₆O₉Na: 589.1469).

2,3,4-Tri-O-benzoyl- α,β -L-arabinopyranose (12)

To a solution of **10** (3.00 g, 5.30 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (12.7 mL) was added HBr/HOAc (2.9 mL, 33%) under an argon atmosphere. The mixture was stirred at room temperature for 2 h, then washed with saturated NaHCO₃ solution (3 \times) and brine. The solvents of the dried solution (MgSO₄) were evaporated under reduced pressure and the resulting residue was taken up in acetone (24.4 mL) and water (1.0 mL). Ag₂CO₃ (1.97 g, 7.15 mmol) was added portionwise and the hydrolysis was performed for 1 h at room temperature with constant stirring. The mixture was subsequently filtered through a bed of Celite® and the solvents of the dried solution (MgSO₄) were evaporated under reduced pressure. The resulting oily residue was purified by flash chromatography (hexanes/EtOAc 4:1 to 3:2) to afford **12** (1.78 g, 73%, two steps) as a white crystalline powder. *R*_f 0.24 and 0.14 (hexanes/EtOAc 3:1); [α]_D²⁵ +291.4 (*c* 0.1, CHCl₃). HR-ESI-MS *m/z* 485.1206 [M + Na]⁺ (calcd for C₂₆H₂₂O₈Na: 485.1207).

2,3,4-Tri-O-benzoyl- β -L-arabinopyranosyl trichloroacetimidate-⁴C₁ (8) and 2,3,4-tri-O-benzoyl- α -L-arabinopyranosyl trichloroacetimidate-¹C₄ (27)

To a solution of **12** (100 mg, 0.216 mmol) in wet CH₂Cl₂ (1.7 mL) was added DBU (16 μ L, 0.108 mmol) followed by CCl₃CN (173 μ L, 459 mmol). The mixture was stirred for 45 min at room temperature, then the solvents were evaporated under reduced pressure to give a dark red oily residue which was purified by flash chromatography (hexanes/EtOAc 9:1 to 4:1) to furnish **8** (105 mg, 80%) as a white foam. If the reaction was performed overnight using K₂CO₃ (30 mg, 0.22 mmol) as a base instead of DBU, the TCA **27** (87 mg, 66%) was obtained as the major product (white amorphous powder) along with **8** (26 mg, 20%).

8: *R*_f 0.67 (hexanes/EtOAc 3:1); [α]_D²⁵ +229.2 (*c* 0.1, CHCl₃). ¹H and ¹³C NMR spectral data of **8**⁴⁴ were in agreement with those published in the literature. HR-ESI-MS *m/z* 628.0298 [M + Na]⁺ (calcd for C₂₈H₂₂Cl₃NO₈Na: 628.0303).

27: R_f 0.37 (hexanes/EtOAc 3:1); $[\alpha]_D^{25} +94.0$ (c 0.1, CHCl_3). ^1H and ^{13}C NMR spectral data of **27**⁴⁴ were in agreement with those published in the literature. HR-ESI-MS m/z 628.0296 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{22}\text{Cl}_3\text{NO}_8\text{Na}$: 628.0303).

28-O-tert-Butyldiphenylsilyl betulin (13)

To a cooled (ice/water bath) solution of **1** (2.00 g, 4.52 mmol), imidazole (769 mg, 11.3 mmol) and DMAP (55 mg, 0.45 mmol) in anhydrous THF (13.2 mL) was added dropwise TBDPSCl (1.8 mL, 6.8 mmol) under an argon atmosphere. The mixture was refluxed overnight or until TLC (hexanes/EtOAc 4:1) showed the disappearance of the initial product. Then, the solvents were evaporated under reduced pressure to give a residue which was purified by flash chromatography (hexanes/Et₂O 19:1 to 4:1) to furnish **13** (2.762 g, 90%) as a white crystalline powder. R_f 0.59 (hexanes/EtOAc 3:1); $[\alpha]_D^{25} -11.2$ (c 1.0, CHCl_3). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 7.68-7.39 (m, 10H, H-Ar), 4.59 (br s, 1H, H-29), 4.52 (br s, 1H, H-29), 3.68 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, H-28), 3.32 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, H-28), 3.16 (dd, $J = 10.9, 4.4$ Hz, 1H, H-3), 2.26 (td, $J = 10.6, 5.6$ Hz, 1H, H-19), 2.17-2.09 (m, 2H), 1.64 (s, 3H, H-30), 1.61-1.10 (m, 15H), 1.06 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.96 (s, 3H, H-23), 0.93 (s, 3H, H-27), 0.76 (s, 3H, H-25), 0.75 (s, 3H, H-24), 0.70 (s, 3H, H-26), 0.64 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, H-5). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 150.8 (C-20), 135.7-127.6 (C-Ar), 109.4 (C-29), 78.9 (C-3), 61.0 (C-28), 55.2 (C-5), 50.3 (C-9), 48.4 (C-18), 48.4 (C-17), 47.8 (C-19), 42.6 (C-14), 40.7 (C-8), 38.8 (C-4), 38.6 (C-1), 37.2 (C-13), 37.1 (C-10), 34.5 (C-22), 34.1 (C-7), 29.8 (C-21), 29.5 (C-16), 28.0 (C-23), 27.4 (C-2), 27.0 (C-15), 26.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 25.1 (C-12), 20.7 (C-11), 19.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 19.1 (C-30), 18.3 (C-6), 16.1 (C-25), 15.7 (C-26), 15.4 (C-24), 14.7 (C-27). HR-ESI-MS m/z 703.4906 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{46}\text{H}_{68}\text{O}_2\text{SiNa}$: 703.4881).

28-O-tert-Butyldiphenylsilyl betulin 3 β -O- α -L-arabinopyranoside (16a) and 28-O-tert-butyldiphenylsilyl betulin 3 β -O- α -L-arabinofuranoside (16b)

The acceptor **13** (1.400 g, 2.055 mmol) and a mixture of donors **8** and **9** (1.871 g, 3.082 mmol, ratio 5:1) were stirred in anhydrous CH₂Cl₂ (41.0 mL) with 4 Å MS under an argon atmosphere for 60 min. Then, the promoter TMSOTf (37 μ L, 0.20 mmol) was injected in the medium via a dry syringe at room temperature while keeping rigorous anhydrous conditions. The reaction mixture was stirred for 2 h at room temperature and quenched by addition of Et₃N (1.15 mL, 8.22 mmol). The solvents were evaporated under reduced pressure and the resulting residue was immediately dissolved in a solution of MeOH/THF/H₂O 1:2:1 (140 mL) to which was added NaOH (1.65 g, 41.1 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature or until TLC (hexanes/EtOAc 2:3) showed the complete disappearance of the benzoylated products and then acidified to pH \approx 4 with 10% aqueous HCl. The solvents were evaporated under reduced pressure to give a solid residue which was purified by flash chromatography (hexanes/EtOAc 2:3 to 100% EtOAc, then CH₂Cl₂/MeOH 9:1) to afford **16a** (1.404 g, 84%, two steps) and **16b** (225 mg, 13%, two steps) as white crystalline powders.

16a: R_f 0.62 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); $[\alpha]_D^{25}$ -10.2 (c 0.5, CHCl₃). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 7.74-7.34 (m, 10H, H-Ar), 4.59 (br s, 1H, H-29), 4.52 (br s, 1H, H-29), 4.26 (d, J = 5.6 Hz, 1H, H-1'), 3.90 (m, 1H, H-4'), 3.88 (m, 1H, H-5'), 3.74 (m, 1H, H-2'), 3.68 (m, 1H, H-28), 3.63 (m, 1H, H-3'), 3.46 (m, 1H, H-5'), 3.32 (d, J = 9.2 Hz, 1H, H-28), 3.07 (m, 1H, H-3), 2.26 (m, 1H, H-19), 2.19-2.08 (m, 2H), 1.90-1.72 (m, 2H), 1.64 (s, 3H, H-30), 1.62-1.11 (m, 13H), 1.05 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.95 (s, 3H, H-23), 0.91 (s, 3H, H-27), 0.76 (s, 3H, H-24), 0.74 (s, 3H, H-25), 0.70 (s, 3H, H-26), 0.63 (d, J = 7.4 Hz, 1H, H-5). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 150.7 (C-20), 135.6-127.6 (C-Ar), 109.4 (C-29), 105.2 (C-1'), 89.6 (C-3), 72.9 (C-3'), 71.4 (C-2'), 67.9 (C-4'), 65.0 (C-5'), 61.0 (C-28), 55.5 (C-5), 50.2 (C-9), 48.4 (C-18), 48.4 (C-17), 47.8 (C-19), 42.5 (C-14), 40.7 (C-8), 39.1 (C-4), 38.7 (C-1), 37.1 (C-13), 36.7 (C-10), 34.4 (C-22), 34.1 (C-7), 29.8 (C-21), 29.5 (C-16), 27.9 (C-23), 27.0 (C-15), 26.9 (C(CH₃)₃), 26.0 (C-2), 25.1 (C-12), 20.7 (C-11), 19.3 (C(CH₃)₃), 19.1 (C-30), 18.1

(C-6), 16.4 (C-24), 16.0 (C-25), 15.7 (C-26), 14.6 (C-27). HR-ESI-MS m/z 835.5292 $[M + Na]^+$ (calcd for $C_{51}H_{76}O_6SiNa$: 835.5303).

16b: R_f 0.69 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1); $[\alpha]_D^{25}$ -41.5 (c 0.5, $CHCl_3$). 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 7.72-7.35 (m, 10H, H-Ar), 5.10 (br s, 1H, H-1'), 4.59 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-29), 4.52 (br s, 1H, H-29), 4.19 (m, 1H, H-4'), 4.03 (br s, 1H, H-3'), 3.99 (br s, 1H, H-2'), 3.89 (dd, $J = 11.7, 2.2$ Hz, 1H, H-5'), 3.83 (dd, $J = 11.7, 1.4$ Hz, 1H, H-5'), 3.68 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H, H-28), 3.32 (d, $J = 9.9$ Hz, 1H, H-28), 3.10 (dd, $J = 11.8, 4.8$ Hz, 1H, H-3), 2.27 (td, $J = 10.7, 5.4$ Hz, 1H, H-19), 2.17-2.09 (m, 2H), 1.89-1.75 (m, 2H), 1.65 (s, 3H, H-30), 1.63-1.10 (m, 13H), 1.06 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 0.93 (s, 3H, H-27), 0.92 (s, 3H, H-23), 0.75 (s, 3H, H-25), 0.72 (s, 3H, H-24), 0.69 (s, 3H, H-26). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 150.9 (C-20), 135.7-127.6 (C-Ar), 110.4 (C-1'), 109.4 (C-29), 87.9 (C-3), 87.2 (C-4'), 78.2 (C-2'), 78.1 (C-3'), 62.0 (C-5'), 61.0 (C-28), 55.4 (C-5), 50.2 (C-9), 48.4 (C-18), 48.4 (C-17), 47.8 (C-19), 42.6 (C-14), 40.7 (C-8), 38.8 (C-4), 38.5 (C-1), 37.2 (C-13), 36.8 (C-10), 34.5 (C-22), 34.1 (C-7), 29.8 (C-21), 29.5 (C-16), 28.0 (C-23), 27.0 (C-15), 26.9 ($C(CH_3)_3$), 25.9 (C-2), 25.1 (C-12), 20.7 (C-11), 19.4 ($C(CH_3)_3$), 19.1 (C-30), 18.2 (C-6), 16.1 (C-24), 16.0 (C-25), 15.7 (C-26), 14.7 (C-27). HR-ESI-MS m/z 835.5283 $[M + Na]^+$ (calcd for $C_{51}H_{76}O_6SiNa$: 835.5303).

Allyl betulinate (17)

Allyl bromide (0.19 mL, 2.2 mmol) and K_2CO_3 (454 mg, 3.28 mmol) were added to a solution of **2** (501 mg, 1.10 mmol) in DMF (7 mL). The reaction mixture was stirred for 7 h at 55 °C. After cooling, EtOAc was added and the organic layer was washed with 1 N HCl. The aqueous layer was extracted with EtOAc (3 \times) and the combined organic layers were washed with saturated $NaHCO_3$ and brine. After the solution was dried ($MgSO_4$), the solvents were evaporated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography (100% CH_2Cl_2) to give **8** as a white crystalline powder (458 mg, 84%). R_f 0.58 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 99:1); $[\alpha]_D^{20}$ +3.9 (c 1.00, $CHCl_3$). 1H and ^{13}C NMR spectral data of **17**²⁷ were in agreement with

those published in the literature. HR-ESI-MS m/z 497.3985 $[M + H]^+$ (calcd for $C_{33}H_{53}O_3$: 497.3995)

Allyl betulinate 3 β -O- α -L-arabinopyranoside (18a) and allyl betulinate 3 β -O- α -L-arabinofuranoside (18b)

These compounds were prepared from the acceptor **17** (1.250 g, 2.516 mmol) and a mixture of donors **8** and **9** (2.290 g, 3.774 mmol, ratio 5:1) in the same manner as that described for compounds **16a** and **16b**. Purification by flash chromatography (hexanes/EtOAc 2:3 to 100% EtOAc) gave **18a** (1.065 g, 67%, two steps) as a white crystalline powder and **18b** (176 mg, 11%, two steps) as a white amorphous powder.

18a: R_f 0.54 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1); $[\alpha]_D^{25} +4.0$ (c 0.5, $CHCl_3/MeOH$ 1:1). 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 5.93 (ddt, $J = 17.2, 10.5, 5.7$ Hz, 1H, H-2_{Allyl}), 5.34 (dq, $J = 17.2, 1.1$ Hz, 1H, H-3_{Allyl}), 5.23 (dq, $J = 10.3, 1.1$ Hz, 1H, H-3_{Allyl}), 4.74 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H, H-29), 4.60 (m, 1H, H-29), 4.59 (m, 2H, H-1_{Allyl}), 4.27 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, H-1'), 3.92 (m, 1H, H-4'), 3.90 (m, 1H, H-5'), 3.75 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-2'), 3.65 (dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, 1H, H-3'), 3.48 (d, $J = 11.3$, 1H, H-5'), 3.09 (dd, $J = 11.3, 4.1$ Hz, 1H, H-3), 3.02 (td, $J = 11.1, 4.9$ Hz, 1H, H-19), 2.31-2.17 (m, 2H), 1.96-1.74 (m, 3H), 1.69 (s, 3H, H-30), 1.66-0.99 (m, 16H), 0.96 (s, 3H, H-23), 0.95 (s, 3H, H-27), 0.89 (s, 3H, H-26), 0.80 (s, 3H, H-25), 0.77 (s, 3H, H-24), 0.66 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, H-5). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 175.7 (C-28), 150.5 (C-20), 132.5 (C-2_{Allyl}), 118.1 (C-3_{Allyl}), 109.6 (C-29), 105.2 (C-1'), 89.7 (C-3), 72.8 (C-3'), 71.4 (C-2'), 67.8 (C-4'), 65.0 (C-5'), 64.6 (C-1_{Allyl}), 56.5 (C-17), 55.6 (C-5), 50.5 (C-9), 49.4 (C-18), 46.9 (C-19), 42.3 (C-14), 40.7 (C-8), 39.1 (C-4), 38.7 (C-1), 38.2 (C-13), 37.0 (C-22), 36.8 (C-10), 34.3 (C-7), 32.1 (C-16), 30.6 (C-21), 29.6 (C-15), 27.9 (C-23), 26.0 (C-2), 25.5 (C-12), 20.8 (C-11), 19.4 (C-30), 18.1 (C-6), 16.4 (C-24), 16.1 (C-25), 15.9 (C-26), 14.6 (C-27). HR-ESI-MS m/z 651.4221 $[M + Na]^+$ (calcd for $C_{38}H_{60}O_7Na$: 651.4231).

18b: R_f 0.59 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 9:1); $[\alpha]_D^{25} -44.4$ (c 0.5, $CHCl_3/MeOH$ 1:1). 1H NMR ($CDCl_3/CD_3OD$ 1:1, 400 MHz) δ : 5.94 (ddt, $J = 16.7, 11.1, 5.6$ Hz, 1H, H-2_{Allyl}), 5.35 (d, $J = 17.2$ Hz, 1H, H-3_{Allyl}), 5.25 (d, $J = 10.5$, 1H, H-3_{Allyl}), 4.99 (br s, 1H, H-

1'), 4.73 (br s, 1H, H-29), 4.60 (m, 1H, H-29), 4.59 (m, 2H, H-1_{Allyl}), 4.04 (q, $J = 4.0$ Hz, 1H, H-4'), 4.00 (m, 1H, H-2'), 3.89 (m, 1H, H-3'), 3.77 (dd, $J = 11.9, 2.5$ Hz, 1H, H-5'), 3.68 (dd, $J = 11.4, 3.7$ Hz, 1H, H-5'), 3.09 (dd, $J = 11.6, 4.3$ Hz, 1H, H-3), 3.00 (td, $J = 11.3, 5.4$ Hz, 1H, H-19), 2.32-2.17 (m, 2H), 1.96-1.76 (m, 3H), 1.70 (s, 3H, H-30), 1.67-1.00 (m, 16H), 0.99 (s, 3H, H-27), 0.95 (s, 3H, H-23), 0.92 (s, 3H, H-26), 0.84 (s, 3H, H-25), 0.76 (s, 3H, H-24), 0.72 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, H-5). ¹³C NMR (CDCl₃/CD₃OD 1:1, 100 MHz) δ : 176.6 (C-28), 150.7 (C-20), 132.8 (C-2_{Allyl}), 118.4 (C-3_{Allyl}), 110.7 (C-1'), 109.9 (C-29), 88.1 (C-3), 85.0 (C-4'), 81.4 (C-2'), 77.8 (C-3'), 65.1 (C-1_{Allyl}), 62.0 (C-5'), 57.1 (C-17), 56.0 (C-5), 51.0 (C-9), 49.8 (C-18), 47.5 (C-19), 42.8 (C-14), 41.1 (C-8), 39.3 (C-4), 39.1 (C-1), 38.7 (C-13), 37.3 (C-22), 37.3 (C-10), 34.7 (C-7), 32.5 (C-16), 30.9 (C-21), 30.0 (C-15), 28.1 (C-23), 26.2 (C-2), 25.9 (C-12), 21.3 (C-11), 19.4 (C-30), 18.6 (C-6), 16.4 (C-25), 16.4 (C-24), 16.2 (C-26), 14.9 (C-27). HR-ESI-MS m/z 651.4222 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₈H₆₀O₇Na: 651.4231).

Betulin 3 β -O- α -L-arabinopyranoside (15a) and betulin 3 β -O- α -L-arabinofuranoside (15b)

These compounds were prepared from the acceptor **14** (150 mg, 0.309 mmol) and a mixture of donors **8** and **9** (282 mg, 0.464 mmol, ratio 5:1) in the same manner as that described for compounds **16a** and **16b**. Purification by C-18 reversed phase flash chromatography (MeOH/H₂O 4:1 to 100% MeOH) gave pure **15a** (139 mg, 73%, two steps) as a white amorphous powder and pure **15b** (26 mg, 15%, two steps) as a white crystalline powder.

15a: R_f 0.47 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); $[\alpha]_D^{25} +12.4$ (c 0.4, CHCl₃/MeOH 1:1). ¹H NMR (CDCl₃/CD₃OD 1:1, 400 MHz) δ : 4.68 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H-29), 4.57 (br s, 1H, H-29), 4.33 (d, $J = 6.1$ Hz, 1H, H-1'), 3.87 (m, 1H, H-5'), 3.86 (m, 1H, H-4'), 3.75 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, H-2'), 3.64 (dd, $J = 8.3, 6.2$ Hz, 1H, H-28), 3.57 (dd, $J = 8.3, 2.9$ Hz, 1H, H-3'), 3.53 (m, 1H, H-5'), 3.28 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, H-28), 3.14 (dd, $J = 11.4, 4.5$ Hz, 1H, H-3), 2.41 (td, $J = 10.6, 5.7$ Hz, 1H, H-19), 2.01-1.71 (m, 5H), 1.69 (s, 3H, H-30), 1.68-1.07 (m, 14H), 1.05 (s, 3H, H-26), 1.02 (s, 3H, H-23), 0.99 (s, 3H,

H-27), 0.85 (s, 3H, H-25), 0.82 (s, 3H, H-24), 0.74 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H, H-5). ^{13}C NMR ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 1:1, 100 MHz) δ : 151.1 (C-20), 109.9 (C-29), 105.9 (C-1'), 90.2 (C-3), 73.3 (C-3'), 71.8 (C-2'), 68.1 (C-4'), 65.1 (C-5'), 60.0 (C-28), 56.2 (C-5), 51.0 (C-9), 49.3 (C-18), 48.4 (C-19), 48.2 (C-17), 43.2 (C-14), 41.5 (C-8), 39.7 (C-4), 39.3 (C-1), 37.9 (C-13), 37.4 (C-10), 34.7 (C-7), 34.5 (C-22), 30.2 (C-21), 29.7 (C-16), 28.1 (C-23), 27.5 (C-15), 26.5 (C-2), 26.1 (C-12), 21.4 (C-11), 19.3 (C-30), 18.7 (C-6), 16.5 (C-24), 16.5 (C-25), 16.2 (C-26), 15.0 (C-27). HR-ESI-MS m/z 597.4114 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{58}\text{O}_6\text{Na}$: 597.4126).

15b: R_f 0.57 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1); $[\alpha]_D^{25}$ -32.2 (c 0.1, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 1:1). ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 5.11 (br s, 1H, H-1'), 4.68 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-29), 4.58 (br s, 1H, H-29), 4.20 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, H-4'), 4.04 (s, 1H, H-3'), 4.01 (br s, 1H, H-2'), 3.89 (dd, $J = 11.8, 2.2$ Hz, 1H, H-5'), 3.84 (dd, $J = 11.8, 1.4$ Hz, 1H, H-5'), 3.81 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H-28), 3.34 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H-28), 3.12 (dd, $J = 11.5, 4.4$ Hz, 1H, H-3), 2.39 (td, $J = 10.5, 5.7$ Hz, 1H, H-19), 2.03-1.71 (m, 4H), 1.69 (s, 3H, H-30), 1.68-1.02 (m, 17H), 1.01 (s, 3H, H-26), 0.98 (s, 3H, H-27), 0.93 (s, 3H, H-23), 0.82 (s, 3H, H-25), 0.73 (s, 3H, H-24). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 150.5 (C-20), 110.4 (C-1'), 109.7 (C-29), 87.9 (C-3), 87.3 (C-4'), 78.2 (C-2'), 78.1 (C-3'), 62.0 (C-5'), 60.5 (C-28), 55.4 (C-5), 50.3 (C-9), 48.7 (C-18), 47.8 (C-19), 47.7 (C-17), 42.7 (C-14), 40.9 (C-8), 38.9 (C-4), 38.6 (C-1), 37.3 (C-13), 36.8 (C-10), 34.1 (C-22), 33.9 (C-7), 29.7 (C-16), 29.1 (C-21), 28.0 (C-23), 27.0 (C-15), 25.9 (C-2), 25.1 (C-12), 20.8 (C-11), 19.1 (C-30), 18.2 (C-6), 16.1 (C-24), 16.1 (C-25), 15.9 (C-26), 14.7 (C-27). HR-ESI-MS m/z 597.4116 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{58}\text{O}_6\text{Na}$: 597.4126).

Betulinic acid 3 β -O- α -L-arabinopyranoside (19a)

To a solution of **18a** (75 mg, 0.119 mmol) and PPh_3 (19 mg, 0.072 mmol) in anhydrous THF (0.84 mL) was added $\text{Pd}^0(\text{PPh}_3)_4$ (41 mg, 0.036 mmol) followed by pyrrolidine (20 μL , 0.239 mmol) at room temperature under an argon atmosphere. The reaction mixture was stirred in the dark overnight or until TLC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1) showed the disappearance of the initial product. Then, the solvents were evaporated under reduced pressure to give a red-yellow powder which was purified

by flash chromatography (100% CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂/MeOH 47:3) to afford pure **19a** (46 mg, 66%) as a white amorphous powder. *R_f* 0.46 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); [α]²⁵_D +5.2 (*c* 0.2, CHCl₃/MeOH 1:1). ¹H NMR (CDCl₃/CD₃OD 1:1, 400 MHz) δ : 4.72 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H-29), 4.59 (br s, 1H, H-29), 4.33 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, H-1'), 3.88 (m, 1H, H-5'), 3.87 (m, 1H, H-4'), 3.64 (dd, *J* = 8.1, 6.1 Hz, 1H, H-2'), 3.58 (dd, *J* = 8.1, 3.0 Hz, 1H, H-3'), 3.53 (dd, *J* = 13.8, 3.7 Hz, 1H, H-5'), 3.13 (dd, *J* = 11.6, 4.5 Hz, 1H, H-3), 3.03 (td, *J* = 10.5, 4.3 Hz, 1H, H-19), 2.31-2.21 (m, 2H), 2.01-1.72 (m, 3H), 1.70 (s, 3H, H-30), 1.68-1.04 (m, 15H), 1.01 (s, 3H, H-23), 0.98 (s, 3H, H-27), 0.95 (s, 3H, H-26), 0.84 (s, 3H, H-25), 0.81 (s, 3H, H-24), 0.74 (d, *J* = 9.7 Hz, 1H, H-5). ¹³C NMR (CDCl₃/CD₃OD 1:1, 100 MHz) δ : 179.5 (C-28), 151.2 (C-20), 109.8 (C-29), 105.7 (C-1'), 90.2 (C-3), 73.2 (C-3'), 71.7 (C-2'), 67.9 (C-4'), 64.9 (C-5'), 56.7 (C-17), 56.2 (C-5), 51.1 (C-9), 49.7 (C-18), 47.5 (C-19), 42.9 (C-14), 41.2 (C-8), 39.6 (C-4), 39.2 (C-1), 38.8 (C-13), 37.6 (C-22), 37.4 (C-10), 34.8 (C-7), 32.7 (C-16), 31.0 (C-21), 30.1 (C-15), 28.1 (C-23), 26.4 (C-2), 26.0 (C-12), 21.4 (C-11), 19.5 (C-30), 18.6 (C-6), 16.4 (C-25), 16.4 (C-24), 16.2 (C-26), 14.9 (C-27). HR-ESI-MS *m/z* 611.3901 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₅H₅₆O₇Na: 611.3918).

Betulinic acid 3 β -O- α -L-arabinofuranoside (19b)

This compound was prepared from **18b** (75 mg, 0.119 mmol) in the same manner as that described for compound **19a**. Purification by flash chromatography (100% CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂/MeOH 47:3) gave pure **19b** (50 mg, 71%) as a white amorphous powder. *R_f* 0.54 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1); [α]²⁵_D -41.9 (*c* 0.2, CHCl₃/MeOH 1:1). ¹H NMR (CDCl₃/CD₃OD 1:1, 400 MHz) δ : 4.99 (br s, 1H, H-1'), 4.72 (m, 1H, H-29), 4.59 (br s, 1H, H-29), 4.04 (m, 1H, H-4'), 4.01 (dd, *J* = 3.0, 1.6 Hz, 1H, H-2'), 3.88 (dd, *J* = 5.1, 3.2 Hz, 1H, H-3'), 3.77 (dd, *J* = 11.9, 3.2 Hz, 1H, H-5'), 3.68 (dd, *J* = 11.9, 4.1 Hz, 1H, H-5'), 3.09 (dd, *J* = 11.8, 4.8 Hz, 1H, H-3), 3.02 (td, *J* = 11.0, 4.8 Hz, 1H, H-19), 2.31-2.22 (m, 2H), 2.01-1.89 (m, 2H), 1.81 (m, 1H, H-2), 1.70 (s, 3H, H-30), 1.68-1.01 (m, 16H), 0.99 (s, 3H, H-27), 0.96 (s, 3H, H-23), 0.95 (s, 3H, H-26), 0.85 (s, 3H, H-25), 0.77 (s, 3H, H-24), 0.73 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H, H-5). ¹³C NMR (CDCl₃/CD₃OD 1:1, 100 MHz) δ : 179.6 (C-28), 151.2 (C-20), 110.9 (C-1'), 109.9

(C-29), 88.3 (C-3), 85.1 (C-4'), 81.7 (C-2'), 78.0 (C-3'), 62.2 (C-5'), 56.8 (C-17), 56.2 (C-5), 51.2 (C-9), 49.8 (C-18), 47.6 (C-19), 43.0 (C-14), 41.3 (C-8), 39.5 (C-4), 39.3 (C-1), 38.9 (C-13), 37.6 (C-22), 37.5 (C-10), 34.9 (C-7), 32.8 (C-16), 31.1 (C-21), 30.2 (C-15), 28.2 (C-23), 26.4 (C-2), 26.1 (C-12), 21.5 (C-11), 19.5 (C-30), 18.8 (C-6), 16.5 (C-25), 16.5 (C-24), 16.3 (C-26), 15.0 (C-27). HR-ESI-MS m/z 611.3898 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₅H₅₈O₇Na: 611.3918).

28-O-tert-Butyldiphenylsilyl betulin 3β-O-3,4-O-isopropylidene-α-L-arabinopyranoside (20a)

To a cooled (ice/water bath) solution of **16a** (1.000 g, 1.230 mmol) in anhydrous acetone (14.7 mL) were added PPTs (31 mg, 0.122 mmol) and 2,2-dimethoxypropane (1.52 mL, 12.3 mmol) under an argon atmosphere. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature or until TLC (hexanes/EtOAc 7:3) showed the disappearance of the initial product. Then, the solvents were evaporated under reduced pressure and the resulting residue was taken up in CH₂Cl₂ and washed with saturated NaHCO₃ solution and brine. The organic solvents of the dried solution (MgSO₄) were evaporated under reduced pressure to give a residue which was purified by flash chromatography (hexanes/EtOAc 9:1 to 4:1) to give **20a** (626 mg, 60%) as a white crystalline powder. R_f 0.38 (hexanes/EtOAc 3:1); $[\alpha]_D^{25} +1.7$ (c 1.0, CHCl₃). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 7.72-7.35 (m, 10H, H-Ar), 4.60 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H-29), 4.53 (br s, 1H, H-29), 4.20 (m, 3H, H-1', H-4', H-5'), 4.06 (dd, J = 7.6, 5.7 Hz, 1H, H-3'), 3.75 (dd, J = 13.8, 3.5 Hz, 1H, H-5'), 3.68 (d, J = 9.9 Hz, 1H, H-28), 3.63 (t, J = 7.7 Hz, 1H, H-2'), 3.32 (d, J = 9.9 Hz, 1H, H-28), 3.09 (dd, J = 11.7, 4.6 Hz, 1H, H-3), 2.26 (td, J = 11.0, 5.7 Hz, 1H, H-19), 2.17-2.08 (m, 2H), 1.91-1.66 (m, 3H), 1.65 (s, 3H, H-30), 1.54 (s, 3H, (CH₃)₂C), 1.36 (s, 3H, (CH₃)₂C), 1.06 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.96 (s, 3H, H-23), 0.92 (s, 3H, H-27), 0.80 (s, 3H, H-24), 0.76 (s, 3H, H-25), 0.69 (s, 3H, H-26), 0.66 (m, 1H, H-5). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ: 150.8 (C-20), 135.7-127.6 (C-Ar), 110.0 ((CH₃)₂C), 109.4 (C-29), 104.3 (C-1'), 89.0 (C-3), 78.1 (C-3'), 74.3 (C-2'), 73.2 (C-4'), 63.1 (C-5'), 61.0 (C-28), 55.5 (C-5), 50.3 (C-9), 48.4 (C-18), 48.4 (C-17), 47.8 (C-19), 42.6 (C-14), 40.8 (C-8), 39.1

(C-4), 38.7 (C-1), 37.2 (C-13), 36.8 (C-10), 34.5 (C-22), 34.1 (C-7), 29.8 (C-21), 29.5 (C-16), 28.2 (C-23), 28.0 ((CH₃)₂C), 27.0 (C-15), 26.9 (C(CH₃)₃), 26.1 ((CH₃)₂C), 26.1 (C-2), 25.1 (C-12), 20.7 (C-11), 19.4 (C(CH₃)₃), 19.1 (C-30), 18.1 (C-6), 16.5 (C-24), 16.1 (C-25), 15.7 (C-26), 14.7 (C-27). HR-ESI-MS *m/z* 875.5648 [M + Na]⁺ (calcd for C₅₄H₈₀O₆SiNa: 875.5616).

Allyl betulinate 3β-O-3,4-O-isopropylidene-α-L-arabinopyranoside (20b)

This compound was prepared from **18a** (800 mg, 1.27 mmol) in the same manner as that described for compound **20a**. Purification by flash chromatography (hexanes/EtOAc 9:1 to 4:1) gave **20b** (630 mg, 74%) as a white crystalline powder. *R_f* 0.34 (hexanes/EtOAc 3:1); [α]²⁵_D +18.0 (*c* 1.0, CHCl₃). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 5.93 (ddt, *J* = 17.2, 10.3, 5.7 Hz, 1H, H-2_{Allyl}), 5.34 (dq, *J* = 17.2, 1.6 Hz, 1H, H-3_{Allyl}), 5.24 (dq, *J* = 10.3, 1.2 Hz, 1H, H-3_{Allyl}), 4.74 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-29), 4.60 (m, 1H, H-29), 4.59 (m, 2H, H-1_{Allyl}), 4.21 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-1'), 4.20 (m, 2H, H-4', H-5'), 4.06 (dd, *J* = 7.6, 5.7 Hz, 1H, H-3'), 3.76 (dd, *J* = 13.8, 3.5 Hz, 1H, H-5'), 3.63 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-2'), 3.10 (dd, *J* = 11.4, 4.6 Hz, 1H, H-3), 3.02 (td, *J* = 11.3, 4.8 Hz, 1H, H-19), 2.29-2.17 (m, 2H), 1.95-1.75 (m, 2H), 1.69 (s, 3H, H-30), 1.54 (s, 3H, (CH₃)₂C), 1.37 (s, 3H, (CH₃)₂C), 0.96 (s, 3H, H-23), 0.95 (s, 3H, H-27), 0.90 (s, 3H, H-26), 0.82 (s, 3H, H-25), 0.80 (s, 3H, H-24), 0.69 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-5). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ: 175.7 (C-28), 150.6 (C-20), 132.6 (C-2_{Allyl}), 118.2 (C-3_{Allyl}), 110.1 ((CH₃)₂C), 109.6 (C-29), 104.3 (C-1'), 89.1 (C-3), 78.2 (C-3'), 74.4 (C-2'), 73.3 (C-4'), 64.6 (C-1_{Allyl}), 63.2 (C-5'), 56.6 (C-17), 55.7 (C-5), 50.6 (C-9), 49.5 (C-18), 46.9 (C-19), 42.4 (C-14), 40.8 (C-8), 39.2 (C-4), 38.8 (C-1), 38.2 (C-13), 37.0 (C-22), 36.9 (C-10), 34.3 (C-7), 32.1 (C-16), 30.6 (C-21), 29.6 (C-15), 28.2 (C-23), 28.1 ((CH₃)₂C), 26.1 ((CH₃)₂C), 26.1 (C-2), 25.6 (C-12), 20.9 (C-11), 19.4 (C-30), 18.2 (C-6), 16.5 (C-24), 16.2 (C-25), 16.0 (C-26), 14.7 (C-27). HR-ESI-MS *m/z* 691.4538 [M + Na]⁺ (calcd for C₄₁H₆₄O₇Na: 691.4544).

28-O-tert-Butyldiphenylsilyl betulin 3β-O-2,3,4-tri-O-benzoyl-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-3,4-O-isopropylidene-α-L-arabinopyranoside (21a)

The acceptor **20a** (500 mg, 0.586 mmol) and the donor **6** (546 mg, 0.879 mmol) were stirred in anhydrous CH₂Cl₂ (8.8 mL) with 4 Å MS under an argon atmosphere for 40 min. The temperature was lowered to -78 °C with an ice CO₂/acetone bath, then the promoter BF₃•Et₂O (52 μL, 0.41 mmol) was injected in the medium via a dry syringe while keeping rigorous anhydrous conditions. The reaction mixture was stirred for 1.5 h at -78 °C and quenched by addition of Et₃N (327 μL, 2.34 mmol). The solvents were evaporated under reduced pressure to give a residue which was purified by flash chromatography (hexanes/EtOAc 47:3 to 17:1) to afford **21a** (600 mg, 78%) as a white crystalline powder. *R*_f 0.57 (hexanes/EtOAc 3:1); [α]²⁵_D +59.2 (*c* 0.5, CHCl₃). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 8.13-7.21 (m, 25H, H-Ar), 5.87 (dd, *J* = 10.2, 3.5 Hz, 1H, H-3"), 5.75 (dd, *J* = 3.5, 1.7 Hz, 1H, H-2"), 5.67 (t, *J* = 10.0 Hz, 1H, H-4"), 5.61 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H-1"), 4.60 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, H-29), 4.53 (m, 1H, H-29), 4.51 (m, 1H, H-5"), 4.46 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-1'), 4.25 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.15 (dd, *J* = 13.3, 1.9 Hz, 1H, H-5'), 3.90 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, H-2'), 3.79 (dd, *J* = 12.6, 2.6 Hz, 1H, H-5'), 3.71 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, H-28), 3.32 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, H-28), 3.15 (dd, *J* = 11.7, 4.5 Hz, 1H, H-3), 2.26 (td, *J* = 10.9, 6.0 Hz, 1H, H-19), 2.18-2.09 (m, 2H), 1.88-1.68 (m, 3H), 1.66 (s, 3H, H-30), 1.55 (s, 3H, (CH₃)₂C), 1.35 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, H-6"), 1.33 (s, 3H, (CH₃)₂C), 1.23 (s, 3H, H-23), 1.06 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0.95 (s, 3H, H-27), 0.93 (s, 3H, H-24), 0.79 (s, 3H, H-25), 0.74 (s, 3H, H-26). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ: 165.8-165.4 (3× CO), 150.9 (C-20), 135.7-127.6 (C-Ar), 110.4 ((CH₃)₂C), 109.4 (C-29), 103.3 (C-1'), 95.3 (C-1"), 89.2 (C-3), 79.2 (C-3'), 75.4 (C-2'), 73.4 (C-4'), 72.0 (C-4"), 70.6 (C-2"), 69.9 (C-3"), 66.5 (C-5"), 62.7 (C-5'), 61.1 (C-28), 55.9 (C-5), 50.4 (C-9), 48.5 (C-18), 48.4 (C-17), 47.8 (C-19), 42.6 (C-14), 40.8 (C-8), 39.3 (C-4), 38.9 (C-1), 37.2 (C-13), 36.9 (C-10), 34.5 (C-22), 34.2 (C-7), 29.9 (C-21), 29.5 (C-16), 28.1 (C-23), 27.8 ((CH₃)₂C), 27.1 (C-15), 26.9 (C(CH₃)₃), 26.3 (C-2), 26.1 ((CH₃)₂C), 25.2 (C-12), 20.8 (C-11), 19.4 (C(CH₃)₃), 19.1 (C-30), 18.2 (C-6), 17.6 (C-6"), 16.5 (C-24), 16.2 (C-25), 15.8 (C-

26), 14.7 (C-27). HR-ESI-MS m/z 1333.6971 $[M + Na]^+$ (calcd for $C_{81}H_{102}O_{13}SiNa$: 1333.6982).

Allyl betulinate 3 β -O-2,3,4-tri-O-benzoyl- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-3,4-O-isopropylidene- α -L-arabinopyranoside (21b)

This compound was prepared from the acceptor **20b** (500 mg, 0.747 mmol) and the donor **6** (696 mg, 1.12 mmol) in the same manner as that described for compound **21a**. Purification by flash chromatography (hexanes/EtOAc 9:1 to 17:1) gave **21b** (873 mg, 99%) as a white crystalline powder. R_f 0.51 (hexanes/EtOAc 3:1); $[\alpha]_D^{25} +81.5$ (c 0.5, $CHCl_3$). 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 8.13-7.21 (m, 15H, H-Ar), 5.93 (ddt, $J = 17.2, 10.3, 5.8$ Hz, 1H, H-2_{Allyl}), 5.87 (dd, $J = 10.0, 3.5$ Hz, 1H, H-3''), 5.75 (dd, $J = 3.3, 1.6$ Hz, 1H, H-2''), 5.66 (t, $J = 10.1$ Hz, 1H, H-4''), 5.61 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H, H-1''), 5.35 (dq, $J = 17.3, 1.6$ Hz, 1H, H-3_{Allyl}), 5.24 (dq, $J = 10.5, 1.3$ Hz, 1H, H-3_{Allyl}), 4.75 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-29), 4.61 (m, 1H, H-29), 4.58 (m, 2H, H-1_{Allyl}), 4.51 (dd, $J = 9.4, 5.8$ Hz, 1H, H-5''), 4.47 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-1'), 4.26 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.16 (dd, $J = 13.0, 1.9$ Hz, 1H, H-5'), 3.90 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, H-2'), 3.81 (dd, $J = 13.0, 3.0$ Hz, 1H, H-5'), 3.16 (dd, $J = 11.9, 4.8$ Hz, 1H, H-3), 3.03 (td, $J = 11.3, 4.5$ Hz, 1H, H-19), 2.31-2.18 (m, 2H), 1.96-1.72 (m, 4H), 1.70 (s, 3H, H-30), 1.55 (s, 3H, $(CH_3)_2C$), 1.35 (d, $J = 5.8$ Hz, 3H, H-6''), 1.34 (s, 3H, $(CH_3)_2C$), 1.23 (s, 3H, H-23), 0.98 (s, 3H, H-27), 0.93 (s, 3H, H-24), 0.92 (s, 3H, H-26), 0.84 (s, 3H, H-25), 0.77 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, H-5). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 175.8 (C-28), 165.8-165.4 (3 \times CO), 150.6 (C-20), 133.4-133.0 (C-Ar), 132.6 (C-2_{Allyl}), 130.0-128.2 (C-Ar), 118.1 (C-3_{Allyl}), 110.4 ($(CH_3)_2C$), 109.6 (C-29), 103.3 (C-1'), 95.2 (C-1''), 89.2 (C-3), 79.2 (C-3'), 75.3 (C-2'), 73.4 (C-4'), 72.0 (C-4''), 70.6 (C-2''), 69.9 (C-3''), 66.5 (C-5''), 64.6 (C-1_{Allyl}), 62.7 (C-5'), 56.6 (C-17), 56.0 (C-5), 50.6 (C-9), 49.5 (C-18), 47.0 (C-19), 42.4 (C-14), 40.8 (C-8), 39.3 (C-4), 39.0 (C-1), 38.3 (C-13), 37.0 (C-22), 37.0 (C-10), 34.4 (C-7), 32.2 (C-16), 30.6 (C-21), 29.7 (C-15), 28.1 (C-23), 27.8 ($(CH_3)_2C$), 26.3 (C-2), 26.1 ($(CH_3)_2C$), 25.6 (C-12), 20.9 (C-11), 19.4 (C-30), 18.2 (C-6), 17.6 (C-6''), 16.6 (C-24), 16.2 (C-25), 16.0 (C-26), 14.7 (C-27). HR-ESI-MS m/z 1149.5898 $[M + Na]^+$ (calcd for $C_{68}H_{86}O_{14}Na$: 1149.5910).

Betulin **3 β -O-2,3,4-tri-O-benzoyl- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-3,4-O-isopropylidene- α -L-arabinopyranoside (22a)**

To a solution of **21a** (250 mg, 0.191 mmol) in anhydrous THF (2.08 mL) was added HOAc (120 μ L, 2.10 mmol) and 1 M TBAF in THF (2.08 mL) at room temperature under an argon atmosphere. The reaction mixture was refluxed overnight or until TLC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1) showed the disappearance of the initial product. Then, the mixture was diluted with CH₂Cl₂, washed with H₂O, dried over anhydrous MgSO₄, filtered and the solvents were evaporated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography (hexanes/EtOAc 9:1 to 7:3) to furnish **22a** (125 mg, 72%, corrected yield) as a white amorphous powder along with **21a** (28 mg, 11%, recovery yield). *R*_f 0.20 (hexanes/EtOAc 3:1); [α]_D²⁵ +91.2 (*c* 0.5, CHCl₃). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 8.14-7.21 (m, 15H, H-Ar), 5.87 (dd, *J* = 10.2, 3.5 Hz, 1H, H-3"), 5.75 (dd, *J* = 3.3, 1.6 Hz, 1H, H-2"), 5.66 (t, *J* = 10.0 Hz, 1H, H-4"), 5.57 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, H-1"), 4.69 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H-29), 4.59 (br s, 1H, H-29), 4.51 (dq, 10.0, 6.3 Hz, 1H, H-5"), 4.47 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-1'), 4.27 (m, 1H, H-3'), 4.26 (m, 1H, H-4'), 4.16 (d, *J* = 13.4, Hz, 1H, H-5'), 3.90 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, H-2'), 3.85 (m, 1H, H-28), 3.84 (m, 1H, H-5'), 3.34 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H-28), 3.16 (dd, *J* = 11.9, 4.6 Hz, 1H, H-3), 2.40 (td, *J* = 10.7, 5.7 Hz, 1H, H-19), 2.04-1.80 (m, 4H), 1.69 (s, 3H, H-30), 1.55 (s, 3H, (CH₃)₂C), 1.35 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, H-6"), 1.34 (s, 3H, (CH₃)₂C), 1.24 (s, 3H, H-23), 1.03 (s, 3H, H-26), 0.99 (s, 3H, H-27), 0.93 (s, 3H, H-24), 0.85 (s, 3H, H-25), 0.77 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, H-5). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 165.8-165.4 (3 \times CO), 150.5 (C-20), 133.4-128.2 (C-Ar), 110.4 ((CH₃)₂C), 109.7 (C-29), 103.3 (C-1'), 95.2 (C-1"), 89.2 (C-3), 79.2 (C-3'), 75.3 (C-2'), 73.4 (C-4'), 72.0 (C-4"), 70.6 (C-2"), 69.9 (C-3"), 66.5 (C-5"), 62.7 (C-5'), 60.6 (C-28), 55.9 (C-5), 50.4 (C-9), 48.8 (C-18), 47.8 (C-19), 47.8 (C-17), 42.7 (C-14), 41.0 (C-8), 39.3 (C-4), 39.0 (C-1), 37.3 (C-13), 36.9 (C-10), 34.2 (C-22), 34.0 (C-7), 29.8 (C-21), 29.2 (C-16), 28.1 (C-23), 27.8 ((CH₃)₂C), 27.0 (C-15), 26.3 (C-2), 26.1 ((CH₃)₂C), 25.2 (C-12), 20.8 (C-11), 19.1 (C-30), 18.2 (C-6), 17.5 (C-6"), 16.5 (C-24), 16.2 (C-25), 16.0 (C-26), 14.7 (C-27). HR-ESI-MS *m/z* 1095.5798 [M + Na]⁺ (calcd for C₆₅H₈₄O₁₃Na: 1095.5804).

Betulinic acid 3 β -O-2,3,4-tri-O-benzoyl- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-3,4-O-isopropylidene- α -L-arabinopyranoside (22b)

This compound was prepared from **21b** (100 mg, 0.089 mmol) in the same manner as that described for compound **19a**. Purification by flash chromatography (hexanes/EtOAc 9:1 to 100% EtOAc) gave **22b** (82 mg, 85%) as a white amorphous powder. R_f 0.28 (hexanes/EtOAc 3:1); $[\alpha]_D^{25} +70.2$ (c 0.5, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 8.13-7.20 (m, 15H, H-Ar), 5.86 (dd, $J = 10.2, 3.5$ Hz, 1H, H-3''), 5.75 (dd, $J = 3.3, 1.6$ Hz, 1H, H-2''), 5.66 (t, $J = 10.0$ Hz, 1H, H-4''), 5.60 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, H-1''), 4.76 (br s, 1H, H-29), 4.62 (br s, 1H, H-29), 4.50 (m, 1H, H-5''), 4.47 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-1'), 4.26 (m, 2H, H-3', H-4'), 4.16 (d, $J = 12.9$ Hz, 1H, H-5'), 3.90 (m, 1H, H-2'), 3.80 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H, H-5'), 3.16 (dd, $J = 11.5, 4.3$ Hz, 1H, H-3), 3.01 (td, $J = 10.6, 4.4$ Hz, 1H, H-19), 2.31-2.14 (m, 2H), 2.05-1.80 (m, 3H), 1.71 (s, 3H, H-30), 1.55 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 1.34 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 1.33 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H, H-6''), 1.23 (s, 3H, H-23), 0.99 (s, 3H, H-27), 0.95 (s, 3H, H-26), 0.92 (s, 3H, H-24), 0.84 (s, 3H, H-25), 0.77 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, H-5). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 181.4 (C-28), 165.8-165.4 (3 \times CO), 150.5 (C-20), 133.4-128.2 (C-Ar), 110.4 ($(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 109.7 (C-29), 103.3 (C-1'), 95.3 (C-1''), 89.2 (C-3), 79.2 (C-3'), 75.4 (C-2'), 73.4 (C-4'), 72.0 (C-4''), 70.6 (C-2''), 69.9 (C-3''), 66.6 (C-5''), 62.7 (C-5'), 56.4 (C-17), 56.0 (C-5), 50.6 (C-9), 49.3 (C-18), 46.9 (C-19), 42.5 (C-14), 40.8 (C-8), 39.3 (C-4), 39.0 (C-1), 38.4 (C-13), 37.1 (C-22), 37.0 (C-10), 34.4 (C-7), 32.2 (C-16), 30.6 (C-21), 29.7 (C-15), 28.1 (C-23), 27.8 ($(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 26.3 (C-2), 26.1 ($(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 25.6 (C-12), 20.9 (C-11), 19.4 (C-30), 18.2 (C-6), 17.5 (C-6''), 16.5 (C-24), 16.2 (C-25), 16.0 (C-26), 14.7 (C-27). HR-ESI-MS m/z 1109.5589 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (calcd for $\text{C}_{65}\text{H}_{82}\text{O}_{14}\text{Na}$: 1109.5597).

Betulin 3 β -O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside (23a)

To a solution of **22a** (65 mg, 0.061 mmol) in anhydrous $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1:2 (5.2 mL) was added $\text{TsOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (9.0 mg, 0.048 mmol) at room temperature under an argon atmosphere. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature or until

TLC (hexanes/EtOAc 7:3) showed the complete disappearance of the initial product. Then, the mixture was quenched with Et₃N (49 μ L, 0.35 mmol) and the solvents were evaporated under reduced pressure. The resulting residue was immediately dissolved in a solution of MeOH/THF/H₂O 1:2:1 (4.2 mL) to which was added NaOH (49 mg, 1.2 mmol). The reaction mixture was stirred for 4.5 h at room temperature or until TLC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1) showed the complete disappearance of the benzoylated products and then acidified to pH \approx 4 with 10% aqueous HCl. The solvents were evaporated under reduced pressure to give a solid residue which was purified by C-18 reversed phase flash chromatography (MeOH/H₂O 4:1 to 9:1) to afford pure **23a** (42 mg, 84%, two steps) as a white amorphous powder. *R*_f 0.84 (CH₂Cl₂/MeOH 3:1); $[\alpha]_D^{25}$ -32.8 (*c* 0.1, MeOH). ¹H NMR (C₅D₅N, 400 MHz) δ : 6.19 (s, 1H, H-1''), 4.94 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, H-1'), 4.90 (br s, 1H, H-29), 4.79 (br s, 1H, H-2''), 4.74 (br s, 1H, H-29), 4.66 (m, 1H, H-3''), 4.62 (m, 1H, H-5''), 4.59 (m, 1H, H-2'), 4.34 (m, 1H, H-4''), 4.33 (m, 1H, H-5'), 4.31 (m, 1H, H-3'), 4.30 (m, 1H, H-4'), 4.10 (dd, *J* = 10.2, 4.3 Hz, 1H, H-28), 3.84 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, H-5'), 3.69 (dd, *J* = 10.5, 4.7 Hz, 1H, H-28), 3.28 (dd, *J* = 11.7, 4.1 Hz, 1H, H-3), 2.64 (td, *J* = 10.8, 5.9 Hz, 1H, H-19), 2.52-2.40 (m, 2H), 2.23-2.11 (m, 2H), 1.97-1.85 (m, 2H), 1.77 (s, 3H, H-30), 1.66 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H, H-6''), 1.20 (s, 3H, H-23), 1.10 (s, 3H, H-24), 1.09 (s, 3H, H-27), 0.98 (s, 3H, H-26), 0.82 (s, 3H, H-25), 0.75 (d, *J* = 10.8 Hz, 1H, H-5). ¹³C NMR (C₅D₅N, 100 MHz) δ : 151.6 (C-20), 110.3 (C-29), 105.2 (C-1'), 102.2 (C-1''), 89.2 (C-3), 76.4 (C-2'), 74.5 (C-4''), 74.2 (C-3'), 73.0 (C-3''), 72.8 (C-2''), 70.3 (C-5''), 69.1 (C-4'), 65.1 (C-5'), 59.8 (C-28), 56.3 (C-5), 51.0 (C-9), 49.5 (C-18), 48.9 (C-17), 48.7 (C-19), 43.3 (C-14), 41.5 (C-8), 40.0 (C-4), 39.5 (C-1), 37.9 (C-13), 37.5 (C-10), 35.2 (C-22), 34.9 (C-7), 30.8 (C-21), 30.4 (C-16), 28.3 (C-23), 27.9 (C-15), 27.1 (C-2), 26.1 (C-12), 21.4 (C-11), 19.6 (C-30), 19.0 (C-6''), 18.9 (C-6), 17.2 (C-24), 16.8 (C-25), 16.5 (C-26), 15.3 (C-27). HR-ESI-MS *m/z* 743.4696 [M + Na]⁺ (calcd for C₄₁H₆₈O₁₀Na: 743.4705).

Betulinic acid 3 β -O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside (23b)

This compound was prepared from **22b** (50 mg, 0.046 mmol) in the same manner as that described for compound **23a**. Purification by C-18 reversed phase flash chromatography (MeOH/H₂O 4:1 to 9:1) gave pure **23b** (20 mg, 61%, two steps) as a white amorphous powder. R_f 0.86 (CH₂Cl₂/MeOH 3:1); $[\alpha]_D^{25}$ -37.7 (c 0.1, MeOH). ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ : 5.10 (d, J = 1.1 Hz, 1H, H-1"), 4.70 (br s, 1H, H-29), 4.56 (br s, 1H, H-29), 4.52 (d, J = 4.6 Hz, 1H, H-1'), 3.88 (dd, J = 3.2, 1.6 Hz, 1H, H-2"), 3.84 (m, 1H, H-5'), 3.81 (m, 1H, H-5"), 3.79 (m, 1H, H-4'), 3.76 (m, 1H, H-2'), 3.74 (m, 1H, H-4"), 3.69 (m, 1H, H-3"), 3.48 (dd, J = 11.4, 2.4 Hz, 1H, H-5'), 3.38 (t, J = 9.5 Hz, 1H, H-3'), 3.10 (m, 2H, H-3, H-19), 2.43 (td, J = 12.1, 2.7 Hz, 1H, H-13), 2.25 (dt, J = 12.6, 3.0 Hz, 1H, H-16), 2.00-1.78 (m, 3H), 1.69 (s, 3H, H-30), 1.23 (d, J = 6.2 Hz, 3H, H-6"), 1.00 (s, 6H, H-23, H-27), 0.99 (s, 3H, H-26), 0.87 (s, 3H, H-25), 0.82 (s, 3H, H-23), 0.75 (d, J = 9.4 Hz, 1H, H-5). ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ : 181.9 (C-28), 152.5 (C-20), 109.8 (C-29), 104.8 (C-1'), 102.0 (C-1"), 90.6 (C-3), 76.8 (C-2'), 73.9 (C-3'), 73.1 (C-4"), 72.2 (C-3"), 72.1 (C-2"), 70.2 (C-5"), 68.4 (C-4'), 63.8 (C-5'), 58.1 (C-17), 57.2 (C-5), 52.1 (C-9), 50.7 (C-18), 48.5 (C-19), 43.6 (C-14), 42.0 (C-8), 40.4 (C-4), 40.2 (C-1), 39.5 (C-13), 38.6 (C-22), 38.1 (C-10), 35.6 (C-7), 33.9 (C-16), 31.9 (C-21), 31.0 (C-15), 28.5 (C-23), 27.2 (C-2), 27.0 (C-12), 22.2 (C-11), 19.6 (C-30), 19.3 (C-6), 18.0 (C-6"), 16.9 (C-24), 16.9 (C-25), 16.8 (C-26), 15.2 (C-27). HR-ESI-MS m/z 757.4488 [M + Na]⁺ (calcd for C₄₁H₆₆O₁₁Na: 757.4497).

Allyl betulinate 3 β -O-2,3,4-tri-O-benzoyl- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside (24)

To a solution of **21b** (200 mg, 0.046 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂/MeOH 1:2 (13.3 mL) was added TsOH•H₂O (23 mg, 0.12 mmol) at room temperature under an argon atmosphere. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature or until TLC (hexanes/EtOAc 7:3) showed the complete disappearance of the initial product. Then, the mixture was quenched with Et₃N (124 μ L, 0.887 mmol) and the solvents

were evaporated under reduced pressure to give a solid residue which was purified by flash chromatography (hexanes/EtOAc 4:1 to 2:3) to furnish **24** (133 mg, 70%) as a white crystalline powder. R_f 0.15 (hexanes/EtOAc 3:1); $[\alpha]_D^{25} +52.5$ (c 0.2, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 8.12-7.23 (m, 15H, H-Ar), 5.93 (ddt, $J = 17.2, 10.4, 5.7$ Hz, 1H, H-2_{Allyl}), 5.83 (dd, $J = 10.2, 3.4$ Hz, 1H, H-3''), 5.71 (m, 1H, H-2''), 5.69 (m, 1H, H-4''), 5.38 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H, H-1''), 5.34 (dq, $J = 17.2, 1.5$ Hz, 1H, H-3_{Allyl}), 5.24 (dq, $J = 10.4, 1.3$ Hz, 1H, H-3_{Allyl}), 4.80 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H, H-1'), 4.74 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-29), 4.61 (m, 1H, H-29), 4.58 (m, 2H, H-1_{Allyl}), 4.36 (ddt, $J = 9.7, 6.3, 6.2$ Hz, 1H, H-5''), 4.03 (m, 1H, H-4'), 4.01 (m, 1H, H-3'), 3.99 (m, 1H, H-2'), 3.83 (dd, $J = 11.8, 7.6$ Hz, 1H, H-5'), 3.68 (dd, $J = 11.7, 4.2$ Hz, 1H, H-5'), 3.15 (dd, $J = 11.5, 4.5$ Hz, 1H, H-3), 3.02 (td, $J = 11.1, 4.2$ Hz, 1H, H-19), 2.30-2.18 (m, 2H), 1.95-1.83 (m, 3H), 1.69 (s, 3H, H-30), 1.34 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H-6''), 1.04 (s, 3H, H-23), 0.96 (s, 3H, H-27), 0.92 (s, 3H, H-26), 0.83 (s, 6H, H-23, H-25), 0.72 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H, H-5). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 175.7 (C-28), 165.8-165.5 (3 \times CO), 150.5 (C-20), 133.5-133.1 (C-Ar), 132.5 (C-2_{Allyl}), 129.9-128.3 (C-Ar), 118.1 (C-3_{Allyl}), 109.6 (C-29), 102.1 (C-1'), 98.2 (C-1''), 90.3 (C-3), 76.2 (C-2'), 71.6 (C-4''), 70.9 (C-3'), 70.7 (C-2''), 69.8 (C-3''), 67.2 (C-5''), 65.6 (C-4'), 64.6 (C-1_{Allyl}), 61.3 (C-5'), 56.5 (C-17), 55.6 (C-5), 50.5 (C-9), 49.4 (C-18), 46.9 (C-19), 42.4 (C-14), 40.7 (C-8), 39.2 (C-4), 38.8 (C-1), 38.2 (C-13), 37.0 (C-22), 36.9 (C-10), 34.2 (C-7), 32.1 (C-16), 30.6 (C-21), 29.6 (C-15), 28.0 (C-23), 26.0 (C-2), 25.5 (C-12), 20.9 (C-11), 19.4 (C-30), 18.2 (C-6), 17.5 (C-6''), 16.3 (C-24), 16.1 (C-25), 16.0 (C-26), 14.7 (C-27). HR-ESI-MS m/z 1109.5589 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{65}\text{H}_{82}\text{O}_{14}\text{Na}$: 1109.5597).

Allyl betulinate 3 β -O-2,3,4-tri-O-benzoyl- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[2,3,4,6-tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]- α -L-arabinopyranoside (25)

The acceptor **24** (38.5 mg, 0.036 mmol) and the donor **5** (41 mg, 0.055 mmol) were stirred in anhydrous CH_2Cl_2 (1.5 mL) with 4 Å MS under an argon atmosphere for 40 min. The temperature was lowered to -10 °C with an ice water/acetone bath, then a solution of TMSOTf in CH_2Cl_2 (100 μL , 40 mM) was injected in the medium via a

dry syringe while keeping rigorous anhydrous conditions. The reaction mixture was stirred while the temperature was gradually raised to room temperature over 3 h and quenched by addition of Et₃N (21 μL, 0.15 mmol). The solvents were evaporated under reduced pressure to give a residue which was purified by flash chromatography (hexanes/EtOAc 9:1 to 1:1) to afford **25** (20 mg, 50%, corrected yield) as a white crystalline powder along with **24** (6 mg, 15%, recovery yield). *R_f* 0.32 (hexanes/EtOAc 3:1); [α]²⁵_D +52.0 (*c* 0.1, CHCl₃). ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 8.11-7.22 (m, 35H, H-Ar), 5.93 (m, 1H, H-3'''), 5.92 (m, 1H, H-2_{Allyl}), 5.79 (dd, *J* = 10.2, 3.4 Hz, 1H, H-3''), 5.70 (t, *J* = 9.7 Hz, 1H, H-4'''), 5.62 (m, 2H, H-2'', H-4''), 5.59 (m, 1H, H-2'''), 5.33 (dq, *J* = 17.2, 1.5 Hz, 1H, H-3_{Allyl}), 5.23 (dq, *J* = 10.4, 1.3 Hz, 1H, H-3_{Allyl}), 5.19 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H-1''), 5.12 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-1'''), 4.74 (m, 1H, H-29), 4.71 (m, 1H, H-6'''), 4.65 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, H-1'), 4.60 (m, 1H, H-29), 4.59 (m, 2H, H-1_{Allyl}), 4.51 (m, 1H, H-6'''), 4.31 (m, 1H, H-5''), 4.25 (m, 1H, H-5'''), 4.09 (m, 1H, H-5'), 4.07 (m, 1H, H-4'), 3.90 (m, 1H, H-3'), 3.83 (m, 1H, H-2'), 3.68 (m, 1H, H-5'), 3.07 (m, 1H, H-3), 3.02 (m, 1H, H-19), 2.30-2.12 (m, 2H), 1.95-1.70 (m, 3H), 1.69 (s, 3H, H-30), 1.29 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, H-6''), 1.00 (s, 3H, H-23), 0.94 (s, 3H, H-27), 0.89 (s, 3H, H-26), 0.80 (s, 3H, H-25), 0.78 (s, 3H, H-24), 0.68 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H, H-5). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ: 175.7 (C-28), 166.1-165.1 (7× CO), 150.6 (C-20), 133.5-133.1 (C-Ar), 132.6 (C-2_{Allyl}), 129.9-128.3 (C-Ar), 118.1 (C-3_{Allyl}), 109.6 (C-29), 102.4 (C-1'), 101.9 (C-1'''), 97.9 (C-1''), 90.3 (C-3), 76.0 (C-4'), 76.0 (C-2'), 72.8 (C-3'''), 72.3 (C-5'''), 72.0 (C-2'''), 71.7 (C-4''), 70.7 (C-2''), 70.6 (C-3'), 69.8 (C-3''), 69.6 (C-4'''), 67.0 (C-5''), 64.6 (C-1_{Allyl}), 63.0 (C-6'''), 60.6 (C-5'), 56.6 (C-17), 55.7 (C-5), 50.6 (C-9), 49.5 (C-18), 46.9 (C-19), 42.4 (C-14), 40.7 (C-8), 39.2 (C-4), 38.8 (C-1), 38.2 (C-13), 37.0 (C-22), 36.9 (C-10), 34.3 (C-7), 32.1 (C-16), 30.6 (C-21), 29.6 (C-15), 28.1 (C-23), 25.9 (C-2), 25.5 (C-12), 20.9 (C-11), 19.4 (C-30), 18.2 (C-6), 17.5 (C-6''), 16.3 (C-24), 16.2 (C-25), 16.0 (C-26), 14.7 (C-27). HR-ESI-MS *m/z* 1687.7167 [M + Na]⁺ (calcd for C₉₉H₁₀₈O₂₃Na: 1687.7174).

Betulinic acid 3 β -O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]- α -L-arabinopyranoside (3)

To a solution of **25** (17 mg, 0.010 mmol) and PPh₃ (2.7 mg, 0.010 mmol) in anhydrous THF (> 0.10 mL) was added Pd⁰(PPh₃)₄ (5.9 mg, 0.005 mmol) followed by pyrrolidine (2.0 μ L, 0.024 mmol) at room temperature under an argon atmosphere. The reaction mixture was stirred for 4.5 h in the dark at room temperature or until TLC (hexanes/EtOAc 7:3) showed the disappearance of the initial product. Then, the solvents were evaporated under reduced pressure and the resulting red-yellow residue was immediately dissolved in a solution of MeOH/THF/H₂O 1:2:1 (0.72 mL) to which was added NaOH (8.4 mg, 0.21 mmol). The reaction mixture was stirred 6 h at room temperature or until TLC (CH₂Cl₂/MeOH 4:1) showed the complete disappearance of the benzoylated product and then acidified to pH \approx 4 with 10% aqueous HCl. The solvents were evaporated under reduced pressure to give a solid residue which was purified by C-18 reversed phase flash chromatography (MeOH/H₂O 3:2 to 4:1) to afford pure **3** (5.4 mg, 60%, two steps) as a white amorphous powder. *R*_f 0.68 (CH₂Cl₂/MeOH 3:1); [α]_D²⁵ -24.6 (*c* 0.1, MeOH). ¹H NMR (C₅D₅N, 700 MHz) δ : 6.21 (br s, 1H, H-1''), 5.16 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-1'''), 4.94 (m, 1H, H-29), 4.79 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H, H-1'), 4.76 (m, 2H, H-2'', H-29), 4.65 (m, 1H, H-5''), 4.64 (m, 1H, H-3''), 4.53 (m, 1H, H-2'), 4.52 (m, 1H, H-6'''), 4.42 (dd, *J* = 12.2, 3.9 Hz, 1H, H-5'), 4.40 (dd, *J* = 12.0, 5.0 Hz, 1H, H-6'''), 4.34 (t, *J* = 9.4 Hz, 1H, H-4''), 4.30 (m, 1H, H-4'), 4.28 (t, *J* = 9.3 Hz, 1H, H-4'''), 4.27 (m, 1H, H-3'), 4.23 (t, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-3'''), 4.07 (t, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-2'''), 3.92 (ddd, *J* = 9.5, 5.1, 2.3 Hz, 1H, H-5'''), 3.81 (d, *J* = 11.7 Hz, 1H, H-5'), 3.57 (td, *J* = 10.7, 4.5 Hz, 1H, H-19), 3.22 (dd, *J* = 11.7, 4.2 Hz, 1H, H-3), 2.78 (m, 1H, H-13), 2.66 (m, 1H, H-16), 2.29-2.22 (m, 2H), 2.08 (m, 1H, H-2), 1.95 (m, 1H, H-12), 1.87 (m, 1H, H-15), 1.78 (s, 3H, H-30), 1.76 (t, *J* = 11.4 Hz, 1H, H-18), 1.65 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, H-6''), 1.61-1.21 (m, 12H), 1.18 (s, 3H, H-23), 1.10 (s, 3H, H-27), 1.09 (s, 3H, H-24), 1.02 (s, 3H, H-26), 0.77 (s, 3H, H-25), 0.72 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H, H-5). ¹³C NMR (C₅D₅N, 175 MHz) δ : 179.6 (C-28), 151.8 (C-20), 110.2 (C-29), 106.7 (C-1'''), 105.3 (C-1'), 102.1 (C-1''), 89.1 (C-3), 80.0 (C-4'), 79.1 (C-5'''), 78.8 (C-3'''),

76.7 (C-2'), 75.8 (C-2'''), 74.4 (C-4'''), 74.3 (C-4''), 72.8 (C-3''), 72.6 (C-2''), 71.5 (C-3'), 70.1 (C-5''), 64.9 (C-5'), 62.8 (C-6'''), 57.1 (C-17), 56.4 (C-5), 51.1 (C-9), 50.1 (C-18), 48.1 (C-19), 43.1 (C-14), 41.3 (C-8), 39.9 (C-4), 39.4 (C-1), 38.8 (C-13), 38.0 (C-22), 37.4 (C-10), 35.0 (C-7), 33.3 (C-16), 31.6 (C-21), 30.6 (C-15), 28.2 (C-23), 27.1 (C-2), 26.4 (C-12), 21.5 (C-11), 19.8 (C-30), 19.0 (C-6''), 18.8 (C-6), 17.1 (C-24), 16.7 (C-25), 16.7 (C-26), 15.1 (C-27). HR-ESI-MS m/z 919.5018 $[M + Na]^+$ (calcd for $C_{47}H_{76}O_{16}Na$: 919.5026).

28-O-2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosyl betulinic acid 3 β -O-2,3,4-tri-O-benzoyl- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-3,4-O-isopropylidene- α -L-arabinopyranoside (26)

To a solution of the acceptor **22b** (30 mg, 0.028 mmol) and the donor **7** (27 mg, 0.041 mmol) in CH_2Cl_2 (0.32 mL) were added H_2O (0.32 mL), K_2CO_3 (9.5 mg, 0.069 mmol) and Bu_4NBr (3.6 mg, 0.011 mmol). The resulting mixture was vigorously stirred and refluxed for 6 h. Then, the mixture was diluted with CH_2Cl_2 , washed with H_2O and brine. The solvents of the dried ($MgSO_4$) organic solution were evaporated under reduced pressure to give a brown residue which was purified by flash chromatography (hexanes/EtOAc 9:1 to 3:2) to afford **26** (36 mg, 78%) as a white amorphous powder. R_f 0.20 (hexanes/EtOAc 3:1); $[\alpha]_D^{25} +93.0$ (c 0.1, $CHCl_3$). 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 8.12-7.22 (m, 35H, H-Ar), 6.03 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, H-1'''), 6.01 (t, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-3'''), 5.86 (dd, $J = 10.2, 3.5$ Hz, 1H, H-3''), 5.76 (t, $J = 9.1$ Hz, 1H, H-2'''), 5.75 (m, 1H, H-2''), 5.73 (t, $J = 9.7$ Hz, 1H, H-4'''), 5.67 (t, $J = 10.0$ Hz, 1H, H-4''), 5.61 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H-1''), 4.71 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-29), 4.58 (m, 1H, H-29), 4.59 (m, 1H, H-6'''), 4.49 (m, 1H, H-6'''), 4.51 (m, 1H, H-5''), 4.45 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, H-1'), 4.29 (m, 1H, H-5'''), 4.25 (m, 1H, H-4'), 4.25 (m, 1H, H-3'), 4.15 (dd, $J = 13.4, 1.6$ Hz, 1H, H-5'), 3.89 (m, 1H, H-2'), 3.78 (dd, $J = 12.7, 2.6$ Hz, 1H, H-5'), 3.11 (dd, $J = 11.5, 4.6$ Hz, 1H, H-3), 2.93 (td, $J = 11.0, 4.7$ Hz, 1H, H-19), 2.17 (m, 1H, H-16), 2.05 (td, $J = 12.1, 3.2$ Hz, 1H, H-13), 1.96-1.66 (m, 4H), 1.64 (br s, 3H, H-30), 1.54 (s, 3H, $(CH_3)_2C$), 1.36 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, H-6''), 1.33 (s, 3H, $(CH_3)_2C$), 1.18 (s, 3H, H-23), 0.90 (s, 3H, H-24), 0.80 (s, 3H, H-27),

0.71 (s, 3H, H-25), 0.63 (d, $J = 11.9$ Hz, 1H, H-5), 0.49 (s, 3H, H-26). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 174.1 (C-28), 166.1-164.7 (7 \times CO), 150.3 (C-20), 133.6-128.3 (C-Ar), 110.4 ($(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 109.6 (C-29), 103.3 (C-1'), 95.2 (C-1''), 91.4 (C-1'''), 89.1 (C-3), 79.2 (C-3'), 75.3 (C-2'), 73.4 (C-4'), 73.0 (C-5'''), 72.9 (C-3'''), 72.1 (C-4''), 70.6 (C-2''), 70.3 (C-2'''), 70.0 (C-3''), 69.4 (C-4'''), 66.5 (C-5''), 62.8 (C-6'''), 62.7 (C-5'), 56.8 (C-17), 55.8 (C-5), 50.4 (C-9), 49.1 (C-18), 46.7 (C-19), 42.2 (C-14), 40.3 (C-8), 39.2 (C-4), 38.9 (C-1), 38.0 (C-13), 36.8 (C-10), 36.3 (C-22), 33.4 (C-7), 31.5 (C-16), 30.3 (C-21), 29.9 (C-15), 28.1 (C-23), 27.8 ($(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 26.2 (C-2), 26.1 ($(\text{CH}_3)_2\text{C}$), 25.5 (C-12), 20.8 (C-11), 19.5 (C-30), 17.9 (C-6), 17.6 (C-6''), 16.6 (C-24), 16.1 (C-25), 15.4 (C-26), 14.5 (C-27). HR-ESI-MS m/z 1687.7157 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (calcd for $\text{C}_{99}\text{H}_{108}\text{O}_{23}\text{Na}$: 1687.7174).

28-O- β -D-Glucopyranosyl betulinic acid 3 β -O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranoside (4)

This compound was prepared from **26** (80 mg, 0.048 mmol) in the same manner as that described for compound **23a**. Purification by C-18 reversed phase flash chromatography (MeOH/ H_2O 3:2 to 3:1) afforded pure **4** (35 mg, 82%, two steps) as a white amorphous powder. R_f 0.49 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 3:1); $[\alpha]_D^{25}$ -36.0 (c 0.1, MeOH). ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ : 5.49 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-1'''), 5.10 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H, H-1''), 4.71 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, H-29), 4.59 (br s, 1H, H-29), 4.53 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H, H-1'), 3.87 (dd, $J = 3.3, 1.7$ Hz, 1H, H-2''), 3.84 (m, 1H, H-6'''), 3.83 (m, 1H, H-5'), 3.80 (m, 1H, H-5''), 3.78 (m, 1H, H-4'), 3.76 (m, 1H, H-2'), 3.74 (m, 1H, H-3'), 3.70 (m, 1H, H-6''), 3.69 (m, 1H, H-3''), 3.47 (m, 1H, H-5'), 3.42 (m, 1H, H-3'''), 3.38 (m, 1H, H-5'''), 3.38 (m, 1H, H-4''), 3.37 (m, 1H, H-4'''), 3.32 (m, 1H, H-2'''), 3.08 (dd, $J = 11.4, 4.3$ Hz, 1H, H-3), 3.00 (td, $J = 11.0, 4.6$ Hz, 1H, H-19), 2.39-2.27 (m, 2H), 2.03-1.78 (m, 3H), 1.70 (s, 3H, H-30), 1.21 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, H-6''), 1.00 (s, 3H, H-27), 0.99 (s, 3H, H-23), 0.96 (s, 3H, H-26), 0.87 (s, 3H, H-25), 0.82 (s, 3H, H-24), 0.74 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H, H-5). ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz) δ : 176.2 (C-28), 151.9 (C-20), 110.3 (C-29), 104.8 (C-1'), 102.1 (C-1''), 95.2 (C-1'''), 90.7 (C-3), 78.8 (C-5'''), 78.4 (C-3'''), 76.9 (C-2'), 74.1 (C-2'''), 73.9 (C-4''), 73.1 (C-3'), 72.2

(C-2"), 72.2 (C-3"), 71.1 (C-4"), 70.2 (C-5"), 68.4 (C-4'), 63.8 (C-5'), 62.4 (C-6"), 57.9 (C-17), 57.2 (C-5), 52.0 (C-9), 50.6 (C-18), 48.4 (C-19), 43.6 (C-14), 42.1 (C-8), 40.4 (C-4), 40.2 (C-1), 39.4 (C-13), 38.1 (C-10), 37.5 (C-22), 35.5 (C-7), 32.8 (C-16), 31.5 (C-21), 30.8 (C-15), 28.5 (C-23), 27.2 (C-2), 26.9 (C-12), 22.1 (C-11), 19.5 (C-30), 19.4 (C-6), 18.0 (C-6"), 16.9 (C-24), 16.9 (C-25), 16.7 (C-26), 15.2 (C-27). HR-ESI-MS m/z 919.5022 [M + Na]⁺ (calcd for C₄₇H₇₆O₁₆Na: 919.5026).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Marianne Piochon for her contribution in organic synthesis and Professor François-Xavier Garneau for his corrections and helpful commentaries about this manuscript. The financial support of Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT, fonds forestier 02) is gratefully acknowledged. Charles Gauthier thanks Programme d'Aide Institutionnel à la Recherche de l'Université du Québec à Chicoutimi (PAIR-UQAC), Fondation de l'UQAC, Association Francophone pour le Savoir (ACFAS) and FQRNT for graduate scholarships.

REFERENCES

1. Nisbet, L. J.; Moore, M. Will natural products remain an important source of drug research for the future. *Curr. Opin. Biotech.* **1997**, *8*, 708-712.
2. Butler, M. S. The role of natural products chemistry in drug discovery. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 2141-2153.
3. Balunas, M. J.; Kinghorn, A. D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci.* **2005**, *78*, 431-441.
4. McChesney, J. D.; Venkataraman, S. K.; Henri, J. T. Plant natural products: Back to the future of into extinction? *Phytochemistry* **2007**, *68*, 2015-2022.
5. Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 461-477.
6. Vincken, J.-P.; Heng, L.; de Groot, A.; Gruppen, H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 275-297.

7. Sparg, S. G.; Light, M. E.; van Staden, J. Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *94*, 219-243.
8. Oda, K.; Matsuda, H.; Murakami, T.; Katayama, S.; Ohgitani, T.; Yoshikawa, M. Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. *Biol. Chem.* **2000**, *381*, 67-74.
9. Rao, A. V.; Gurfinkel, D. M. The bioactivity of saponins: Triterpenoid and steroidal glycosides. *Drug Metab. Drug Interac.* **2000**, *17*, 211-235.
10. Qin, G.-W. Some progress on chemical studies of triterpenoid saponins from Chinese medicinal plants. *Curr. Org. Chem.* **1998**, *2*, 613-625.
11. Liu, J.; Henkel, T. Traditional Chinese medicine (TCM): Are polyphenols and saponins the key ingredients triggering biological activities? *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 1483-1485.
12. Bruneton, J. In *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales*; Éditions Technique & Documentation: Paris, 1995.
13. Yu, B.; Zhang, Y.; Tang, P. Carbohydrate chemistry in the total synthesis of saponins. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 5145-5161.
14. Yogeewari, P.; Sriram, D. Betulinic acid and its derivatives: A review on their biological properties. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 657-666.
15. Sami, A.; Taru, M.; Salme, K.; Jari, Y.-K. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *29*, 1-13.
16. Kessler, J. H.; Mullauer, F. B.; de Roo, G. M.; Medema, J. P. Broad in vitro efficacy of plant-derived betulinic acid against cell lines derived from the most prevalent human cancer types. *Cancer Lett.* **2007**, *25*, 132-145.
17. Pisha, E.; Chai, H.; Lee, I.-S.; Chagwedera, T. E.; Farnsworth, N. R.; Cordell, G. A.; Beecher, C. W. W.; Fong, H. H. S.; Kinghorn, A. D.; Brown, D. M.; Wani, M. C.; Wall, M. E.; Hieken, T. J.; Das Gupta, T. K.; Pezzuto, J. M. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat. Med.* **1995**, *1*, 1046-1051.
18. Zuco, V.; Supino, R.; Righetti, S. C.; Cleris, L.; Marchesi, E.; Gambacorti-Passerini, C.; Formelli, F. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Lett.* **2002**, *175*, 17-25.

19. Cichewicz, R. H.; Kouzi, S. A. Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. *Med. Res. Rev.* **2004**, *24*, 90-114.
20. Eiznhamer, D. A.; Xu, Z.-Q. Betulinic acid: A promising anticancer candidate. *IDrugs* **2004**, *7*, 359-373.
21. Bang Son, L.; Kaplun, A. P.; Symon, A. V.; Shpilevsky, A. A. Solubilization of betulinic acid, a new antimelanoma compound. *Proceed. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* **1998**, *25*, 419-420.
22. Jäger, S.; Winkler, K.; Pfüller, U.; Scheffler, A. Solubility studies of oleanolic acid and betulinic acid in aqueous solutions and plant extracts of *Viscum album* L. *Planta Med.* **2007**, *73*, 157-162.
23. Krasutsky, P. A. Birch bark research and development. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 919-942.
24. Kvasnica, M.; Sarek, J.; Klinitova, E.; Dzubak, P.; Hajduch, M. Synthesis of phthalates of betulinic acid and betulin with cytotoxic activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3447-3454.
25. Jeong, H.-J.; Chai, H.-B.; Park, S.-Y.; Kim, D. S. H. L. Preparation of amino acid conjugates of betulinic acid with activity against human melanoma. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1201-1204.
26. Saxena, B. B.; Zhu, L.; Hao, M.; Kisilis, E.; Katdare, M.; Oktem, O.; Bomshteyn, A.; Rathnam, P. Boc-lysinated-betulonic acid: A potent, anti-prostate cancer agent. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6349-6358.
27. Gauthier, C.; Legault, J.; Lebrun, M.; Dufour, P.; Pichette, A. Glycosidation of lupane-type triterpenoids as potent in vitro cytotoxic agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6713-6725.
28. Thibeault, D.; Gauthier, C.; Legault, J.; Bouchard, J.; Dufour, P.; Pichette, A. Synthesis and structure-activity relationships study of cytotoxic germanicane- and lupane-type 3 β -*O*-monodesmosidic saponins starting from betulin. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6144-6157.
29. Mimaki, Y.; Yokosuka, A.; Kuroda, M.; Hamanaka, M.; Sakuma, C.; Sashida, Y. New bidesmosidic triterpene saponins from the roots of *Pulsatilla chinensis*. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1226-1229.

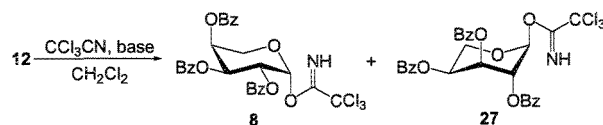
30. Braca, A.; Autore, G.; De Simone, F.; Marzocco, S.; Morelli, I.; Venturella, F.; De Tommasi, N. Cytotoxic saponins from *Schefflera rotundifolia*. *Planta Med.* **2004**, *70*, 960-966.
31. Bang, S.-C.; Kim, Y.; Lee, J.-H.; Ahn, B.-Z. Triterpenoid saponins from the roots of *Pulsatilla koreana*. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 268-272.
32. Ohara, S.; Hishiyama, S. Utilization of triterpenoids I. Synthesis of betulin glycosides by cyclodextrin glycosyltransferase. *Mokuzai Gakkaishi* **1994**, *40*, 444-451.
33. Klinitová, E.; Křeček, V.; Klinot, J.; Endová, M.; Eisenreichová, J.; Buděšínský, M.; Štícha, M. Glycosylation of triterpene alcohols and acids of the lupane and a-secolupane series. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1997**, *62*, 1776-1798.
34. Ohara, S.; Ohira, T. Plant growth regulation effects of triterpenoid saponins. *J. Wood Sci.* **2003**, *49*, 59-64.
35. Samoshina, N. F.; Denisenko, M. V.; Denisenko, V. A.; Uvarova, N. I. Synthesis of glycosides of lupane-type triterpene acids. *Chem. Nat. Compd.* **2003**, *39*, 575-582.
36. Pakulski, Z. Regioselective glycosylation of unprotected mannosides: A convenient access to high-mannose type saponins. *Polish. J. Chem.* **2005**, *79*, 361-367.
37. Cmoch, P.; Pakulski, Z.; Swaczynová, J.; Strnad, M. Synthesis of lupane-type saponins bearing mannosyl and 3,6-branched trimannosyl residues and their evaluation as anticancer agents. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 995-1003.
38. Park, H.-J.; Kwon, S.-H.; Lee, J.-H.; Lee, K.-H.; Miyamoto, K.-I.; Lee, K.-T. Kalopanaxsaponin A is a basic saponin structure for the anti-tumor activity of hederagenin monodesmosides. *Planta Med.* **2001**, *67*, 118-121.
39. Bang, S.-C.; Lee, J.-H.; Song, G.-Y.; Kim, D.-H.; Yoon, M.-Y.; Ahn, B.-Z. Antitumor activity of *Pulsatilla koreana* saponins and their structure-activity relationship. *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, *53*, 1451-1454.
40. Bang, S.-C.; Seo, H.-S.; Yun, H.-Y.; Jung, S.-H. Facile synthesis of trisaccharide moiety corresponding to antitumor activity in triterpenoid

- saponins isolated from *Pulsatilla* roots. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 1734-1739.
41. Gao, X.-D.; Ye, W.-C.; Yu, A. C. H.; Zhang, Y.; Tan, R.-X.; Li, M.; Hsiao, W. L. W. Pulsatilloside A and Anemoside A₃ protect PC12 cells from apoptosis induced by sodium cyanide and glucose deprivation. *Planta Med.* **2003**, *69*, 171-174.
 42. Glebko, L. I.; Krasovskaj, N. P.; Strigina, L. I.; Ulanova, K. P.; Denisenko, V. A.; Dmitrenok, P. S. Triterpene glycosides from *Pulsatilla chinensis*. *Russ. Chem. B.* **2002**, *51*, 1945-1950.
 43. Ye, W.; Zhang, Q.; Hsiao, W. W. L.; Zhao, S.; Che, C.-T. New lupane glycosides from *Pulsatilla chinensis*. *Planta Med.* **2002**, *68*, 183-186.
 44. Plé, K.; Chwalek, M.; Voutquenne-Nazabadioko, L. Synthesis of α -hederin, δ -hederin, and related triterpenoid saponins. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 1588-1603.
 45. Plé, K.; Chwalek, M.; Voutquenne-Nazabadioko, L. Synthesis of L-arabinopyranose containing hederagenin saponins. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 4347-4362.
 46. Yan, M.-C.; Liu, Y.; Lu, W.-X.; Wang, H.; Sha, Y.; Cheng, M.-S. Facile synthesis and cytotoxicity of triterpenoid saponins bearing a unique disaccharide moiety: Hederacolchiside A₁ and its analogues. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 780-784.
 47. Pellissier, H. The glycosylation of steroids. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 5123-5162.
 48. Wang, P.; Li, C.; Zang, J.; Song, N.; Zhang, X.; Li, Y. Synthesis of two bidesmosidic ursolic acid saponins bearing a 2,3-branched trisaccharide residue. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 2086-2096.
 49. Peng, W.; Han, X.; Yu, B. Synthesis of typical glucuronide-containing saponin, 28-O- β -D-glucopyranosyl oleanate 3-O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucuronopyranoside. *Synthesis* **2004**, *10*, 1641-1647.

50. Schmidt, R. R. Anomeric-oxygen activation for glycoside synthesis: The trichloroacetimidate method. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, *50*, 21-123.
51. Deng, S.; Yu, B.; Xie, J.; Hui, Y. Highly efficient glycosylation of sapogenin. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7265-7266.
52. Li, C.-X.; Zang, J.; Wang, P.; Zhang, X.-L.; Guan, H.-S.; Li, Y.-X. Synthesis of two natural oleanolic acid saponins. *Chinese J. Chem.* **2006**, *24*, 509-517.
53. Peng, W.; Sun, J.; Lin, F.; Han, X.; Yu, B. Facile synthesis of ginsenoside Ro. *Synlett* **2004**, *2*, 259-262.
54. Yu, B.; Xie, J.; Deng, S.; Hui, Y. First synthesis of a bidesmosidic triterpene saponin by a highly efficient procedure. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 12196-12197.
55. Du, Y.; Pan, Q.; Kong, F. Synthesis of a tetrasaccharide representing a minimal epitope of an arabinogalactan. *Carbohydr. Res.* **2000**, *323*, 28-35.
56. Gandolfi-Donadio, L.; Gallo-Rodriguez, C.; de Lederkremer, R. M. Facile synthesis of α -D-Araf-(1 \rightarrow 5)-D-Galf, the linker unit of the arabinan to the galactan in *Mycobacterium tuberculosis*. *Can. J. Chem.* **2006**, *84*, 486-491.
57. Zhang, Y.; Li, Y.; Zhu, S.; Guan, H.; Lin, F.; Yu, B. Synthesis of bidesmosidic dihydrodiosgenin saponins bearing a 3-O- β -chacotriosyl moiety. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 1753-1759.
58. Plaza, A.; Cinco, M.; Tubaro, A.; Pizza, C.; Piacente, X. New triterpene glycosides from the stems of *Anomospermum grandifolium*. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1606-1610.
59. Voutquenne, L.; Guinot, P.; Froissard, C.; Thoison, O.; Litaudon, M.; Lavaud, C. Haemolytic acylated triterpenoid saponins from *Harpullia austrocaledonica*. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 825-835.
60. Deng, S.; Yu, B.; Hui, Y.; Yu, H.; Han, X. Synthesis of three diosgenyl saponins: Dioscin, polyphyllin D, and balanitin 7. *Carbohydr. Res.* **1999**, *317*, 53-62.
61. Li, B.; Yu, B.; Hui, Y.; Li, M.; Han, X.; Fung, K.-P. An improved synthesis of the saponin, polyphyllin D. *Carbohydr. Res.* **2001**, *331*, 1-7.

62. Roy, B.; Pramanik, K.; Mukhopadhyay, B. Synthesis of a tetra- and a trisaccharide related to an anti-tumor saponin "Julibroside J₂₈" from *Albizia julibrissin*. *Glycoconj. J.* **2008**, *25*, 157-166.
63. Cheng, M.-S.; Yan, M.-C.; Liu, Y.; Zheng, L.-G.; Liu, J. Synthesis of β -hederin and hederacolchiside A₁: Triterpenoid saponins bearing a unique cytotoxicity-inducing disaccharide moiety. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 60-67.
64. Agrawal, P. K. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3307-3330.
65. Liu, Y.; Ding, N.; Xiao, H.; Li, Y. Efficient syntheses of a series of glycosphingolipids with 1,2-*trans*-glycosidic linkages. *J. Carbohydr. Chem.* **2006**, *25*, 471-489.
66. Levy, D. E.; Fügedi, P. In *The Organic Chemistry of Sugars*. CRC Press: Boca Raton, 2006.
67. Bliard, C.; Massiot, G.; Nazabadioko, S. Glycosylation of acids under phase transfer conditions. Partial synthesis of saponins. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 6107-6108.
68. Hall, L. D.; Manville, J. F. The favored conformation of 2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -D-xylopyranosyl fluoride and other pentopyranosyl fluorides: The anomeric affect of a fluorine substituent. *Carbohydr. Res.* **1967**, *4*, 512-513.
69. Gu, G.; Du, Y.; Linhardt, R. J. Facile synthesis of saponins containing 2,3-branched oligosaccharides by using partially protected glycosyl donors. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5497-5500.
70. Piacente, S.; Pizza, C. New dammarane-type glycosides from *Gynostemma pentaphyllum*. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 512-519.
71. Schimmel, J.; Passos Eleutério, M. I.; Ritter, G.; Schmidt, R. R. Synthesis of saponins with cholestanol, cholesterol, and friedelanol as aglycones. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 1701-1721.
72. Yokosuka, A.; Kawakami, S.; Haraguchi, M.; Mimaki, Y. Stryphnosides A-F, six new triterpene glycosides from the pericarps of *Stryphnodendron fissuratum*. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 1474-148.

Table 1. Synthesis of 2,3,4-tri-*O*-benzoyl-L-arabinopyranosyl trichloroacetimidates ⁴C₁ (**8**) and ¹C₄ (**27**)^a



Entry	Base (equiv)	Yield (%)	
		8	27
1	DBU (0.5)	80	-
2	CS ₂ CO ₃ (0.2)	79	11
3	NaH (0.8)	42	42
4	K ₂ CO ₃ (1.0)	20	66

^a Reactions were performed overnight at room temperature with 8.0 equiv of CCl_3CN and 8 mL/mmol of CH_2Cl_2 at 0.22 mmol scale.

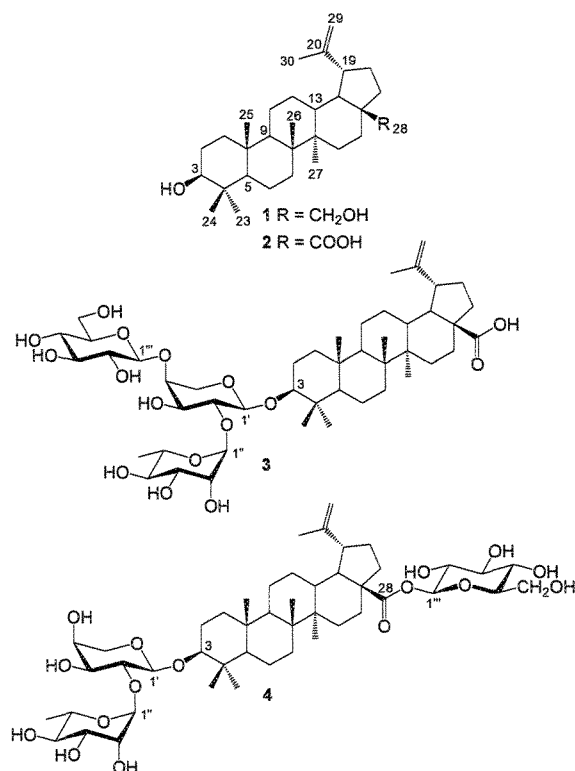


Figure 1. Structures of betulin (1), betulinic acid (2) and natural betulinic acid saponins (3, 4).

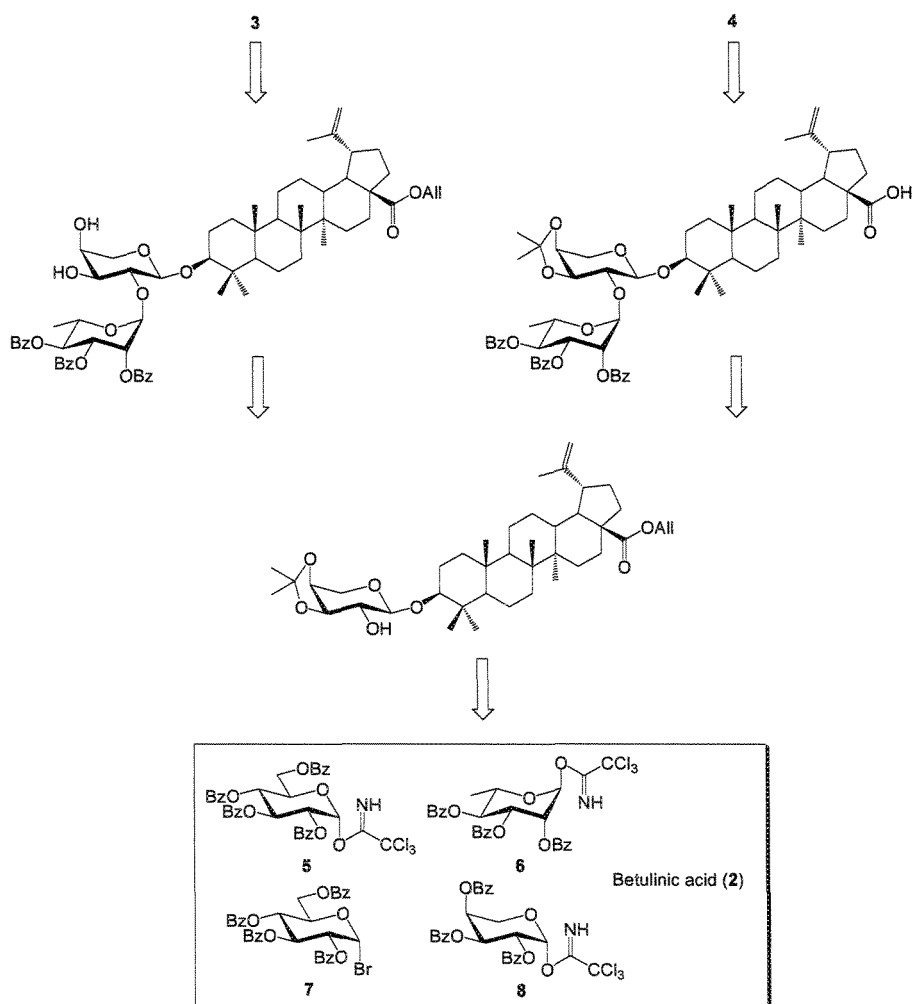


Figure 2. Retrosynthetic analysis of betulinic acid 3β-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-[β-D-glucopyranosyl-(1→4)]-α-L-arabinopyranoside (3) and 28-O-β-D-glucopyranosyl betulinic acid 3β-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-α-L-arabinopyranoside (4).

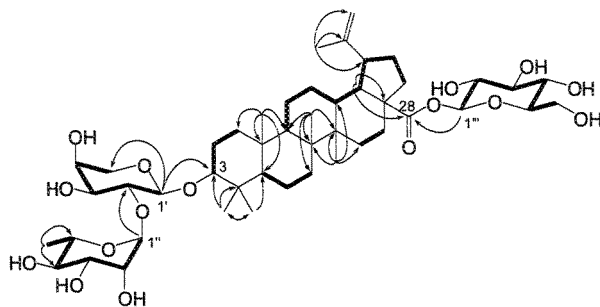


Figure 3. Selected key COSY (—) and HMBC ($^1\text{H}\rightarrow^{13}\text{C}$) correlations of saponin 4.

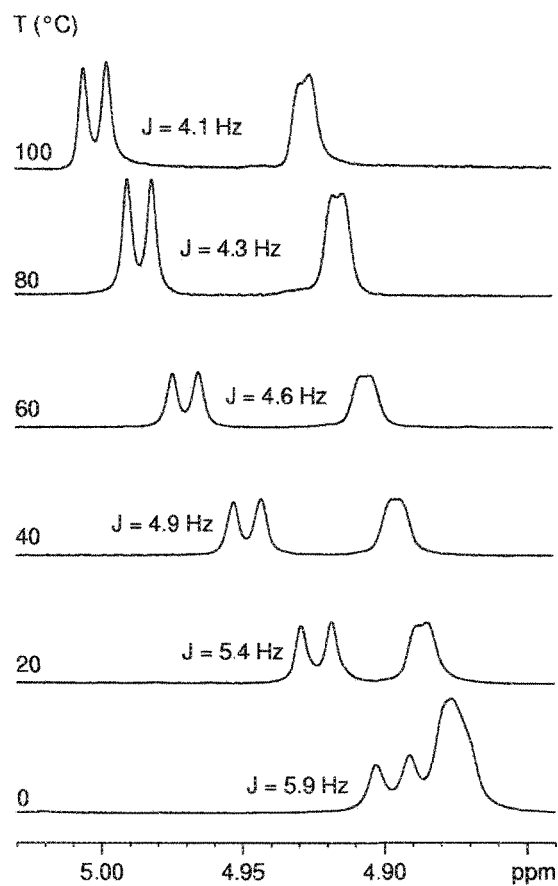
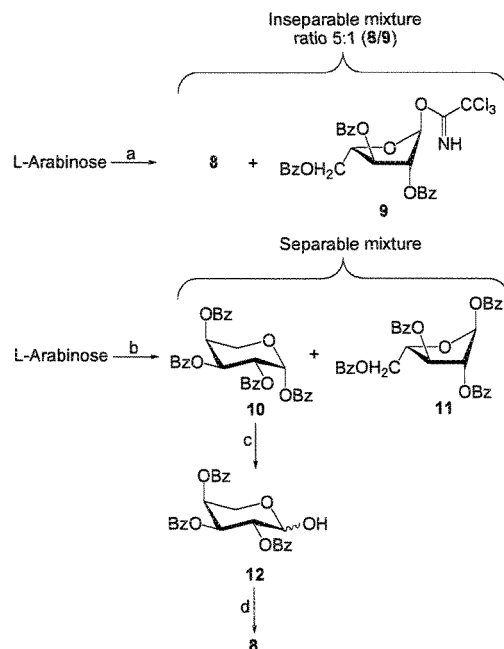
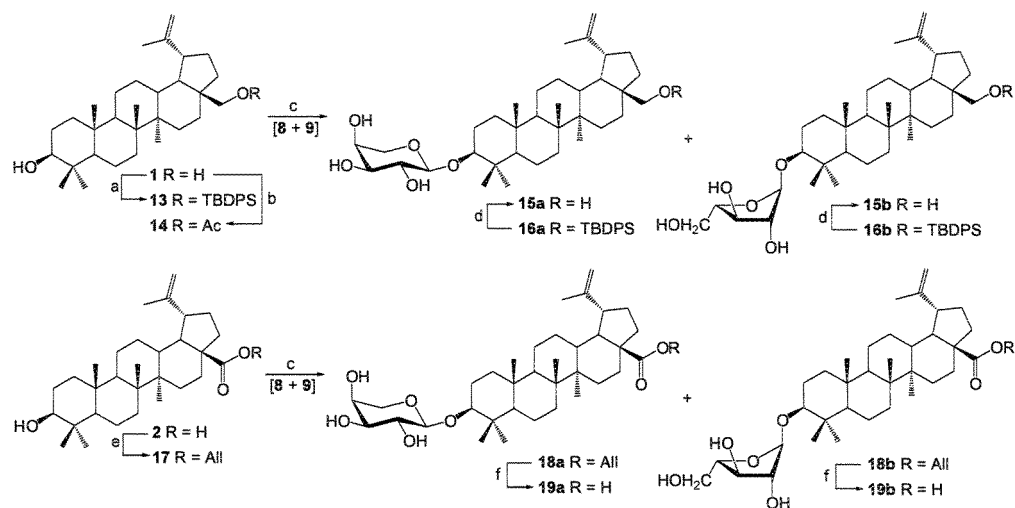


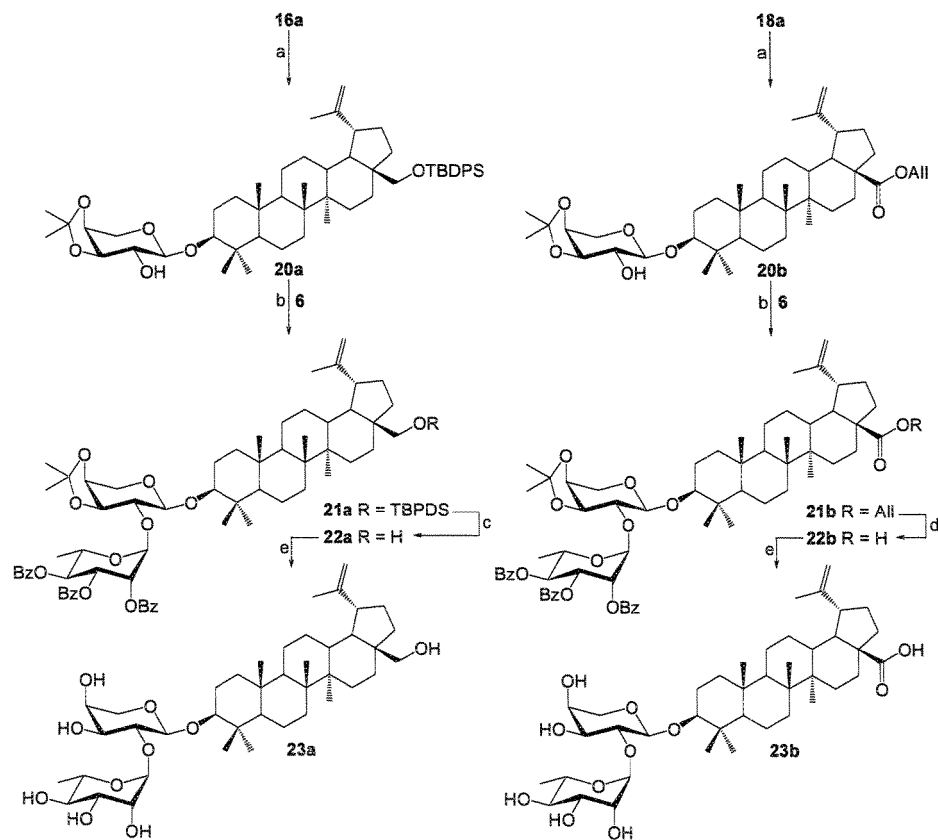
Figure 4. Temperature dependence of the H-1' anomeric signal of the arabinopyranosyl moiety of saponin 4 suggesting its high conformational mobility (^1H NMR 500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).



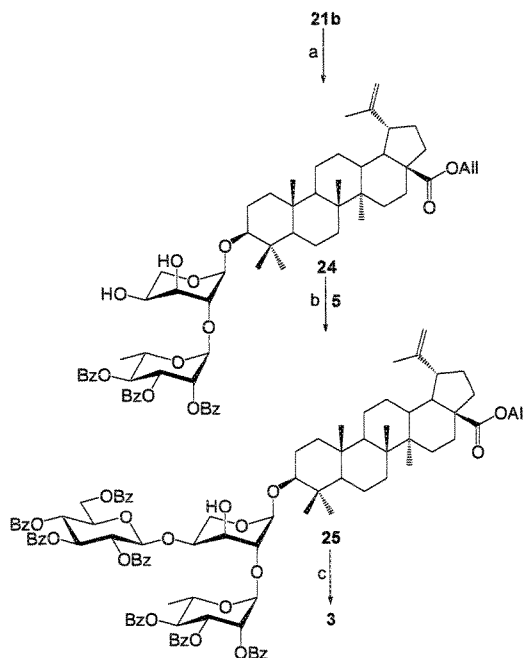
Scheme 1. Synthesis of L-arabinosyl donors (**8**, **9**). Reagents and conditions: (a) (i) BzCl (6.5 equiv), DMAP (0.01 equiv), Py, rt to 60 °C, overnight; (ii) HBr/HOAc 33%, CH₂Cl₂, rt, 2 h; (iii) Ag₂CO₃ (1.35 equiv), acetone/H₂O 20:1, rt, 1.5 h; (iv) CCl₃CN (8.0 equiv), DBU (0.5 equiv), CH₂Cl₂, rt, 4 days, 38% (four steps); (b) BzCl (6.5 equiv), DMAP (0.01 equiv), Py, rt, overnight, 91% for **10**; 1% for **11** (c) (i) HBr/HOAc 33%, CH₂Cl₂, rt, 2 h; (ii) Ag₂CO₃ (1.35 equiv), acetone/H₂O 20:1, rt, 1.5 h, 73% (two steps); (d) CCl₃CN (8.0 equiv), DBU (0.5 equiv), CH₂Cl₂, rt, 45 min, 80%.



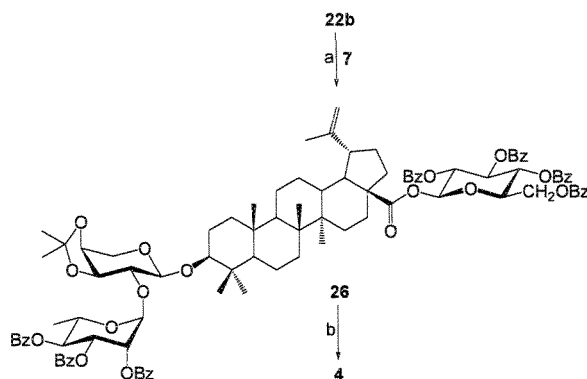
Scheme 2. Synthesis of 3 β -O- α -L-arabinopyranosides (**15a**, **19a**) and 3 β -O- α -L-arabinofuranosides (**15b**, **19b**). Reagents and conditions: (a) TBDPSCl (1.5 equiv), imidazole (2.5 equiv), DMAP (0.1 equiv), THF, reflux, overnight, 90%; (b) Ac₂O (1.05 equiv), Py, DMAP (0.1 equiv), rt, 2 h, 73%; (c) (i) TCA (1.5 equiv), TMSOTf (0.1 equiv), 4 Å MS, CH₂Cl₂, rt, 2 h; (ii) NaOH (20 equiv), MeOH/THF/H₂O 1:2:1, rt, overnight, 73% for **15a** (two steps); 15% for **15b** (two steps); 84% for **16a** (two steps); 13% for **16b** (two steps); 67% for **18a** (two steps); 11% for **18b** (two steps); (d) 1 M TBAF/HOAc 1:1, THF, reflux, overnight, 42% for **15a**; 37% for **15b**; (e) AllBr (2.0 equiv), K₂CO₃ (3.0 equiv), DMF, 55 °C, 7 h, 84%; (f) Pd⁰(PPh₃)₄ (0.3 equiv), PPh₃ (0.6 equiv), pyrrolidine (2.0 equiv), THF, rt, 4 h, 66% for **19a**; 71% for **19b**.



Scheme 3. Synthesis of 3 β -O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosides **23a** and **23b**. Reagents and conditions: (a) PPTs (0.1 equiv), 2,2-DMP (10 equiv), acetone, rt, overnight and 60% for **20a**; 3.5 h and 74% for **20b**; (b) TCA (1.5 equiv), $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (0.7 equiv), 4 Å MS, CH_2Cl_2 , -78 °C, 1.5 h, 78% for **21a**; 99% for **21b**; (c) 1 M TBAF/HOAc 1:1, THF, reflux, overnight, 72% for **22a**; (d) $\text{Pd}^0(\text{PPh}_3)_4$ (0.3 equiv), PPh_3 (0.6 equiv), pyrrolidine (2.0 equiv), THF, rt, 4 h, 85% for **22b**; (e) (i) TsOH \cdot H₂O (0.7 equiv), CH_2Cl_2 /MeOH 1:2, rt, overnight; (ii) NaOH (20 equiv), MeOH/THF/H₂O 1:2:1, rt, 4.5 h, 84% for **23a** (two steps); 61% for **23b** (two steps).



Scheme 4. Completion of the synthesis of natural betulinic acid saponin **3**. Reagents and conditions: (a) TsOH•H₂O (0.7 equiv), CH₂Cl₂/MeOH 1:2, rt overnight, 70%; (b) TCA (1.5 equiv), TMSOTf (0.1 equiv), 4 Å MS, CH₂Cl₂, -10 °C to rt, 3 h, 50%; (c) (i) Pd⁰(PPh₃)₄ (0.3 equiv), PPh₃ (0.6 equiv), pyrrolidine (2.0 equiv), rt, 4.5 h; (ii) NaOH (20 equiv), MeOH/THF/H₂O 1:2:1, rt, 6 h, 60% (two steps).



Scheme 5. Completion of the synthesis of natural betulinic acid saponin **4**. Reagents and conditions: (a) Sugar donor (1.5 equiv), K_2CO_3 (2.5 equiv), Bu_4NBr (0.4 equiv), CH_2Cl_2/H_2O 1:1, reflux, 6 h, 78%; (b) (i) $TsOH \cdot H_2O$ (0.7 equiv), $CH_2Cl_2/MeOH$ 1:2, rt, overnight; (ii) $NaOH$ (20 equiv), $MeOH/THF/H_2O$ 1:2:1, rt, 4 h, 82% (two steps).

CHAPITRE 4

SYNTHESIS AND CYTOTOXICITY OF BIDESMOSIDIC BETULIN AND BETULINIC ACID SAPONINS

Charles Gauthier, Jean Legault, Serge Lavoie, Simon Rondeau, Samuel
Tremblay and André Pichette[†]

*Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales, Département des
Sciences Fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, 555 boul. de
l'Université, Chicoutimi, (Québec), Canada, G7H 2B1*

(Article accepté dans *Journal of Natural Products* #np-2008-00579x)

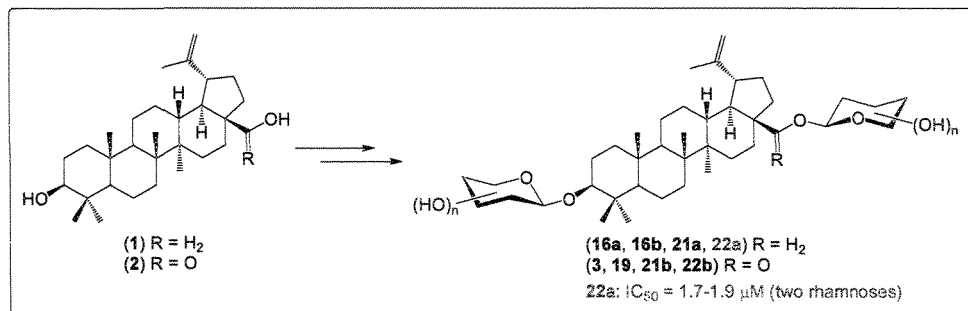
Keywords: Bidesmosidic saponin; triterpene; lupane; betulinic acid; betulin;
anticancer.

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

CONTRIBUTION DES AUTEURS

L'auteur principal de cet article (C. Gauthier) a rédigé toutes les sections du manuscrit en plus d'effectuer la synthèse et la purification de tous les nouveaux composés. S. Lavoie a contribué à l'analyse RMN détaillée des composés. S. Rondeau et S. Tremblay ont participé, dans le cadre d'un stage d'été, à la synthèse organique et à la purification des composés. J. Legault et A. Pichette sont, respectivement, les co-directeur et directeur du présent projet de thèse.

RÉSUMÉ GRAPHIQUE



RÉSUMÉ

Cet article décrit la première synthèse d'une saponine naturelle d'acide bétulinique, 3β -*O*-(α -L-arabinopyranosyl)-lup-20(29)-ene-28-*O*- β -D-glucopyranosyl ester (**3**), ainsi que de sept autres saponines bidesmosidiques à génine de type lupane. Les bidesmosides ont été préparés efficacement à l'aide de diverses procédures de glycosylation telles que la méthode inverse de Schmidt et les réactions catalysées par transfert de phase. Les tests *in vitro* d'activité cytotoxique ont mis en évidence que la saponine bidesmosidique de bétulinol **22a** porteuses de sections α -L-rhamnopyranose aux positions C-3 et C-28 inhibent fortement (IC_{50} 1,7-1,9 μ M) la croissance des cellules en culture provenant de cancers ayant une grande prévalence dans la population (poumon, côlon, prostate et sein).

ABSTRACT

The naturally occurring cytotoxic saponin, 28-*O*- β -D-glucopyranosyl betulinic acid 3 β -*O*- α -L-arabinopyranoside (**3**), was easily synthesized along with seven bidesmosidic saponins starting from the lupane-type triterpenoids betulin (**1**) and betulinic acid (**2**). As highlighted by the preliminary cytotoxicity evaluation against A549, DLD-1, MCF7 and PC-3 human cancer cell lines, the bidesmosidic betulin saponin **22a** bearing α -L-rhamnopyranoside moieties at both C-3 and C-28 positions was determined to be a potent cytotoxic agent (IC₅₀ 1.8-1.9 μ M).

INTRODUCTION

Bidesmosidic saponins are naturally occurring compounds, which consist of a triterpenoid or steroid aglycone bearing two sugar moieties usually at the C-3 and C-28 positions.¹ Biological activities exhibited by saponins are quite diversified (cytotoxic, antitumor, anti-inflammatory, molluscicidal) and have been reviewed extensively.² However, clinical development of saponins as pharmacological agents is strongly hampered because of their haemolytic activity inducing toxicity in most animals when delivered intravenously.³ Interestingly, it has been reported that bidesmosidic saponins are considerably less haemolytic compared to monodesmosides⁴ and thus represent attractive chemical targets for structure-activity relationships (SAR) studies.

The first synthesis of a bidesmosidic saponin was achieved by the group of Biao Yu⁵ in 1999. Since this accomplishment, several syntheses of bidesmosides have been published although most of them are solely related to diosgenin⁶⁻⁸ or oleanolic acid^{5,9-12} as aglycones. Betulin (**1**) and betulinic acid (**2**) are cytotoxic lupane-type triterpenoids widely distributed in nature.^{13,14} Synthesis of monodesmosidic lupane-type saponins has been reported by us^{15,16} and by other groups.¹⁷⁻²² However, to our knowledge, the only example of the synthesis of betulinic acid bidesmosides is the preparation of the 3,28-bis- β -D-glucopyranoside derivative.²⁰ Natural bidesmosidic saponins of the lupane-type are scarce and have been isolated principally from plant species of the *Schefflera*²³⁻²⁵ and *Pulsatilla*²⁶⁻²⁸ genera. Braca and co-workers²⁵ isolated the 3 β -O-(α -L-arabinopyranosyl)-lup-20(29)-ene-28-O- β -D-glucopyranosyl ester (**3**) (Figure 1) from the aerial parts of *S. rotundifolia*, a plant used as a folk remedy in Asian countries. Bidesmosidic saponin **3** exhibited noticeable cytotoxic activity against J774.A1, HEK-293 and WEHI-164 cell lines and was found, in this study, to be more active than glycosides having oleanolic acid or hederagenin as aglycones.

We now report the synthesis of the natural bidesmosidic betulinic acid saponin **3** along with seven other bidesmosides (**16a**, **16b**, **19**, **21a**, **21b**, **22a** and **22b**) containing D-glucose, L-rhamnose and L-arabinose moieties starting from the parent triterpenoids betulin (**1**) and betulinic acid (**2**). The *in vitro* cytotoxic activity of the synthesized saponins was evaluated against human cancer cell lines (A549, DLD-1, MCF7 and PC-3).

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis of bidesmosides

In order to synthesize bidesmosidic betulin saponins, we first planned to introduce arabinopyranosyl or rhamnopyranosyl moieties at the C-3 position of **1** prior to glucosylating the C-28 position. As depicted in Scheme 1, betulin (**1**)¹⁵ was treated with *tert*-butyldiphenylsilyl chloride (TBDPSCI) in conjunction with imidazole and 4-dimethylaminopyridine (DMAP) in refluxing tetrahydrofuran (THF) to give **9** (90%) protected at the C-28 primary hydroxyl position.⁷ The latter was glycosylated with the known 2,3,4-tri-*O*-benzoyl- β -L-arabinopyranosyl trichloroacetimidate (**7**)⁵ or 2,3,4-tri-*O*- α -L-rhamnopyranosyl trichloroacetimidate (**8**)²⁹ (Figure 2) under the promotion of the Lewis acid trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (TMSOTf) in dry CH₂Cl₂ at room temperature to afford protected monodesmosides **10a** and **10b** in yields of 71% and 76%, respectively. De-silylation of **10a** and **10b** under standard conditions⁷, i.e. tetrabutylammonium bromide (TBAF) and acetic acid (HOAc) in refluxing THF, readily furnished benzoylated betulin saponins **11a** (75%) and **11b** (87%). Since the next step consisted in the glucosylation at the C-28 position, we tried to couple 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- α -D-glucopyranosyl trichloroacetimidate³⁰ with **11a** using the above mentioned glycosylation conditions. However, the reaction afforded the rearrangement product allobetulin 3 β -*O*-2,3,4-tri-*O*-benzoyl- α -L-arabinopyranoside in 42% yield with no trace of the desired bidesmosidic glycoside **12a**. Similar treatment of the acceptor **11b** with the donor **4** led to the exclusive formation of the *trans*-esterification product 28-*O*-benzoyl betulin 3 β -*O*-2,3,4-tri-*O*-

benzoyl- α -L-rhamnopyranoside in 42% yield. As shown in Scheme 1, further modifications of the glycosylation conditions were considered using the acceptor **11b** in conjunction with various glucosyl donors (**4-6**) and promoters such as boron trifluoride diethyl etherate ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$) and silver trifluoromethanesulfonate (AgOTf). Both the Schmidt's inverse procedure³¹ and phase-transfer conditions³² were also tried in order to glucosylate the C-28 position of **11b**. Unfortunately, all these attempts failed to yield the target bidesmoside **12b**. Instead, rapid decomposition of sugar donor (**4-6**) was generally observed based on TLC analysis. It is worth noting that **11b** was nearly quantitatively transformed into allobetulin 3β -*O*-2,3,4-tri-*O*-benzoyl- α -L-rhamnopyranoside when the Lewis acid AgOTf was used as promoter of the glycosylation reaction. The yields of the rearrangement were comparable to those reported by Li and co-workers for the preparation of allobetulin from betulin (**1**) catalysed by solid acids.³³

Therefore, we turned to another approach for the synthesis of bidesmosidic betulin saponins. According to Scheme 2, the known betulin 3-acetate (**13**)¹⁶ was prepared in good yield (86%, two steps) from **1** following a reported procedure. Once again, attempts to glucosylate the acceptor **13** with **4** under the catalytic action of TMSOTf (0.1 equiv) in dry CH_2Cl_2 (20 mL/mmol) afforded rearrangement products (allobetulin 3-acetate, 30% yield) and *trans*-esterification (28-*O*-benzoyl betulin 3-acetate, 17% yield) instead of the desired glycoside **14**. However, condensation of **13** and **4** proceeded smoothly to furnish **14** (60% yield) when only 0.05 equiv of TMSOTf was used in 40 mL/mmol of dry CH_2Cl_2 . Thereafter, deacetylation of the C-3 position was achieved by treatment of **14** with acetyl chloride (AcCl)³⁴ in dry $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1:2 to afford **15** in good yield (75%). The latter acceptor was coupled with the donors **7** or **8** using TMSOTf as the promoter to give the fully benzoylated bidesmosides **12a** (62%) and **12b** (72%), which were deprotected using standard conditions (NaOH , $\text{MeOH}/\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ 1:2:1) to provide the target bidesmosidic betulin saponins **16a** and **16b** in excellent yields (86% and 80%, respectively). The overall yields for the syntheses were 24% for **16a** and 26% for **16b** over four linear steps starting from betulin 3-acetate (**13**).

Synthesis of the natural bidesmosidic betulinic acid saponin **3** along with the non-natural saponin **19** was achieved in a straightforward manner. As depicted in Scheme 3, the lupane-type triterpenoid betulinic acid (**2**) was condensed with the known donor 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- α -D-glucopyranosyl bromide (**6**)³⁵ under phase-transfer conditions³² using K₂CO₃ and TBAF in a refluxing solution of CH₂Cl₂/H₂O 1:1 to furnish **17** in excellent yield (90%). The latter was coupled with the donors **7** or **8** under the promotion of TMSOTf to afford **18a** (63%) and **18b** (86%). Subsequent removal of the benzoyl groups by treatment with NaOH in MeOH/THF/H₂O provided the target bidesmosidic saponins **3** (75%) and **19** (81%). The overall yields for the syntheses were 43% for **3** and 63% for **19** over three linear steps starting from **1**. Unexpectedly, it was found that the physical and analytical data (¹H NMR, ¹³C NMR and [α]_D) of saponin **3** were not in agreement with those reported for the natural product isolated from *S. rotundifolia*.²⁵

Surprisingly, glucosylation at the C-3 position of 28-*O*-2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- β -D-glucopyranosyl betulinic acid (**17**) proved to be very difficult. In fact, as shown in Scheme 4, all attempts to condense the acceptor **17** with either the trichloroacetimidate sugar donor **4** under Schmidt's normal³⁶ and inverse procedure³¹ or the bromide sugar donor **6** in conjunction with silver oxide (Ag₂O)³⁷ and AgOTf³⁸ (modified Koenigs-Knorr methods) failed to yield the fully protected bidesmosidic betulinic acid saponin **20**. According to TLC and NMR analysis, no coupling product was observed in any assays and the acceptor **17** was nearly fully recovered. Thus, we chose to adopt another strategy in which the unprotected betulin (**1**) and betulinic acid (**2**) are glycosylated at both C-3 and C-28 positions via Schmidt's inverse procedure³¹ (Scheme 5). Using this methodology, the acceptors (**1** or **2**) and the promoter (TMSOTf) were premixed before the dropwise addition of the sugar donors (**4** or **8**, 3 equiv) at low temperature (-10 °C). Deprotection of the crude product (NaOH, MeOH/THF/H₂O) and purification by C-18 inverted phase flash chromatography afforded the target saponins (**21a**, **21b**, **22a** and **22b**) in yields ranging from 37 to 84% over two steps. As expected, the 1,2-*trans*-glycosidic linkage (α -L-rhamnoside and β -D-glucoside) of saponins was clearly proved by ¹H

NMR analysis (δ 4.98, d, $J_{1,2}$ 7.8 Hz and δ 4.30, d, $J_{1,2}$ 7.6 Hz, H-1' for **21a** and **21b**; δ 4.76, br s and δ 4.72, d, $J_{1,2}$ 1.3 Hz, H-1' for **22a** and **22b**).³⁹

Cytotoxicity evaluation

In vitro cytotoxic activity of lupane-type bidesmosidic saponins was evaluated against four human cancer cell lines including lung carcinoma (A549), and colorectal (DLD-1), breast (MCF7) and prostate (PC-3) adenocarcinomas. These cancer cell lines were chosen as cellular models since they are quite prevalent in the population and cause the majority of human cancer deaths.⁴⁰ The parent triterpenoids betulin (**1**),¹⁵ betulinic acid (**2**)⁴¹ and the clinically used etoposide were used as positive controls. The cytotoxicity of 28-O- β -D-glucopyranosides of betulin¹⁵ and betulinic acid¹⁸ was also investigated. Cell viability was assessed through the resazurin reduction test after 48 hours of incubation between compounds and cells.^{42,43} The cytotoxicity results are expressed as the concentration inhibiting 50% of the cell growth (IC₅₀). As shown in Table 1, betulin (**1**) and betulinic acid (**2**) inhibited cancer cell growth with IC₅₀ ranging from 3.8 to 23.3 μ M and 10.3 to 41 μ M, respectively. It is worth noting that these natural triterpenoids were significantly more cytotoxic against A549 and DLD-1 cell lines ($P < 0.05$). Moreover, cytotoxic activity was also assessed against human normal skin fibroblasts (WS1), but no selectivity was observed for the new series of bidesmosidic saponins.

It had been shown in previous structure-activity relationship (SAR) studies that the free C-28 carboxylic acid function is important to preserve the cytotoxicity of betulinic acid (**2**).^{18,44-46} As revealed in Table 1, in our SAR study, this assertion was verified for the two monodesmosidic betulin and betulinic acid saponins bearing a single glucopyranoside moiety at C-28 (IC₅₀ >100 μ M). On the other hand, the cytotoxicity profile of most of the synthesized bidesmosidic saponins bearing an additional sugar moiety at C-3 was generally similar or higher than betulinic acid (**2**) against tested cancer cell lines. Bidesmosidic saponins **21a** and **21b** were the sole exceptions to this general tendency since the presence of β -D-glucopyranoside

moieties at both C-3 and C-28 positions seems to have a detrimental effect on cytotoxicity. Nevertheless, saponins **21a** and **21b** were preferentially cytotoxic and significantly ($P < 0.05$) more active than betulinic acid (**2**) against breast adenocarcinoma (MCF7) cells (IC_{50} 14.5 and 20 μ M, respectively).

It is noteworthy that the natural bidesmosidic betulinic acid saponin **3**, which features an α -L-arabinopyranoside moiety at C-3, was only moderately cytotoxic against the cancer lines (IC_{50} 23-76 μ M) whereas the betulin analogue **16a** bearing the same sugar residues was more cytotoxic than betulinic acid (**2**) against MCF7 and PC-3 cell lines (IC_{50} 9.5 and 5.3 μ M, respectively).

In this SAR study, the most active saponins were generally those bearing α -L-rhamnopyranoside moieties. Indeed, bidesmosides **16b**, **19**, **22a** and **22b** inhibited the growth of human cancer cell lines with IC_{50} values ranging from 1.7 to 23 μ M. Saponins **22a** and **22b** containing an α -L-rhamnopyranoside moiety at both C-3 and C-28 positions were highly cytotoxic against all tested cancer cell lines (IC_{50} 1.7-1.9 and 6.0-7.2 μ M, respectively) and significantly more active than their parent triterpenes ($P < 0.05$). Notably, bidesmosidic betulin saponin **22a** was the most potent of all tested compounds to inhibit the growth of human cancer cell lines. The cytotoxic activity of saponin **22a** was also significantly higher ($P < 0.05$) than betulinic acid 3β -*O*- α -L-rhamnopyranoside (IC_{50} 2.6 μ M, A549)¹⁵, which was shown in previous SAR studies to be the most cytotoxic compound of 44 tested lupane- and germanicane-type triterpenoids and related 3β -*O*-monodesmosidic saponins.^{15,16} The increase in cytotoxicity correlated with the presence of rhamnose moieties was also reported in the literature for solasodine steroidal glycosides.^{47,48} It was suggested that certain types of cancer cells may have protein receptors, such as lectins,⁴⁹⁻⁵¹ that recognize rhamnose moieties and facilitate movement of the drug into the cellular cytoplasm.⁴⁷ Thus, these rhamnose receptors could serve to deliver the anticancer agent directly to the tumor.⁵²⁻⁵⁴ Further investigations are needed to confirm if the strong *in vitro* cytotoxicity of bidesmosidic saponins **22a** and **22b** can be explained

by the binding of their rhamnose moieties to the specific sugar receptors of cancerous cells.

CONCLUSION

In summary, eight bidesmosidic saponins (**3**, **16a**, **16b**, **19**, **21a**, **21b**, **22a** and **22b**) were synthesized in moderate to good overall yields starting from betulin (**1**) and betulinic acid (**2**). The syntheses were achieved by a combination of Schmidt's procedures and phase-transfer conditions using fully benzoylated trichloroacetimidate and sugar bromide donors. This SAR study suggests that the relative cytotoxicities of bidesmosidic betulin and betulinic acid saponins are strongly influenced by the nature of both the aglycone and the sugar moieties. Bidesmosides **22a** and **22b** bearing α -L-rhamnopyranosyl moieties at both C-3 and C-28 positions were highly cytotoxic. Therefore, these preliminary results indicate that bidesmosidic saponins having betulin (**1**) or betulinic acid (**2**) as the aglycone may have clinical potential as anticancer agents. The relatively high polarity of these compounds should facilitate the preparation of non-toxic injectable formulations for further *in vivo* studies on animal models. Work on the evaluation of the haemolytic activity and the mechanism of action of these new "lead" compounds (**22a** and **22b**) is currently in progress in our laboratory and results will be reported in due course.

EXPERIMENTAL SECTION

General methods

Chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich Co. Canada or Alfa Aesar Co. and were used as received. Solvents were obtained from VWR International Co. and were used as received. Air and water sensitive reactions were performed in flame-dried glassware under an argon atmosphere. Moisture sensitive reagents were introduced via a dry syringe. Dichloromethane and acetone were distilled from anhydrous CaH₂ under an argon atmosphere. Tetrahydrofuran (THF) was distilled from sodium/benzophenone ketyl under an argon atmosphere. MeOH was distilled

from Mg and I₂ under an argon atmosphere. Analytical thin-layer chromatography was performed with silica gel 60 F₂₅₄, 0.25 mm pre-coated TLC plates (Silicycle, Québec, Canada). Compounds were visualized using UV₂₅₄ and cerium molybdate (2 g Ce(SO₄)₄(NH₄)₄, 5 g MoO₄(NH₄)₂, 200 mL H₂O, 20 mL H₂SO₄) with charring. Flash column chromatography was carried out using 230-400 mesh silica gel (Silicycle, Québec, Canada). All chemical yields represent the highest result obtained for at least three independent experiments. NMR spectra were recorded on a Bruker Avance spectrometer at 400 MHz (¹H) and 100 MHz (¹³C), equipped with a 5 mm QNP probe. Elucidations of chemical structures were based on ¹H, ¹³C, COSY, TOCSY, HMBC, HSQC and DEPT-135 experiments. Chemical shifts are reported in ppm (δ) relative to tetramethylsilane (TMS). Optical rotations were obtained at the sodium D line at ambient temperature on a Rudolph Research Analytical Autopol IV automatic polarimeter. High-resolution electrospray ionization mass spectra (HR-ESI-MS) were obtained at the Department of Chemistry, Université de Montréal, Québec, Canada. Compound **5**⁵⁵ was synthesized from D-glucose. Betulin (**1**) was extracted from the outer bark of *Betula papyrifera* March. and recrystallized with an azeotropic mixture of 2-butanol/H₂O (37:13) to afford crude **1** with purity >95% according to GC-MS. Betulinic acid (**2**) was purchased from Indofine Chemical Company Inc. 28-O-β-D-glucopyranosyl betulin,¹⁵ 28-O-β-D-glucopyranosyl betulinic acid¹⁸, 28-O-*tert*-butyldiphenylsilyl betulin (**9**)⁵⁶ and betulin 3-acetate (**13**)¹⁶ were synthesized according to reported procedures.

28-O-tert-Butyldiphenylsilyl betulin 3β-O-2,3,4-tri-O-benzoyl-α-L-arabinopyranoside (10a).

The acceptor **9** (750 mg, 1.10 mmol) and the donor **7** (1.00 g, 1.65 mmol) were stirred at room temperature in anhydrous CH₂Cl₂ (16.5 mL, 15 mL•mmol⁻¹) with 4 Å MS under an argon atmosphere during 60 min. Then, the promoter TMSOTf (12 μL, 0.055 mmol) was injected in the medium via a dry syringe while keeping rigorous anhydrous conditions. The mixture was stirred 2.5 h at room temperature and quenched by addition of Et₃N (0.61 mL, 4.4 mmol). The solvents were evaporated

under reduced pressure, then the resulting oily residue was purified by flash chromatography (hexanes/Et₂O 9:1 to 17:3) to afford **10a** (874 mg, 71%) as a white crystalline powder. R_f 0.67 (hexanes/EtOAc 3:1); $[\alpha]_D^{25} +71.0^\circ$ (c 1.0, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 8.08-7.27 (25H, H-Ar), 5.78 (1H, dd, $J=8.7, 6.5$ Hz, H-2'), 5.68 (1H, m, H-4'), 5.60 (1H, dd, $J=8.9, 3.5$ Hz, H-3'), 4.78 (1H, d, $J=6.4$ Hz, H-1'), 4.59 (1H, br s, H-29), 4.52 (1H, br s, H-29), 4.32 (1H, dd, $J=13.0, 3.8$ Hz, H-5'), 3.86 (1H, dd, $J=12.9, 1.8$ Hz, H-5'), 3.68 (1H, d, $J=9.9$ Hz, H-28), 3.32 (1H, d, $J=10.0$ Hz, H-28), 3.13 (1H, dd, $J=11.4, 4.8$ Hz, H-3), 2.26 (1H, td, $J=11.0, 5.6$ Hz, H-19), 1.64 (3H, s, H-30), 1.06 (9H, s, C(CH₃)₃), 0.91 (3H, s, H-27), 0.77 (3H, s, H-23), 0.75 (3H, s, H-25), 0.68 (3H, s, H-26), 0.64 (3H, s, H-24). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 165.8-165.2 (3 \times CO), 150.7 (C-20), 135.7-127.6 (C-Ar), 109.4 (C-29), 103.0 (C-1'), 90.1 (C-3), 70.8 (C-3'), 70.2 (C-2'), 68.7 (C-4'), 62.6 (C-5'), 61.0 (C-28), 55.5 (C-5), 50.3 (C-9), 48.4 (C-18), 48.4 (C-17), 47.8 (C-19), 42.6 (C-14), 40.7 (C-8), 39.0 (C-4), 38.6 (C-1), 37.2 (C-13), 36.8 (C-10), 34.5 (C-22), 34.1 (C-7), 29.8 (C-21), 29.5 (C-16), 27.7 (C-23), 27.0 (C-15), 26.9 (C(CH₃)₃), 26.1 (C-2), 25.1 (C-12), 20.7 (C-11), 19.4 (C(CH₃)₃), 19.1 (C-30), 18.1 (C-6), 16.0 (C-24), 16.0 (C-25), 15.7 (C-26), 14.6 (C-27). HR-ESI-MS m/z 1147.6111 [M + Na]⁺ (calcd for C₇₂H₈₈O₉SiNa, 1147.6090).

28-O-tert-Butyldiphenylsilyl betulin 3 β -O-2,3,4-tri-O-benzoyl- α -L-rhamnopyranoside (10b).

This compound was prepared from the acceptor **9** (500 mg, 0.734 mmol) and the donor **8** (684 mg, 1.10 mmol) in the same manner as that described for compound **10a**. Purification by flash chromatography (isocratic hexanes/Et₂O 9:1) gave **10b** (634 mg, 76%) as a white crystalline powder. R_f 0.77 (hexanes/EtOAc 3:1); $[\alpha]_D^{25} +46.6^\circ$ (c 0.5, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 8.13-7.21 (25H, H-Ar), 5.84 (1H, dd, $J=10.1, 3.3$ Hz, H-3'), 5.68 (1H, m, H-4'), 5.65 (1H, m, H-2'), 5.08 (1H, d, $J=1.1$ Hz, H-1'), 4.60 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H-29), 4.53 (1H, br s, H-29), 4.30 (1H, m, H-5'), 3.70 (1H, d, $J=9.9$ Hz, H-28), 3.34 (1H, d, $J=9.9$ Hz, H-28), 3.20 (1H, t, $J=8.3$ Hz, H-3), 2.27 (1H, td, $J=10.8, 5.6$ Hz, H-19), 1.65 (3H, s, H-30), 1.33 (3H, d, $J=6.2$

Hz, H-6'), 1.07 (9H, s, C(CH₃)₃), 1.06 (3H, s, H-23), 0.94 (3H, s, H-24), 0.94 (3H, s, H-27), 0.83 (3H, s, H-25), 0.72 (3H, s, H-26). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ: 165.8-165.6 (3×CO), 150.8 (C-20), 135.7-127.6 (C-Ar), 109.4 (C-29), 99.7 (C-1'), 90.0 (C-3), 72.0 (C-4'), 71.2 (C-2'), 70.2 (C-3'), 66.8 (C-5'), 61.1 (C-28), 55.4 (C-5), 50.3 (C-9), 48.4 (C-18), 48.4 (C-17), 47.8 (C-19), 42.6 (C-14), 40.8 (C-8), 39.1 (C-4), 38.6 (C-1), 37.2 (C-13), 36.9 (C-10), 34.5 (C-22), 34.1 (C-7), 29.9 (C-21), 29.5 (C-16), 28.3 (C-23), 27.0 (C-15), 26.9 (C(CH₃)₃), 25.6 (C-2), 25.1 (C-12), 20.8 (C-11), 19.4 (C(CH₃)₃), 19.1 (C-30), 18.3 (C-6), 17.6 (C-6'), 16.4 (C-24), 16.1 (C-25), 15.7 (C-27), 14.7 (C-26). HR-ESI-MS *m/z* 1161.6262 [M + Na]⁺ (calcd for C₇₃H₉₀O₉SiNa, 1161.6246).

Betulin 3β-O-2,3,4-tri-O-benzoyl-α-L-arabinopyranoside (11a).

To a solution of **10a** (200 mg, 0.178 mmol) in anhydrous THF (1.94 mL) was added HOAc (224 μL, 3.91 mmol) and 1 M TBAF in THF (3.88 mL) at room temperature under an argon atmosphere. The mixture was refluxed overnight or until TLC (hexanes/EtOAc 4:1) showed the disappearance of the initial product. Then, the mixture was diluted with EtOAc, washed with H₂O, dried over anhydrous MgSO₄, filtered and the solvents were evaporated under reduced pressure. The resulting residue was purified by flash chromatography (hexanes/Et₂O 9:1 to 3:2) to furnish **11a** (117 mg, 75%) as a white amorphous solid. *R*_f 0.27 (hexanes/EtOAc 3:1); [α]²⁵_D +103.6° (*c* 0.1, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ: 8.09-7.27 (15H, H-Ar), 5.77 (1H, dd, *J*=8.9, 6.5 Hz, H-2'), 5.67 (1H, m, H-4'), 5.60 (1H, dd, *J*=8.9, 3.5 Hz, H-3'), 4.78 (1H, d, *J*=6.5 Hz, H-1'), 4.68 (1H, d, *J*=1.8 Hz, H-29), 4.57 (1H, br s, H-29), 4.33 (1H, dd, *J*=13.0, 3.8 Hz, H-5'), 3.88 (1H, dd, *J*=12.9, 1.9 Hz, H-5'), 3.78 (1H, d, *J*=10.7 Hz, H-28), 3.32 (1H, d, *J*=10.7 Hz, H-28), 3.14 (1H, dd, *J*=11.3, 4.8 Hz, H-3), 2.38 (1H, td, *J*=10.7, 5.6 Hz, H-19), 1.68 (3H, s, H-30), 0.98 (3H, s, H-26), 0.95 (3H, s, H-27), 0.80 (3H, s, H-25), 0.76 (3H, s, H-23), 0.64 (3H, s, H-24). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ: 165.8-165.2 (3×CO), 150.4 (C-20), 133.3-128.3 (C-Ar), 109.7 (C-29), 103.0 (C-1'), 90.1 (C-3), 70.7 (C-3'), 70.2 (C-2'), 68.7 (C-4'), 62.6 (C-5'), 60.4 (C-28), 55.5 (C-5), 50.3 (C-9), 48.7 (C-18), 47.7 (C-17), 47.7 (C-19), 42.6 (C-

14), 40.9 (C-8), 39.0 (C-4), 38.7 (C-1), 37.2 (C-13), 36.8 (C-10), 34.1 (C-7), 33.9 (C-22), 29.7 (C-21), 29.1 (C-16), 27.7 (C-23), 27.0 (C-15), 26.1 (C-2), 25.2 (C-12), 20.8 (C-11), 19.1 (C-30), 18.1 (C-6), 16.0 (C-25), 16.0 (C-24), 15.9 (C-26), 14.7 (C-27). HR-ESI-MS m/z 909.4957 $[M + Na]^+$ (calcd for $C_{56}H_{70}O_9Na$, 909.4912).

Betulin 3 β -O-2,3,4-tri-O-benzoyl- α -L-rhamnopyranoside (11b).

This compound was prepared from **10b** (200 mg, 0.176 mmol) in the same manner as that described for compound **11a**. Purification by flash chromatography (hexanes/EtOAc 9:1 to 3:2) gave **11b** (138 mg, 87%) as a white crystalline powder. R_f 0.33 (hexanes/EtOAc 3:1); $[\alpha]_D^{25} +76.6^\circ$ (c 1.0, $CHCl_3$); 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 8.13-7.23 (15H, H-Ar), 5.82 (1H, dd, $J=10.2, 3.3$ Hz, H-3'), 5.67 (1H, t, $J=10.0$ Hz, H-4'), 5.64 (1H, dd, $J=3.3, 1.8$ Hz, H-2'), 5.08 (1H, d, $J=1.4$ Hz, H-1'), 4.69 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-29), 4.58 (1H, br s, H-29), 4.30 (1H, ddt, $J=9.7, 6.2, 6.2$ Hz, H-5'), 3.81 (1H, d, $J=10.8$ Hz, H-28), 3.34 (1H, d, $J=10.8$ Hz, H-28), 3.20 (1H, dd, $J=8.7, 7.5$ Hz, H-3), 2.39 (1H, td, $J=10.5, 5.6$ Hz, H-19), 1.68 (3H, s, H-30), 1.33 (3H, d, $J=6.2$ Hz, H-6'), 1.05 (3H, s, H-23), 1.04 (3H, s, H-26), 0.98 (3H, s, H-27), 0.93 (3H, s, H-24), 0.89 (3H, s, H-25). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 165.9-165.6 (3 \times CO), 150.5 (C-20), 133.4-128.3 (C-Ar), 109.7 (C-29), 99.7 (C-1'), 90.0 (C-3), 72.0 (C-4'), 71.2 (C-2'), 70.2 (C-3'), 66.8 (C-5'), 60.6 (C-28), 55.5 (C-5), 50.4 (C-9), 48.8 (C-18), 47.8 (C-19), 47.8 (C-17), 42.7 (C-14), 41.0 (C-8), 39.2 (C-4), 38.7 (C-1), 37.3 (C-13), 36.9 (C-10), 34.2 (C-7), 34.0 (C-22), 29.8 (C-21), 29.2 (C-16), 28.3 (C-23), 27.0 (C-15), 25.7 (C-2), 25.2 (C-12), 20.9 (C-11), 19.1 (C-30), 18.3 (C-6), 17.6 (C-6'), 16.4 (C-24), 16.2 (C-25), 16.0 (C-26), 14.8 (C-27). HR-ESI-MS m/z 923.5111 $[M + Na]^+$ (calcd for $C_{57}H_{72}O_9Na$, 923.5069).

28-O-2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosyl betulin 3-acetate (14).

This compound was prepared from the acceptor **13** (700 mg, 1.44 mmol) and the donor **4** (1.61 g, 2.17 mmol) in the same manner as that described for compound **10a** except for the molar volume of CH_2Cl_2 (40 mL \cdot mmol $^{-1}$). Purification by flash

chromatography (hexanes/EtOAc 4:1 to 7:3) gave **14** (903 mg, 60%) as a white foam. R_f 0.49 (hexanes/EtOAc 3:1); $[\alpha]_D^{25} +24.7^\circ$ (c 0.2, CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 8.06-7.26 (20H, H-Ar), 5.93 (1H, t, $J=9.7$ Hz, H-3"), 5.67 (1H, t, $J=9.7$ Hz, H-4"), 5.56 (1H, dd, $J=9.8, 8.0$ Hz, H-2"), 4.79 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-1"), 4.65 (1H, m, H-6"), 4.63 (1H, m, H-29), 4.55 (1H, m, H-29), 4.53 (1H, m, H-6"), 4.45 (1H, m, H-3), 4.17 (1H, ddd, $J=9.4, 5.6, 3.3$ Hz, H-5"), 3.67 (1H, d, $J=8.9$ Hz, H-28), 3.58 (1H, d, $J=8.9$ Hz, H-28), 2.28 (1H, m, H-19), 2.05 (3H, s, CH_3CO), 1.63 (3H, s, H-30), 0.84 (3H, s, H-23), 0.84 (3H, s, H-24), 0.83 (3H, s, H-26), 0.82 (3H, s, H-27), 0.80 (3H, s, H-25). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 171.1 (CH_3CO), 166.2-165.3 ($4\times\text{CO}$), 150.4 (C-20), 133.5-128.3 (C-Ar), 109.7 (C-29), 102.1 (C-1"), 80.9 (C-3), 72.9 (C-3"), 72.2 (C-5"), 71.8 (C-2"), 70.1 (C-4"), 68.9 (C-28), 63.3 (C-6"), 55.3 (C-5), 50.2 (C-9), 48.6 (C-18), 48.0 (C-19), 47.0 (C-17), 42.5 (C-14), 40.7 (C-8), 38.3 (C-1), 37.8 (C-4), 37.6 (C-13), 37.0 (C-10), 34.7 (C-22), 33.8 (C-7), 29.6 (C-21), 29.2 (C-16), 28.0 (C-23), 27.0 (C-15), 25.0 (C-12), 23.7 (C-2), 21.4 (CH_3CO), 20.8 (C-11), 19.0 (C-30), 18.1 (C-6), 16.5 (C-24), 16.2 (C-25), 15.8 (C-26), 14.7 (C-27). HR-ESI-MS m/z 1085.5384 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{66}\text{H}_{78}\text{O}_{12}\text{Na}$, 1085.5386).

28-O-2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosyl betulin (15).

To a solution of **14** (840 mg, 0.790 mmol) in anhydrous $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1:2 (60 mL) was added AcCl (1.19 mL, 16.8 mmol) at 0°C (ice/water bath). The mixture was stirred overnight at room temperature or until TLC (hexanes/EtOAc 7:3) showed the disappearance of the initial product. Then, the reaction was quenched with Et_3N (4.68 mL, 33.6 mmol) and the solvents were evaporated under reduced pressure to give a residue, which was purified by flash chromatography (hexanes/EtOAc 4:1 to 3:2) to afford **15** (523 mg, 75%, corrected yield) as a white crystalline powder along with **14** (87 mg, 10%, recovery yield) as a white foam. R_f 0.20 (hexanes/EtOAc 3:1); $[\alpha]_D^{25} +27.0^\circ$ (c 0.5, CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 8.05-7.25 (20H, H-Ar), 5.93 (1H, t, $J=9.7$ Hz, H-3"), 5.67 (1H, t, $J=9.7$ Hz, H-4"), 5.56 (1H, dd, $J=9.7, 7.8$ Hz, H-2"), 4.79 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-1"), 4.64 (1H, m, H-6"), 4.63 (1H, m, H-29), 4.54 (1H, m, H-29), 4.53 (1H, m, H-6"), 4.17 (1H, m, H-5"), 3.66 (1H, d, $J=8.9$ Hz,

H-28), 3.58 (1H, d, $J=8.9$ Hz, H-28), 3.17 (1H, dd, $J=11.0, 4.6$ Hz, H-3), 2.27 (1H, m, H-19), 1.63 (3H, s, H-30), 0.96 (3H, s, H-23), 0.83 (3H, s, H-26), 0.83 (3H, s, H-27), 0.77 (3H, s, H-25), 0.76 (3H, s, H-24). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 166.1-165.0 (4 \times CO), 150.4 (C-20), 133.4-128.3 (C-Ar), 109.6 (C-29), 102.0 (C-1''), 78.9 (C-3), 72.8 (C-3''), 72.2 (C-5''), 71.7 (C-2''), 70.0 (C-4''), 68.8 (C-28), 63.3 (C-6''), 55.2 (C-5), 50.3 (C-9), 48.6 (C-18), 48.0 (C-19), 46.9 (C-17), 42.5 (C-14), 40.7 (C-8), 38.8 (C-4), 38.6 (C-1), 37.6 (C-13), 37.1 (C-10), 34.7 (C-22), 33.8 (C-7), 29.6 (C-21), 29.2 (C-16), 28.0 (C-23), 27.3 (C-2), 27.0 (C-15), 25.0 (C-12), 20.8 (C-11), 19.0 (C-30), 18.1 (C-6), 16.1 (C-25), 15.7 (C-26), 15.4 (C-24), 14.8 (C-27). HR-ESI-MS m/z 1043.5295 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (calcd for $\text{C}_{64}\text{H}_{76}\text{O}_{11}\text{Na}$, 1043.5280).

28-O-2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosyl betulin 3 β -O-2,3,4-tri-O-benzoyl- α -L-arabinopyranoside (12a).

The acceptor **15** (150 mg, 0.147 mmol) and the donor **7** (134 mg, 0.220 mmol) were stirred at room temperature in anhydrous CH_2Cl_2 (2.9 mL) with 4 Å MS under an argon atmosphere during 60 min. The temperature was lowered to 0 °C with an ice/water bath, then a solution of TMSOTf in CH_2Cl_2 (100 μL , 150 mM) was injected in the medium via a dry syringe while keeping rigorous anhydrous conditions. The mixture was stirred 3 h at room temperature and quenched by addition of Et_3N (82 μL , 0.59 mmol). The solvents were evaporated under reduced pressure to give a residue, which was purified by flash chromatography (hexanes/EtOAc 9:1 to 3:2) to afford **12a** (132 mg, 62%) as a white foam. R_f 0.26 (hexanes/EtOAc 3:1); $[\alpha]_D^{25} +80.3^\circ$ (c 0.2, CHCl_3); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 8.10-7.25 (35H, H-Ar), 5.94 (1H, t, $J=9.7$ Hz, H-3''), 5.78 (1H, dd, $J=8.9, 6.7$ Hz, H-2'), 5.68 (1H, m, H-4'), 5.67 (1H, m, H-4''), 5.60 (1H, dd, $J=9.1, 3.5$ Hz, H-3'), 5.56 (1H, dd, $J=9.9, 8.0$ Hz, H-2''), 4.79 (1H, m, H-1''), 4.78 (1H, m, H-1'), 4.65 (1H, m, H-6''), 4.63 (1H, br s, H-29), 4.55 (1H, br s, H-29), 4.53 (1H, m, H-6''), 4.33 (1H, dd, $J=13.0, 3.5$ Hz, H-5'), 4.17 (1H, ddd, $J=9.5, 5.4, 3.3$ Hz, H-5''), 3.87 (1H, dd, $J=13.0, 1.9$ Hz, H-5'), 3.66 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-28), 3.57 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H-28), 3.12 (1H, dd, $J=11.3, 4.6$ Hz, H-3), 2.28 (1H, m, H-19), 1.62 (3H, s, H-30), 0.81 (3H, s, H-27),

0.79 (3H, s, H-26), 0.76 (3H, s, H-23), 0.76 (3H, s, H-25), 0.65 (3H, s, H-24), 0.58 (1H, d, $J=10.8$ Hz, H-5), 0.50 (1H, br d, $J=13.5$ Hz, H-15). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 166.1-164.9 (7 \times CO), 150.3 (C-20), 133.4-128.3 (C-Ar), 109.6 (C-29), 103.0 (C-1'), 102.0 (C-1''), 90.0 (C-3), 72.8 (C-3''), 72.1 (C-5''), 71.7 (C-2''), 70.7 (C-3'), 70.2 (C-2'), 70.0 (C-4''), 68.9 (C-28), 68.7 (C-4'), 63.2 (C-6''), 62.6 (C-5'), 55.4 (C-5), 50.2 (C-9), 48.5 (C-18), 47.9 (C-19), 46.9 (C-17), 42.4 (C-14), 40.6 (C-8), 38.9 (C-4), 38.6 (C-1), 37.6 (C-13), 36.7 (C-10), 34.6 (C-22), 33.7 (C-7), 29.6 (C-21), 29.1 (C-16), 27.6 (C-23), 26.9 (C-15), 26.0 (C-2), 25.0 (C-12), 20.7 (C-11), 19.0 (C-30), 17.9 (C-6), 16.0 (C-24), 16.0 (C-25), 15.7 (C-26), 14.7 (C-27). HR-ESI-MS m/z 1487.6499 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (calcd for $\text{C}_{90}\text{H}_{96}\text{O}_{18}\text{Na}$, 1487.6489).

28-O-2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosyl betulin 3 β -O-2,3,4-tri-O-benzoyl- α -L-rhamnopyranoside (12b).

This compound was prepared from the acceptor **15** (17 mg, 0.017 mmol) and the donor **8** (16 mg, 0.025 mmol) in the same manner as that described for compound **12a** except for the concentration of the solution of TMSOTf in CH_2Cl_2 (20 mM). Purification by flash chromatography (hexanes/EtOAc 9:1 to 3:1) gave **12b** (18 mg, 72%) as a white foam. R_f 0.34 (hexanes/EtOAc 3:1); $[\alpha]_D^{25} +57.1^\circ$ (c 0.2, CHCl_3); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 8.15-7.24 (35H, H-Ar), 5.95 (1H, t, $J=9.7$ Hz, H-3''), 5.83 (1H, dd, $J=10.2, 3.3$ Hz, H-3'), 5.68 (1H, m, H-4''), 5.68 (1H, m, H-4'), 5.65 (1H, m, H-2'), 5.56 (1H, dd, $J=9.9, 8.0$ Hz, H-2''), 5.07 (1H, d, $J=1.3$ Hz, H-1'), 4.80 (1H, d, $J=8.1$ Hz, H-1''), 4.66 (1H, m, H-6''), 4.63 (1H, m, H-29), 4.55 (1H, m, H-29), 4.54 (1H, m, H-6''), 4.32 (1H, dd, $J=9.7, 6.0$ Hz, H-5'), 4.18 (1H, ddd, $J=9.4, 5.4, 3.3$ Hz, H-5''), 3.67 (1H, d, $J=9.1$ Hz, H-28), 3.59 (1H, d, $J=9.1$ Hz, H-28), 3.18 (1H, t, $J=8.1$ Hz, H-3), 2.29 (1H, m, H-19), 1.63 (3H, s, H-30), 1.33 (3H, d, $J=6.2$ Hz, H-6'), 1.04 (3H, s, H-23), 0.94 (3H, s, H-24), 0.85 (3H, s, H-26), 0.84 (3H, s, H-25), 0.83 (3H, s, H-27). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 166.2-165.0 (7 \times CO), 150.4 (C-20), 133.4-128.3 (C-Ar), 109.6 (C-29), 102.1 (C-1''), 99.7 (C-1'), 90.0 (C-3), 72.8 (C-3''), 72.2 (C-5''), 72.0 (C-4''), 71.7 (C-2''), 71.2 (C-2'), 70.2 (C-3'), 70.0 (C-4'), 68.9 (C-28), 66.8 (C-5'), 63.3 (C-6''), 55.4 (C-5), 50.2 (C-9), 48.6 (C-18), 48.0 (C-

19), 46.9 (C-17), 42.5 (C-14), 40.7 (C-8), 39.1 (C-4), 38.6 (C-1), 37.6 (C-13), 36.8 (C-10), 34.7 (C-22), 33.8 (C-7), 29.6 (C-21), 29.2 (C-16), 28.2 (C-23), 26.9 (C-15), 25.6 (C-2), 25.0 (C-12), 20.8 (C-11), 19.0 (C-30), 18.1 (C-6), 17.6 (C-6'), 16.4 (C-24), 16.1 (C-25), 15.7 (C-26), 14.8 (C-27). HR-ESI-MS m/z 1501.6648 $[M + Na]^+$ (calcd for $C_{91}H_{98}O_{18}Na$, 1501.6645).

28-O- β -D-Glucopyranosyl betulin 3 β -O- α -L-arabinopyranoside (16a).

To a solution of **12a** (94 mg, 0.064 mmol) in MeOH/THF/H₂O 1:2:1 (4.4 mL) was added NaOH (52 mg, 1.3 mmol). The reaction mixture was stirred 5 h at room temperature or until TLC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1) showed the complete disappearance of the benzoylated product and then acidified to pH \approx 4 with aqueous HCl 10%. The solvents were evaporated under reduced pressure to give a solid residue, which was purified by C-18 reversed phase flash chromatography (MeOH/H₂O 4:1 to 9:1) to furnish **16a** (40 mg, 86%) as a white amorphous powder. R_f 0.78 (CH₂Cl₂/MeOH 3:1); $[\alpha]_D^{25}$ -15.6° (c 0.1, MeOH); ¹H NMR (CDCl₃/CD₃OD 1:1, 400 MHz) δ : 4.68 (1H, d, J =1.6 Hz, H-29), 4.58 (1H, br s, H-29), 4.34 (1H, d, J =5.9 Hz, H-1'), 4.25 (1H, d, J =7.8 Hz, H-1''), 3.89 (1H, m, H-6''), 3.88 (1H, m, H-4'), 3.88 (1H, m, H-5'), 3.79 (1H, dd, J =11.9, 4.6 Hz, H-6''), 3.68 (1H, m, H-28), 3.65 (1H, m, H-2''), 3.61 (1H, m, H-3'), 3.61 (1H, m, H-28), 3.53 (1H, dd, J =13.8, 3.8 Hz, H-5'), 3.45 (1H, m, H-4''), 3.44 (1H, m, H-3''), 3.31 (1H, m, H-5''), 3.27 (1H, m, H-2''), 3.13 (1H, dd, J =11.3, 4.3 Hz, H-3), 2.43 (1H, td, J =10.3, 5.7 Hz, H-19), 1.69 (3H, s, H-30), 1.04 (3H, s, H-26), 1.01 (3H, s, H-23), 0.98 (3H, s, H-27), 0.84 (3H, s, H-25), 0.82 (3H, s, H-24), 0.73 (1H, d, J =10.3 Hz, H-5). ¹³C NMR: see Table 2. HR-ESI-MS m/z 759.4635 $[M + Na]^+$ (calcd for $C_{41}H_{68}O_{11}Na$, 759.4654).

28-O- β -D-Glucopyranosyl betulin 3 β -O- α -L-rhamnopyranoside (16b).

This compound was prepared from **12b** (84 mg, 0.057 mmol) in the same manner as that described for compound **16a**. Purification by C-18 reversed phase flash chromatography (MeOH/H₂O 4:1 to 100% MeOH) gave **16b** (33 mg, 80%) as a

white amorphous powder. R_f 0.78 (CH₂Cl₂/MeOH 3:1); $[\alpha]_D^{25}$ -42.8° (*c* 0.2, MeOH); ¹H NMR (CDCl₃/CD₃OD 1:1, 400 MHz) δ : 4.76 (1H, br s, H-1'), 4.68 (1H, br s, H-29), 4.58 (1H, br s, H-29), 4.25 (1H, d, J =7.8 Hz, H-1''), 3.90 (1H, m, H-6''), 3.89 (1H, m, H-2''), 3.78 (1H, m, H-6''), 3.75 (1H, m, H-5'), 3.70 (1H, m, H-28), 3.69 (1H, m, H-3'), 3.62 (1H, d, J =9.2 Hz, H-28), 3.43 (1H, m, H-4''), 3.42 (1H, m, H-3''), 3.39 (1H, m, H-4'), 3.31 (1H, m, H-5''), 3.27 (1H, m, H-2''), 3.08 (1H, dd, J =11.4, 4.6 Hz, H-3), 2.43 (1H, m, H-19), 2.09 (1H, br d, J =12.1 Hz, H-16), 1.69 (3H, s, H-30), 1.27 (3H, d, J =6.0 Hz, H-6'), 1.05 (3H, s, H-26), 0.99 (3H, s, H-27), 0.93 (3H, s, H-23), 0.85 (3H, s, H-25), 0.76 (3H, s, H-24). ¹³C NMR (CDCl₃/CD₃OD 1:1, 100 MHz) δ : see Table 2. HR-ESI-MS m/z 773.4794 [M + Na]⁺ (calcd for C₄₂H₇₀O₁₁Na, 773.4810).

28-O-2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosyl betulinic acid (17).

To a solution of the acceptor **2** (500 mg, 1.10 mmol) and the donor **6** (939 mg, 1.42 mmol) in CH₂Cl₂ (12.7 mL) was added H₂O (12.7 mL), K₂CO₃ (378 mg, 2.74 mmol) and Bu₄NBr (141 mg, 0.438 mmol). The resulting mixture was vigorously stirred and refluxed for 6 h. Then, the mixture was diluted with CH₂Cl₂, washed with H₂O and brine. The solvents of the dried (MgSO₄) organic solution were evaporated under reduced pressure to give a brown residue, which was purified by flash chromatography (100% CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂/MeOH 49:1) to afford **17** (1.015 g, 90%) as a white crystalline powder. R_f 0.17 (hexanes/EtOAc 3:1); $[\alpha]_D^{25}$ +38.0° (*c* 0.5, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 8.07-7.25 (20H, H-Ar), 6.03 (1H, d, J =8.4 Hz, H-1''), 6.02 (1H, t, J =9.5 Hz, H-3''), 5.76 (1H, dd, J =9.9, 8.4 Hz, H-2''), 5.73 (1H, t, J =9.8 Hz, H-4''), 4.71 (1H, br s, H-29), 4.59 (1H, m, H-6''), 4.58 (1H, m, H-29), 4.48 (1H, dd, J =12.2, 5.6 Hz, H-6''), 4.29 (1H, ddd, J =9.5, 5.3, 2.9 Hz, H-5''), 3.13 (1H, dd, J =11.0, 4.6 Hz, H-3), 2.93 (1H, td, J =11.1, 4.8 Hz, H-19), 2.17 (1H, br d, J =13.2 Hz, H-16), 2.03 (1H, td, J =12.2, 3.2 Hz, H-13), 1.91 (1H, dd, J =12.7, 8.0 Hz, H-22), 1.63 (3H, s, H-30), 0.93 (3H, s, H-23), 0.79 (3H, s, H-27), 0.73 (3H, s, H-24), 0.68 (3H, s, H-25), 0.60 (1H, br d, J =14.3 Hz, H-15), 0.54 (1H, br d, J =10.5 Hz, H-5), 0.47 (3H, s, H-26), 0.38 (1H, br d, J =11.0 Hz, H-7). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz)

δ : 174.0 (C-28), 166.1-164.7 (4 \times CO), 150.3 (C-20), 133.5-128.3 (C-Ar), 109.5 (C-29), 91.4 (C-1''), 78.9 (C-3), 73.0 (C-5''), 72.8 (C-3''), 70.3 (C-2''), 69.4 (C-4''), 62.7 (C-6''), 56.8 (C-17), 55.2 (C-5), 50.4 (C-9), 49.1 (C-18), 46.6 (C-19), 42.2 (C-14), 40.2 (C-8), 38.8 (C-4), 38.6 (C-1), 38.0 (C-13), 37.0 (C-10), 36.3 (C-22), 33.4 (C-7), 31.5 (C-16), 30.2 (C-21), 29.9 (C-15), 28.0 (C-23), 27.4 (C-2), 25.4 (C-12), 20.7 (C-11), 19.5 (C-30), 18.0 (C-6), 16.0 (C-25), 15.4 (C-26), 15.4 (C-24), 14.5 (C-27). HR-ESI-MS m/z 1057.5114 [M + Na]⁺ (calcd for C₆₄H₇₄O₁₂Na, 1057.5073).

28-O-2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosyl betulinic acid 3 β -O-2,3,4-tri-O-benzoyl- α -L-arabinopyranoside (18a).

This compound was prepared from the acceptor **17** (250 mg, 0.241 mmol) and the donor **7** (220 mg, 0.362 mmol) in the same manner as that described for compound **10a** except for the molar volume of CH₂Cl₂ (20 mL \cdot mmol⁻¹). Purification by flash chromatography (hexanes/EtOAc 9:1 to 7:3) gave **18a** (224 mg, 63%) as a white crystalline powder. R_f 0.22 (hexanes/EtOAc 3:1); $[\alpha]_D^{25}$ +88.9° (c 1.0, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 8.09-7.23 (35H, H-Ar), 6.04 (1H, m, H-1''), 6.03 (1H, m, H-3''), 5.78 (1H, m, H-2''), 5.76 (1H, m, H-2''), 5.75 (1H, m, H-4''), 5.68 (1H, m, H-4''), 5.61 (1H, m, H-3''), 4.77 (1H, d, H-1'), 4.71 (1H, m, H-29), 4.60 (1H, m, H-6''), 4.58 (1H, m, H-29), 4.50 (1H, m, H-6''), 4.32 (1H, m, H-5'), 4.30 (1H, m, H-5''), 3.87 (1H, m, H-5'), 3.09 (1H, m, H-3), 2.94 (1H, m, H-19), 1.64 (3H, s, H-30), 0.77 (3H, s, H-27), 0.74 (3H, s, H-23), 0.67 (3H, s, H-25), 0.62 (3H, s, H-24), 0.44 (3H, s, H-26). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 174.0 (C-28), 166.0-164.7 (7 \times CO), 150.2 (C-20), 133.5-128.3 (C-Ar), 109.6 (C-29), 103.0 (C-1'), 91.4 (C-1''), 90.1 (C-3), 73.0 (C-5''), 72.8 (C-3''), 70.7 (C-3'), 70.2 (C-2''), 70.2 (C-2'), 69.4 (C-4''), 68.7 (C-4'), 62.7 (C-6''), 62.7 (C-5'), 56.8 (C-17), 55.4 (C-5), 50.3 (C-9), 49.1 (C-18), 46.6 (C-19), 42.1 (C-14), 40.2 (C-8), 38.9 (C-4), 38.6 (C-1), 38.0 (C-13), 36.7 (C-10), 36.3 (C-22), 33.3 (C-7), 31.5 (C-16), 30.2 (C-21), 29.8 (C-15), 27.7 (C-23), 26.0 (C-2), 25.4 (C-12), 20.7 (C-11), 19.5 (C-30), 17.8 (C-6), 16.1 (C-24), 15.9 (C-25), 15.3 (C-26), 14.4 (C-27). HR-ESI-MS m/z 1501.6347 [M + Na]⁺ (calcd for C₉₀H₉₄O₁₉Na, 1501.6282).

28-O-2,3,4,6-Tetra-O-benzoyl- β -D-glucopyranosyl betulinic acid 3 β -O-2,3,4-tri-O-benzoyl- α -L-rhamnopyranoside (18b).

This compound was prepared from the acceptor **17** (250 mg, 0.241 mmol) and the donor **8** (225 mg, 0.362 mmol) in the same manner as that described for compound **10a** except for the molar volume of CH_2Cl_2 ($20 \text{ mL} \cdot \text{mmol}^{-1}$). Purification by flash chromatography (hexanes/EtOAc 9:1 to 4:1) gave **18b** (311 mg, 86%) as a white amorphous powder. R_f 0.33 (hexanes/EtOAc 3:1); $[\alpha]_D^{25} +72.5^\circ$ (c 0.5, CHCl_3); ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ : 8.10-7.21 (35H, H-Ar), 6.08 (1H, m, H-1''), 6.07 (1H, m, H-3''), 5.83 (1H, m, H-3'), 5.82 (1H, m, H-2''), 5.77 (1H, m, H-4''), 5.69 (1H, m, H-4'), 5.67 (1H, m, H-2'), 5.08 (1H, br s, H-1'), 4.72 (1H, br s, H-29), 4.62 (1H, dd, $J=12.3, 2.9$ Hz, H-6''), 4.59 (1H, br s, H-29), 4.52 (1H, dd, $J=12.3, 5.4$ Hz, H-6''), 4.34 (1H, m, H-5''), 4.33 (1H, m, H-5'), 3.17 (1H, t, $J=8.1$ Hz, H-3), 2.96 (1H, td, $J=10.8, 4.6$ Hz, H-19), 2.20 (1H, br d, $J=12.7$ Hz, H-16), 1.64 (3H, s, H-30), 1.34 (3H, d, $J=6.2$ Hz, H-6'), 1.03 (3H, s, H-23), 0.92 (3H, s, H-24), 0.81 (3H, s, H-27), 0.77 (3H, s, H-25), 0.51 (3H, s, H-26), 0.44 (1H, br d, $J=11.4$ Hz, H-7). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 174.0 (C-28), 166.0-163.5 ($7 \times \text{CO}$), 150.1 (C-20), 133.6-128.2 (C-Ar), 109.5 (C-29), 99.7 (C-1'), 91.4 (C-1''), 90.0 (C-3), 72.9 (C-5''), 72.8 (C-3''), 71.9 (C-4'), 71.1 (C-2'), 70.2 (C-3'), 70.2 (C-2''), 69.3 (C-4''), 66.7 (C-5'), 62.7 (C-6''), 56.7 (C-17), 55.3 (C-5), 50.3 (C-9), 49.0 (C-18), 46.6 (C-19), 42.1 (C-14), 40.2 (C-8), 39.0 (C-4), 38.5 (C-1), 37.9 (C-13), 36.7 (C-10), 36.3 (C-22), 33.3 (C-7), 31.4 (C-16), 30.2 (C-21), 29.8 (C-15), 28.2 (C-23), 25.5 (C-2), 25.3 (C-12), 20.7 (C-11), 19.4 (C-30), 17.9 (C-6), 17.5 (C-6'), 16.3 (C-24), 16.0 (C-25), 15.3 (C-26), 14.4 (C-27). HR-ESI-MS m/z 1515.6419 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{91}\text{H}_{96}\text{O}_{19}\text{Na}$, 1515.6438).

28-O- β -D-Glucopyranosyl betulinic acid 3 β -O- α -L-arabinopyranoside (3).

This compound was prepared from **18a** (100 mg, 0.068 mmol) in the same manner as that described for compound **16a**. Purification by C-18 reversed phase flash chromatography (MeOH/ H_2O 3:2 to 9:1) gave **3** (38 mg, 75%) as a white amorphous powder. R_f 0.78 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 3:1); $[\alpha]_D^{25} +12.2^\circ$ (c 0.1, MeOH); ^1H NMR

(CDCl₃/CD₃OD 1:2, 400 MHz) δ : 5.51 (1H, d, J =8.1 Hz, H-1''), 4.72 (1H, br s, H-29), 4.60 (1H, br s, H-29), 4.31 (1H, d, J =6.3 Hz, H-1'), 3.86 (1H, m, H-5'), 3.86 (1H, m, H-6''), 3.84 (1H, m, H-4'), 3.74 (1H, dd, J =12.1, 4.0 Hz, H-6''), 3.61 (1H, dd, J =8.4, 6.4 Hz, H-2'), 3.55 (1H, dd, J =8.4, 3.0 Hz, H-3'), 3.52 (1H, d, J =10.3 Hz, H-5'), 3.46 (1H, m, H-3''), 3.42 (1H, m, H-4''), 3.41 (1H, m, H-5''), 3.37 (1H, m, H-2''), 3.13 (1H, dd, J =11.1, 4.0 Hz, H-3), 3.00 (1H, td, J =11.0, 4.6 Hz, H-19), 1.69 (3H, s, H-30), 1.01 (3H, s, H-23), 0.99 (3H, s, H-27), 0.95 (3H, s, H-26), 0.85 (3H, s, H-25), 0.81 (3H, s, H-24), 0.73 (1H, d, J =9.5 Hz, H-5). ¹³C NMR: see Table 2. HR-ESI-MS m/z 773.4444 [M + Na]⁺ (calcd for C₄₁H₆₆O₁₂Na, 773.4447).

28-O- β -D-Glucopyranosyl betulinic acid 3 β -O- α -L-rhamnopyranoside (19).

This compound was prepared from **18b** (147 mg, 0.0986 mmol) in the same manner as that described for compound **16a**. Purification by C-18 reversed phase flash chromatography (MeOH/H₂O 3:2 to 9:1) gave **19** (61 mg, 81%) as a white amorphous powder. R_f 0.78 (CH₂Cl₂/MeOH 3:1); $[\alpha]_D^{25}$ -32.4° (c 0.1, MeOH); ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ : 5.49 (1H, d, J =8.1 Hz, H-1''), 4.71 (1H, m, H-1'), 4.71 (1H, m, H-29), 4.59 (1H, m, H-29), 3.84 (1H, m, H-6''), 3.82 (1H, m, H-2'), 3.70 (1H, m, H-5'), 3.70 (1H, m, H-6''), 3.63 (1H, dd, J =9.5, 3.3 Hz, H-3'), 3.43 (1H, m, H-3''), 3.38 (1H, m, H-4''), 3.37 (1H, m, H-5''), 3.36 (1H, m, H-4'), 3.31 (1H, m, H-2''), 3.06 (1H, dd, J =11.6, 4.8 Hz, H-3), 3.00 (1H, td, J =10.8, 6.2 Hz, H-19), 1.69 (3H, s, H-30), 1.22 (3H, d, J =6.2 Hz, H-6'), 1.00 (3H, s, H-27), 0.95 (3H, s, H-26), 0.93 (3H, s, H-23), 0.86 (3H, s, H-25), 0.77 (3H, s, H-24). ¹³C NMR: see Table 2. HR-ESI-MS m/z 787.4607 [M + Na]⁺ (calcd for C₄₂H₆₈O₁₂Na, 787.4603).

28-O- β -D-Glucopyranosyl betulin 3 β -O- β -D-glucopyranoside (21a).

A solution of the acceptor **1** (250 mg, 0.565 mmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (11.3 mL) was stirred for 60 min with 4 Å MS at -10 °C (ice water/acetone bath). TMSOTf (20 μ L, 0.113 mmol) was added under an argon atmosphere while keeping rigorous anhydrous conditions. Then, a solution of the donor **4** (1.26 g, 1.70 mmol) in

anhydrous CH_2Cl_2 (8.5 mL) was added dropwise over 5 min with continuous stirring. The reaction was allowed to warm to room temperature over 4 h, quenched by addition of Et_3N (0.31 mL, 2.3 mmol) and the solvents were evaporated under reduced pressure. The resulting residue was immediately dissolved in a solution of $\text{MeOH}/\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$ 1:2:1 (37 mL) to which was added NaOH (438 mg, 11.0 mmol). The reaction mixture was stirred overnight at room temperature and then acidified to $\text{pH} \approx 4$ with aqueous HCl 10%. The solvents were evaporated under reduced pressure to give a solid residue, which was purified by C-18 reversed phase flash chromatography ($\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 7:3 to 9:1) to afford **21a** (363 mg, 84%, 2 steps) as a white amorphous powder. R_f 0.67 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 3:1); $[\alpha]_D^{25} +1.2^\circ$ (c 0.5, MeOH); ^1H NMR ($\text{Pyr}-d_5$, 400 MHz) δ : 5.05 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1'), 4.98 (1H, d, $J=7.8$ Hz, H-1''), 4.83 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-29), 4.71 (1H, br s, H-29), 4.67 (1H, m, H-6''), 4.63 (1H, m, H-6'), 4.49 (1H, dd, $J=12.1, 5.1$ Hz, H-6''), 4.45 (1H, dd, $J=11.6, 5.3$ Hz, H-6'), 4.34 (1H, m, H-3''), 4.34 (1H, m, H-4''), 4.28 (1H, m, H-3'), 4.27 (1H, m, H-4'), 4.14 (1H, m, H-2''), 4.13 (1H, m, H-5''), 4.10 (1H, m, H-28), 4.08 (1H, m, H-2'), 4.03 (1H, m, H-5'), 3.95 (1H, d, $J=9.7$ Hz, H-28), 3.43 (1H, dd, $J=11.4, 4.3$ Hz, H-3), 1.72 (3H, s, H-30), 1.33 (3H, s, H-23), 1.03 (3H, s, H-27), 1.01 (3H, s, H-24), 0.94 (3H, s, H-26), 0.80 (3H, s, H-25), 0.74 (1H, br d, $J=8.9$ Hz, H-5). ^{13}C NMR: see Table 2. HR-ESI-MS m/z 789.4747 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{12}\text{Na}$, 789.4760).

28-O- β -D-Glucopyranosyl betulinic acid 3 β -O- β -D-glucopyranoside (21b).

This compound was prepared from the acceptor **2** (50 mg, 0.109 mmol) and the donor **4** (243 mg, 0.328 mmol) in the same manner as that described for compound **21a**. Purification by C-18 reversed phase flash chromatography ($\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 7:3 to 17:3) gave **21b** (49 mg, 58%, 2 steps) as a white amorphous powder. R_f 0.66 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 3:1); $[\alpha]_D^{25} -6.8^\circ$ (c 0.1, MeOH); ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ : 5.49 (1H, d, $J=8.1$ Hz, H-1''), 4.71 (1H, br s, H-29), 4.60 (1H, br s, H-29), 4.30 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-1'), 3.84 (1H, m, H-6''), 3.83 (1H, m, H-6'), 3.70 (1H, dd, $J=11.9, 3.0$ Hz, H-6''), 3.65 (1H, dd, $J=11.9, 5.3$ Hz, H-6'), 3.42 (1H, m, H-3''), 3.39 (1H, m, H-4''), 3.38 (1H, m, H-5''), 3.33 (1H, m, H-3'), 3.31 (1H, m, H-2''), 3.28 (1H, m, H-4'),

3.24 (1H, m, H-5'), 3.18 (1H, m, H-2'), 3.15 (1H, m, H-3), 3.01 (1H, td, $J=10.8$, 4.5 Hz, H-19), 1.69 (3H, s, H-30), 1.03 (3H, s, H-23), 0.99 (3H, s, H-27), 0.95 (3H, s, H-26), 0.86 (3H, s, H-25), 0.82 (3H, s, H-24). ^{13}C NMR: see Table 2. HR-ESI-MS m/z 803.4537 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{42}\text{H}_{68}\text{O}_{13}\text{Na}$, 803.4552).

28-O- α -L-Rhamnopyranosyl betulin 3 β -O- α -L-rhamnopyranoside (22a).

This compound was prepared from the acceptor **1** (100 mg, 0.226 mmol) and the donor **8** (421 mg, 0.678 mmol) in the same manner as that described for compound **21a**. Purification by C-18 reversed phase flash chromatography (MeOH/H₂O 3:2 to 9:1) gave **22a** (53 mg, 32%, 2 steps) as a white amorphous powder. R_f 0.87 (CH₂Cl₂/MeOH 3:1); $[\alpha]_D^{25}$ -58.4° (c 0.1, CHCl₃/MeOH 1:1); ^1H NMR (CDCl₃/CD₃OD 1:1, 400 MHz) δ : 4.76 (1H, br s, H-1'), 4.70 (1H, m, H-1''), 4.70 (1H, m, H-29), 4.59 (1H, m, H-29), 3.88 (1H, m, H-2'), 3.88 (1H, m, H-2''), 3.75 (1H, dd, $J=9.4$, 6.2 Hz, H-5''), 3.69 (1H, m, H-3'), 3.69 (1H, m, H-3''), 3.60 (1H, dd, $J=9.4$, 6.4 Hz, H-5'), 3.51 (1H, d, $J=9.2$ Hz, H-28), 3.43 (1H, m, H-28), 3.40 (1H, m, H-4'), 3.38 (1H, m, H-4''), 3.07 (1H, dd, $J=11.6$, 4.8 Hz, H-3), 2.47 (1H, m, H-19), 1.69 (3H, s, H-30), 1.33 (3H, d, $J=6.2$ Hz, H-6'), 1.26 (3H, d, $J=6.4$ Hz, H-6''), 1.03 (3H, s, H-26), 0.99 (3H, s, H-27), 0.92 (3H, s, H-23), 0.84 (3H, s, H-25), 0.76 (3H, s, H-24), 0.72 (1H, br d, $J=10.0$ Hz, H-5). ^{13}C NMR (CDCl₃/CD₃OD 1:1, 100 MHz) δ : see Table 2. HR-ESI-MS m/z 757.4843 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{42}\text{H}_{70}\text{O}_{10}\text{Na}$, 757.4861).

28-O- α -L-Rhamnopyranosyl betulinic acid 3 β -O- α -L-rhamnopyranoside (22b).

This compound was prepared from the acceptor **2** (100 mg, 0.219 mmol) and the donor **8** (408 mg, 0.657 mmol) in the same manner as that described for compound **21a**. Purification by C-18 reversed phase flash chromatography (MeOH 7:3 to 17:3) gave **22b** (60 mg, 37%, 2 steps) as a white amorphous powder. R_f 0.90 (CH₂Cl₂/MeOH 3:1); $[\alpha]_D^{25}$ -47.0° (c 0.5, MeOH); ^1H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ : 6.00 (1H, d, $J=1.6$ Hz, H-1''), 4.75 (1H, d, $J=1.3$ Hz, H-29), 4.72 (1H, d, $J=1.3$ Hz,

H-1'), 4.62 (1H, br s, H-29), 3.82 (1H, dd, $J=3.2, 1.6$ Hz, H-2'), 3.79 (1H, dd, $J=3.3, 1.9$ Hz, H-2''), 3.70 (1H, m, H-5'), 3.67 (1H, m, H-3'''), 3.67 (1H, m, H-5''), 3.63 (1H, m, H-3'), 3.46 (1H, t, $J=9.4$ Hz, H-4'''), 3.36 (1H, t, $J=9.4$ Hz, H-4'), 3.07 (1H, dd, $J=11.6, 4.9$ Hz, H-3), 3.02 (1H, td, $J=10.7, 4.6$ Hz, H-19), 1.71 (3H, s, H-30), 1.27 (3H, d, $J=6.2$ Hz, H-6''), 1.22 (3H, d, $J=6.2$ Hz, H-6'), 1.02 (3H, s, H-27), 0.94 (3H, s, H-26), 0.93 (3H, s, H-23), 0.87 (3H, s, H-25), 0.77 (3H, s, H-24). ^{13}C NMR: see Table 2. HR-ESI-MS m/z 771.4639 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{42}\text{H}_{68}\text{O}_{11}\text{Na}$, 771.4654).

Cell lines and culture conditions.

Human lung carcinoma (A549), human colorectal adenocarcinoma (DLD-1), human breast adenocarcinoma (MCF7), human prostate adenocarcinoma (PC-3) and human normal skin fibroblasts (WS1) cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). All cell lines were cultured in minimum essential medium containing Earle's salts and L-glutamine (Mediatech Cellgro, VA), to which were added 10% foetal bovine serum (Hyclone), vitamins (1 \times), penicillin (100 IU/mL) and streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), essential amino acids (1 \times), and sodium pyruvate (1 \times) (Mediatech Cellgro, VA). Cells were kept at 37 $^{\circ}\text{C}$ in a humidified environment containing 5% CO_2 .

Cytotoxicity assay.

Exponentially growing cells were plated in 96-well microplates (Costar, Corning Inc.) at a density of 5×10^3 cells per well in 100 μL of culture medium and were allowed to adhere for 16 h before treatment. Increasing concentrations of each compound in biotech DMSO (Sigma-Aldrich) and the cells were incubated for 48 h. The final concentration of DMSO in the culture medium was maintained at 0.5% (v/v) to avoid solvent toxicity. Cytotoxicity was assessed using resazurin⁴² on an automated 96-well Fluoroskan Ascent F1TM plate reader (Labsystems) using excitation and emission wavelengths of 530 and 590 nm, respectively. Fluorescence was proportional to the cellular metabolic activity in each well. Survival percentage

was defined as the fluorescence in experimental wells compared to that in control wells after subtraction of blank values. Each experiment was carried out thrice in triplicate. IC₅₀ results were expressed as means \pm standard deviation.

Statistical analysis.

Significant differences of cytotoxicity between samples were determined by Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks followed by *post hoc* multiple comparisons with Student-Newman-Keuls method. Probabilities (*P*) inferior to 0.05 were considered significant. All computations were done using statistical software Sigma-Stat version 3.5.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Professor François-Xavier Garneau for reviewing this manuscript. The financial support of Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT, fonds forestiers 02) is gratefully acknowledged. Charles Gauthier thanks Programme d'Aide Institutionnel à la Recherche de l'Université du Québec à Chicoutimi (PAIR-UQAC), Fondation de l'UQAC, Association Francophone pour le Savoir (ACFAS) and FQRNT for graduate scholarships.

REFERENCES

1. Bruneton, J. In *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales*. Éditions Technique & Documentation: Paris, 1999.
2. Sparg, S. G.; Light, M. E.; van Staden, J. Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *94*, 219-243.
3. Baumann, E.; Stoya, G.; Völkner, A.; Richter, W.; Lemke, C.; Linss, W. Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure. *Acta Histochem.* **2000**, *102*, 21-35.

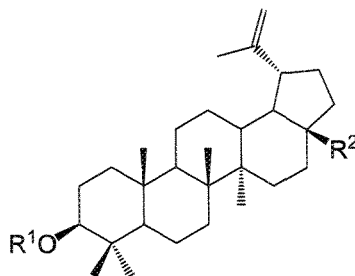
4. Oda, K.; Matsuda, H.; Murakami, T.; Katayama, S.; Ohgitani, T.; Yoshikawa, M. Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. *Biol. Chem.* **2000**, *381*, 67-74.
5. Yu, B.; Xie, J.; Deng, S.; Hui, Y. First synthesis of a bidesmosidic triterpene saponin by a highly efficient procedure. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 12196-12197.
6. Suhr, R.; Lahmann, M.; Oscarson, S.; Thiem, J. Synthesis of dihydrodiosgenin glycosides as mimetics of bidesmosidic steroidal saponins. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 4003-4011.
7. Zhang, Y.; Li, Y.; Zhu, S.; Guan, H.; Lin, F.; Yu, B. Synthesis of bidesmosidic dihydrodiosgenin saponins bearing a 3-O- β -chacotriosyl moiety. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 1753-1759.
8. Li, M.; Yu, B. Facile conversion of spirostan saponin into furostan saponin: Synthesis of methyl protodioscin and its 26-thio-analog. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2679-2682.
9. Peng, W.; Han, X.; Yu, B. Synthesis of a typical glucuronide-containing saponin, 28-O- β -D-glucopyranosyl oleanane 3-O- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucuronopyranoside. *Synthesis* **2004**, *10*, 1641-1647.
10. Kim, Y.-J.; Wang, P.; Navarro-Villalobos, M.; Rohde, B.; Derryberry, J.; Gin, D. Y. Synthetic studies of complex immunostimulants from *Quillaja saponaria*: Synthesis of the potent clinical immunoadjuvant QS-21A_{api}. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11906-11915.
11. Li, C.-X.; Zang, J.; Wang, P.; Zhang, X.-L.; Guan, H.-S.; Li, Y.-X. Synthesis of two natural oleanolic acid saponins. *Chinese J. Chem.* **2006**, *24*, 509-517.
12. Cheng, S.; Du, Y.; Bing, F.; Zhang, G. Synthesis of flaccidoside II, a bidesmosidic triterpene saponin isolated from Chinese folk medicine Di Wu. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 462-469.
13. Krasutsky, P. A. Birch bark research and development. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 919-942.

14. Sami, A.; Taru, M.; Salme, K.; Jari, Y.-K. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *29*, 1-13.
15. Gauthier, C.; Legault, J.; Lebrun, M.; Dufour, P.; Pichette, A. Glycosidation of lupane-type triterpenoids as potent in vitro cytotoxic agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6713-6725.
16. Thibeault, D.; Gauthier, C.; Legault, J.; Bouchard, J.; Dufour, P.; Pichette, A. Synthesis and structure-activity relationship study of cytotoxic germanicane- and lupane-type 3 β -*O*-monodesmosidic saponins starting from betulin. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6144-6157.
17. Klinitová, E.; Křeček, V.; Klinot, J.; Endová, M.; Eisenreichová, J.; Buděšínský, M.; Štícha, M. Glycosylation of triterpene alcohols and acids of the lupane and a-secolupane series. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1997**, *62*, 1776-1798.
18. Baglin, I.; Poumaroux, A.; Nour, M.; Tan, K.; Mitaine-Offer, A. C.; Lacaille-Dubois, M. A.; Chauffert, B.; Cavé, C. New ursolic and betulinic derivatives as potential cytotoxic agents. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.* **2003**, *18*, 111-117.
19. Ohara, S.; Ohira, T. Plant growth regulation effects of triterpenoid saponins. *J. Wood Sci.* **2003**, *49*, 59-64.
20. Samoshina, N. F.; Denisenko, M. V.; Denisenko, V. A.; Uvarova, N. I. Synthesis of glycosides of lupane-type triterpene acids. *Chem. Nat. Compd.* **2003**, *39*, 575-582.
21. Pakulski, Z. Regioselective glycosylation of unprotected mannosides: A convenient access to high-mannose type saponins. *Polish. J. Chem.* **2005**, *79*, 361-367.
22. Cmoch, P.; Pakulski, Z.; Swaczynová, J.; Strnad, M. Synthesis of lupane-type saponins bearing mannosyl and 3,6-branched trimannosyl residues and their evaluation as anticancer agents. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 995-1003.
23. Sung, T. V.; Peter-Katalinic, J.; Adam, G. A bidesmosidic triterpenoid saponin from *Schefflera octophylla*. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3717-3720.
24. Cioffi, G.; Braca, A.; Autore, G.; Morelli, I.; Pinto, A.; Venturella, F.; De Tommasi, N. Cytotoxic saponins from *Schefflera fagueti*. *Planta Med.* **2003**, *69*, 750-756.

25. Braca, A.; Autore, G.; De Simone, F.; Marzocco, S.; Morelli, I.; Venturella, F.; De Tommasi, N. Cytotoxic saponins from *Schefflera rotundifolia*. *Planta Med.* **2004**, *70*, 960-966.
26. Mimaki, Y.; Yokosuka, A.; Kuroda, M.; Hamanaka, M.; Sakuma, C.; Sashida, Y. New bidesmosidic triterpene saponins from the roots of *Pulsatilla chinensis*. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1226-1229.
27. Ye, W.; Zhang, Q.; Hsiao, W. W. L.; Zhao, S.; Che, C.-T. New lupane glycosides from *Pulsatilla chinensis*. *Planta Med.* **2002**, *68*, 183-186.
28. Glebko, L. I.; Krasovskaj, N. P.; Strigina, L. I.; Ulanova, K. P.; Denisenko, V. A.; Dmitrenok, P. S. Triterpene glycosides from *Pulsatilla chinensis*. *Russ. Chem. B.* **2002**, *51*, 1945-1950.
29. Ziegler, T.; Bien, F.; Jurisch, C. Chemoenzymic synthesis of glycosylated enantiomerically pure 4-pentene 1,2- and 1,3-diol derivatives. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 765-780.
30. Fukase, K.; Winarno, H.; Kusumoto, S. Activation of trichloroacetimidates using montmorillonite as a heterogeneous acid catalyst - convenient glycosidation and benzylation reactions. *Chem. Express* **1993**, *8*, 409-412.
31. Schmidt, R. R.; Toepfer, A. Glycosylation with highly reactive glycosyl donors: Efficiency of the inverse procedure. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 3353-3356.
32. Bliard, C.; Massiot, G.; Nazabadioko, S. Glycosylation of acids under phase transfer conditions. Partial synthesis of saponins. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 6107-6108.
33. Li, T.-S.; Wang, J.-X.; Zheng, X.-J. Simple synthesis of allobetulin, 28-oxoallobetulin and related biomarkers from betulin and betulinic acid catalysed by solid acids. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, **1998**, 3957-3965.
34. Du, Y.; Wei, G.; Linhardt, R. J. Total synthesis of quercetin 3-sophorotrioside. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2206-2209.
35. Fletcher, H. G. Tetra-*O*-benzoyl- α -D-glucopyranosyl bromide. *Meth. Carbohydr. Chem.* **1963**, *2*, 226-228.

36. Schmidt, R. R. Anomeric-oxygen activation for glycoside synthesis: the trichloroacetimidate method. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, *50*, 21-123.
37. Wang, P.; Zhang, Z.; Yu, B. Total synthesis of CRM646-A and -B, two fungal glucuronides with potent heparinase inhibition activities. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 8884-8889.
38. Li, C.; Yu, B.; Liu, M.; Hui, Y. Synthesis of diosgenyl α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopyranoside (gracillin) and related saponins. *Carbohydr. Res.* **1998**, *306*, 189-195.
39. Agrawal, P. K. NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3307-3330.
40. Jermal, A.; Siegel, R.; Ward, E.; Murray, T.; Xu, J.; Smigal, C.; Thun, M. J. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J. Clin.* **2006**, *56*, 106-130.
41. Kessler, J. H.; Mullauer, F. B.; de Roo, G. M.; Medema, J. P. Broad in vitro efficacy of plant-derived betulinic acid against cell lines derived from the most prevalent human cancer types. *Cancer Lett.* **2007**, *251*, 132-145.
42. O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5421-5426.
43. Bellamy, W. T. Prediction of response to drug therapy of cancer. A review of in vitro assays. *Drugs* **1992**, *44*, 690-708.
44. Kim, D. S. H. L.; Pezzuto, J. M.; Pisha, E. Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 1707-1712.
45. Chatterjee, P.; Pezzuto, J. M.; Kouzi, S. A. Glucosidation of betulinic acid by *Cunninghamella* species. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 761-763.
46. Urban, M.; Sarek, J.; Tislerova, I.; Dzubak, P.; Hajduch, M. Influence of esterification and modification of A-ring in a group of lupane acids on their cytotoxicity. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5527-5535.
47. Cham, B. E.; Daunter, B. Solasodine glycosides. Selective cytotoxicity for cancer cells and inhibition of cytotoxicity by rhamnose in mice with sarcoma 180. *Cancer Lett.* **1990**, *55*, 221-225.

48. Chang, L.-C.; Tsai, T.-R.; Wang, J.-J.; Lin, C.-N.; Kuo, K.-W. The rhamnose moiety of solamargine plays a crucial role in triggering cell death by apoptosis. *Biochem. Bioph. Res. Co.* **1998**, *242*, 21-25.
49. Raz, A.; Lotan, R. Tumor cell surface lectins and metastasis. *UCLA Symp. Mol. Cell. B.* **1988**, *78*, 237-244.
50. Mody, R.; Shantaram, J.; Chaney, W. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *J. Pharmacol. Toxicol.* **1995**, *33*, 1-10.
51. Jordinson, M.; Calam, J.; Pignatelli, M. Lectins: from basic science to clinical application in cancer prevention. *Exp. Opin. Invest. Drugs* **1998**, *7*, 1389-1403.
52. Yamazaki, N.; Kojima, S.; Bovin, N. V.; André, S.; Gabius, S.; Gabius, H.-J. Endogenous lectins as targets for drug delivery. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2000**, *43*, 225-244.
53. Ambrosi, M.; Cameron, N. R.; Davis, B. G. Lectins: Tools for the Molecular Understanding of the Glycocode. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1593-1608.
54. Wu, A. M.; Lisowska, E.; Duk, M.; Yang, Z. Lectins as tools in glycoconjugate research. *Glycoconj. J.* **2008**, doi: 10.1007/s10719-008-9119-7.
55. Yu, B.; Tao, H. Glycosyl trifluoroacetimidates. Part 1: Preparation and application as new glycosyl donors. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2405-2407.
56. Gauthier, C.; Legault, J.; Lavoie, S.; Rondeau, S.; Tremblay, S.; Pichette, A. Synthesis of two natural betulinic acid saponins containing α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranose and their analogues. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 7386-7399.

Table 1. Cytotoxicity (IC₅₀) of bidesmosidic saponins against cancer cell lines.

Cpd	R ¹	R ²	IC ₅₀ (μmol•L ⁻¹)				
			A549	DLD-1	MCF7	PC-3	WS1
1	H	CH ₂ OH	3.8 ± 0.1	6.6 ± 0.3	23.3 ± 0.5	17.9 ± 0.9	3.6 ± 0.1
2	H	COOH	10.3 ± 0.4	15.0 ± 0.3	41 ± 1	40 ± 2	12 ± 1
-	H	CH ₂ O-β-D-Glc	>100	>100	>100	>100	>100
-	H	COO-β-D-Glc	>100	>100	>100	>100	>100
21a	β-D-Glc	CH ₂ O-β-D-Glc	>100	27 ± 2	14.5 ± 0.9	>100	20 ± 2
21b	β-D-Glc	COO-β-D-Glc	>100	>100	20 ± 2	66 ± 3	35 ± 3
16a	α-L-Ara	CH ₂ O-β-D-Glc	>100	19 ± 2	9.5 ± 0.8	5.3 ± 0.6	4.5 ± 0.3
3	α-L-Ara	COO-β-D-Glc	76 ± 4	60 ± 5	23 ± 1	68 ± 7	50 ± 7
16b	α-L-Rha	CH ₂ O-β-D-Glc	16.8 ± 0.9	10.6 ± 0.9	9.0 ± 0.7	6.9 ± 0.4	5.3 ± 0.4
19	α-L-Rha	COO-β-D-Glc	23 ± 1	11.0 ± 0.5	5.7 ± 0.6	11.2 ± 0.8	9 ± 1
22a	α-L-Rha	CH ₂ O-α-L-Rha	1.9 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.7 ± 0.2	1.8 ± 0.1	1.3 ± 0.1
22b	α-L-Rha	COO-α-L-Rha	7.2 ± 0.5	7.3 ± 0.3	6.0 ± 0.6	7.2 ± 0.5	4.9 ± 0.7
		Etoposide	1.2 ± 0.1	3.1 ± 0.8	nd ^a	23 ± 1	2.2 ± 0.4

Glc, glucopyranose; Rha, rhamnopyranose; Ara, arabinopyranose.

^a Not determined.

Table 2. ^{13}C NMR data of bidesmosidic saponins **3**, **16a**, **16b**, **19**, **21a**, **21b**, **22a** and **22b**^a

C	3^b	16a^b	16b^b	19^c	21a^d	21b^c	22a^b	22b^c
1	39.5 (t)	39.2 (t)	39.1 (t)	39.9 (t)	39.4 (t)	40.1 (t)	39.0 (t)	39.9 (t)
2	26.7 (t)	26.4 (t)	26.0 (t)	26.8 (t)	27.1 (t)	27.2 (t)	25.9 (t)	26.8 (t)
3	90.3 (d)	90.2 (d)	89.7 (d)	90.4 (d)	89.2 (d)	90.9 (d)	89.7 (d)	90.4 (d)
4	39.8 (s)	39.6 (s)	39.5 (s)	40.2 (s)	40.0 (s)	40.3 (s)	39.4 (s)	40.2 (s)
5	56.5 (d)	56.1 (d)	55.9 (d)	56.9 (d)	56.2 (d)	57.2 (d)	55.8 (d)	56.9 (d)
6	18.8 (t)	18.6 (t)	18.7 (t)	19.4 (t)	18.8 (t)	19.3 (t)	18.6 (t)	19.4 (t)
7	35.0 (t)	34.6 (t)	34.6 (t)	35.5 (t)	34.8 (t)	35.5 (t)	34.6 (t)	35.6 (t)
8	41.5 (s)	41.4 (s)	41.4 (s)	42.0 (s)	41.5 (s)	42.1 (s)	41.3 (s)	42.0 (s)
9	51.4 (d)	50.8 (d)	50.9 (d)	52.0 (d)	51.0 (d)	52.0 (d)	50.8 (d)	51.9 (d)
10	37.6 (s)	37.3 (s)	37.3 (s)	38.1 (s)	37.4 (s)	38.1 (s)	37.2 (s)	38.1 (s)
11	21.6 (t)	21.3 (t)	21.3 (t)	22.1 (t)	21.3 (t)	22.1 (t)	21.2 (t)	22.2 (t)
12	26.3 (t)	25.7 (t)	25.7 (t)	26.9 (t)	26.0 (t)	26.9 (t)	25.6 (t)	26.9 (t)
13	38.8 (d)	38.0 (d)	38.0 (d)	39.4 (d)	38.0 (d)	39.4 (d)	38.0 (d)	40.0 (d)
14	43.1 (s)	43.1 (s)	43.1 (s)	43.6 (s)	43.3 (s)	43.6 (s)	43.1 (s)	43.7 (s)
15	30.2 (t)	27.5 (t)	27.5 (t)	30.8 (t)	28.0 (t)	30.9 (t)	27.5 (t)	30.8 (t)
16	32.4 (t)	29.9 (t)	29.9 (t)	32.8 (t)	30.4 (t)	32.8 (t)	30.1 (t)	33.1 (t)
17	57.4 (s)	47.6 (s)	47.6 (s)	57.9 (s)	48.1 (s)	58.0 (s)	47.3 (s)	58.3 (s)
18	50.1 (d)	49.3 (d)	49.3 (d)	50.6 (d)	49.5 (d)	50.6 (d)	49.2 (d)	50.5 (d)
19	47.7 (d)	48.3 (d)	48.3 (d)	48.4 (d)	48.4 (d)	48.4 (d)	48.3 (d)	48.8 (d)
20	151.1 (s)	151.0 (s)	151.0 (s)	151.8 (s)	151.3 (s)	151.9 (s)	150.8 (s)	151.5 (s)
21	31.0 (t)	30.1 (t)	30.1 (t)	31.5 (t)	30.5 (t)	31.5 (t)	30.3 (t)	31.8 (t)
22	37.1 (t)	35.1 (t)	35.1 (t)	37.5 (t)	35.6 (t)	37.5 (t)	35.3 (t)	38.0 (t)
23	28.2 (q)	28.2 (q)	28.3 (q)	28.7 (q)	28.5 (q)	28.4 (q)	28.3 (q)	28.7 (q)
24	16.5 (q)	16.5 (q)	16.4 (q)	16.8 (q)	16.4 (q)	16.8 (q)	16.4 (q)	16.8 (q)
25	16.6 (q)	16.5 (q)	16.4 (q)	16.8 (q)	17.2 (q)	16.8 (q)	16.4 (q)	16.8 (q)
26	16.3 (q)	16.4 (q)	16.3 (q)	16.7 (q)	16.7 (q)	16.7 (q)	16.2 (q)	16.8 (q)
27	15.1 (q)	15.1 (q)	15.1 (q)	15.2 (q)	15.3 (q)	15.2 (q)	15.0 (q)	15.2 (q)
28	175.9 (s)	68.9 (t)	68.8 (t)	176.1 (s)	68.9 (t)	176.2 (s)	66.4 (t)	175.6 (s)
29	110.1 (t)	110.0 (t)	109.9 (t)	110.3 (t)	110.4 (t)	110.3 (t)	110.0 (t)	110.6 (t)
30	19.5 (q)	19.4 (q)	19.3 (q)	19.5 (q)	19.6 (q)	19.5 (q)	19.3 (q)	19.6 (q)

C	3 ^b	16a ^b	16b ^b	19 ^c	21a ^d	21b ^c	22a ^a	22b ^c
1'	106.2 (d)	105.5 (d)	103.3 (d)	104.4 (d)	107.3 (d)	106.8 (d)	103.1 (d)	104.4 (d)
2'	72.1 (d)	71.7 (d)	71.5 (d)	72.5 (d)	76.2 (d)	75.7 (d)	71.4 (d)	72.5 (d)
3'	73.6 (d)	73.1 (d)	71.9 (d)	72.5 (d)	79.2 (d)	78.3 (d)	71.9 (d)	72.6 (d)
4'	68.4 (d)	67.8 (d)	73.4 (d)	74.1 (d)	72.2 (d)	71.7 (d)	73.3 (d)	74.1 (d)
5'	65.4 (t)	64.9 (t)	68.8 (d)	69.9 (d)	78.7 (d)	77.7 (d)	68.8 (d)	69.9 (d)
6'	-	-	17.5 (q)	17.9 (q)	63.4 (t)	62.8 (t)	17.7 (q)	17.9 (q)
1''	94.6 (d)	104.3 (d)	104.4 (d)	95.2 (d)	106.4 (d)	95.2 (d)	101.1 (d)	95.1 (d)
2''	73.4 (d)	74.2 (d)	74.2 (d)	74.1 (d)	75.8 (d)	74.1 (d)	71.3 (d)	71.4 (d)
3''	77.7 (d)	76.9 (d)	77.0 (d)	78.4 (d)	79.0 (d)	78.4 (d)	71.8 (d)	72.8 (d)
4''	70.6 (d)	70.8 (d)	70.8 (d)	71.1 (d)	72.2 (d)	71.1 (d)	73.1 (d)	73.4 (d)
5''	78.0 (d)	76.3 (d)	76.5 (d)	78.8 (d)	79.0 (d)	78.8 (d)	68.7 (d)	69.9 (d)
6''	62.0 (t)	62.3 (t)	62.1 (t)	62.4 (t)	63.3 (t)	62.4 (t)	17.5 (q)	18.2 (q)

^a Spectra recorded at 100 MHz. The multiplicities were deduced from DEPT experiments.

^b CDCl₃/CD₃OD

^c CD₃OD

^d Pyridine-*d*₅

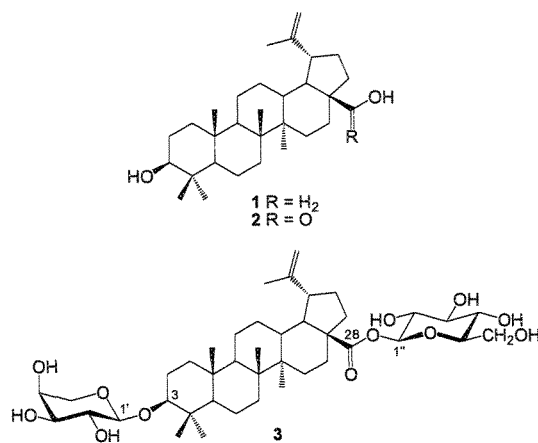


Figure 1. Structures of betulin (1), betulinic acid (2) and natural bidesmosidic betulinic acid saponin (3).

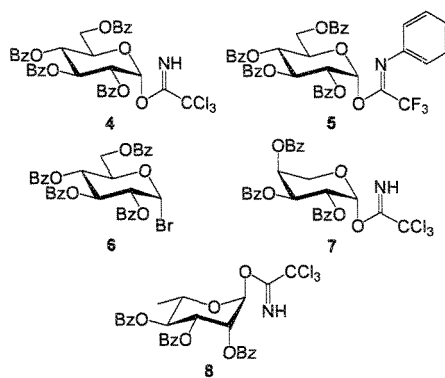
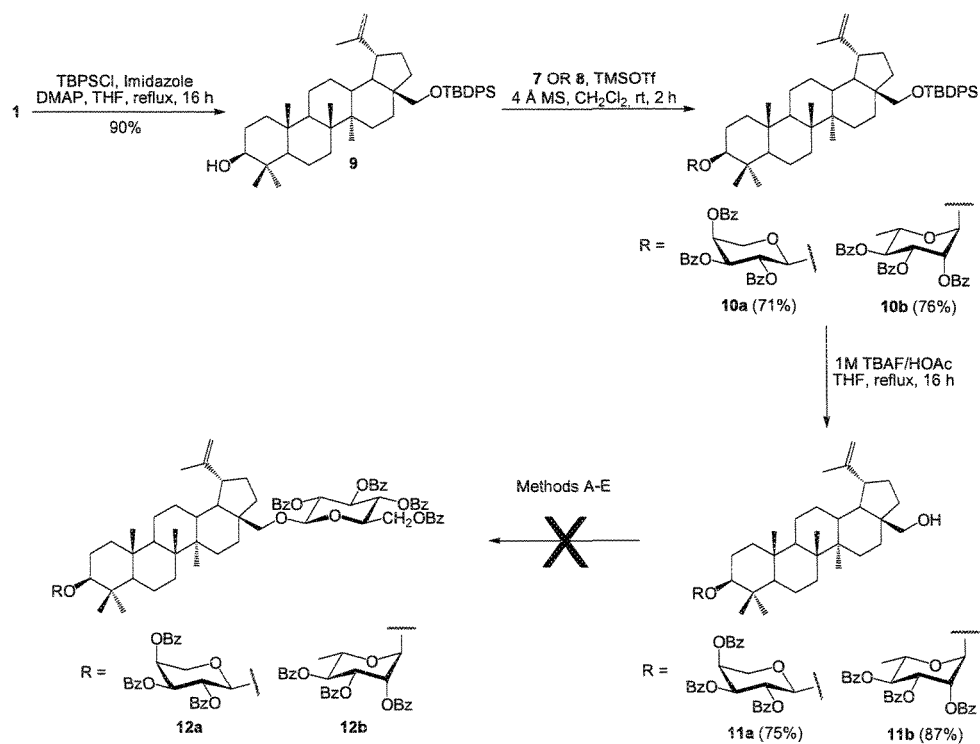
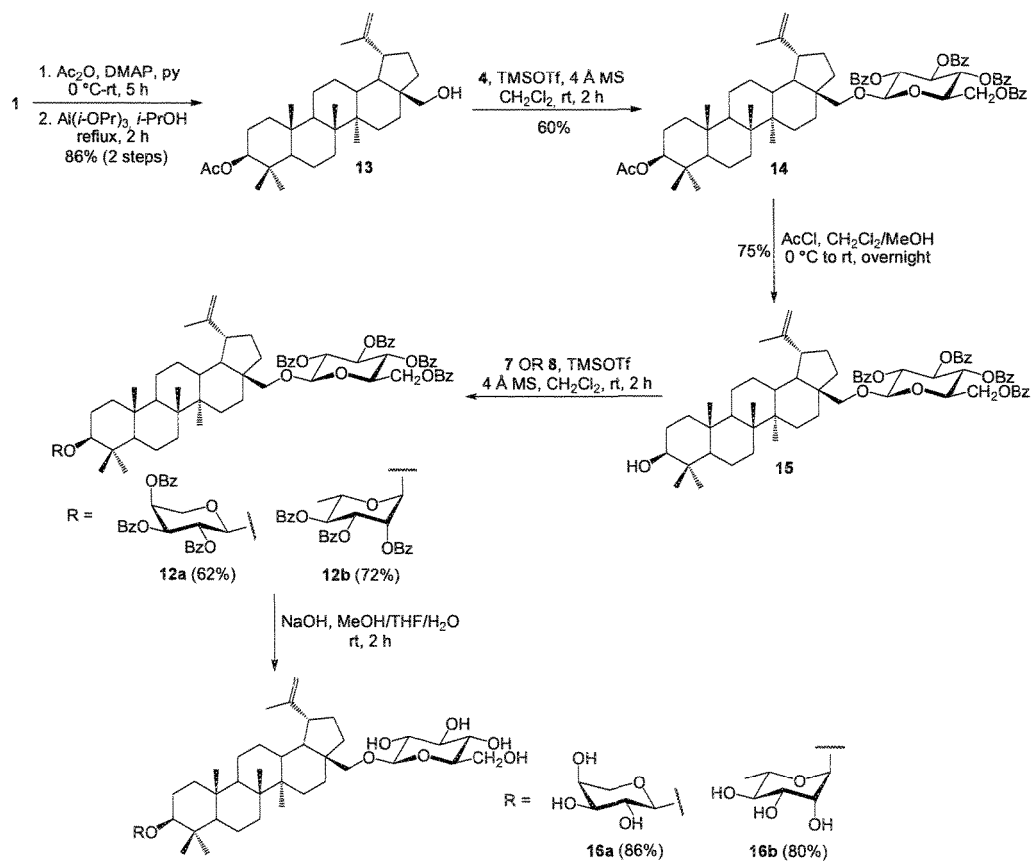


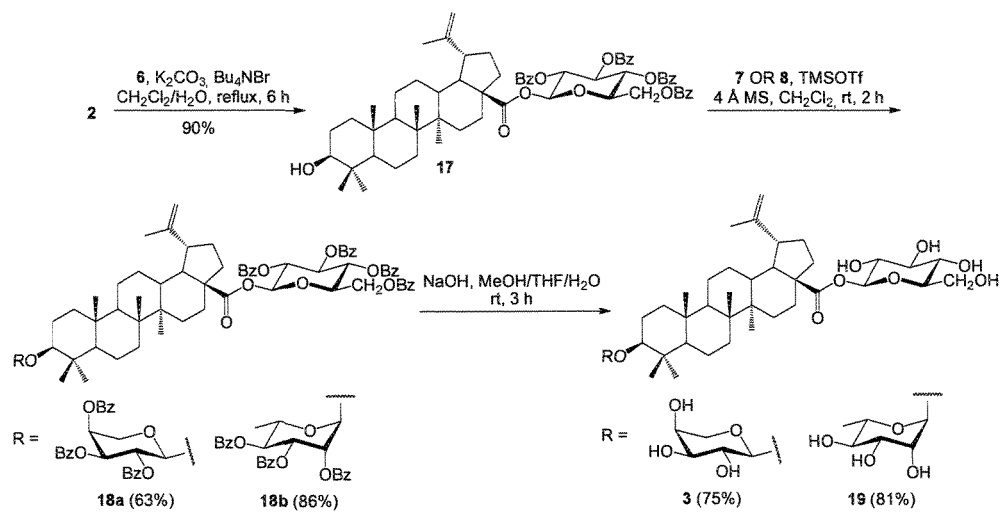
Figure 2. Glycosyl donors (4-8) used for the synthesis of bidesmosides.



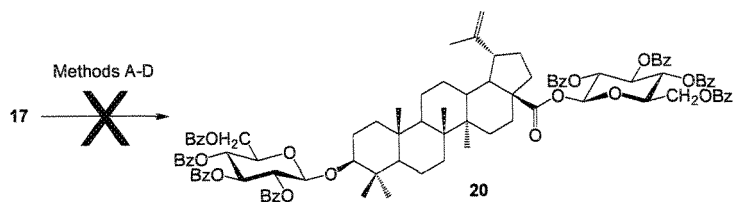
Scheme 1. Attempts to synthesize bidesmosidic betulin saponins (**12a** and **12b**). A: donor **4** (1.5 equiv), TMSOTf, CH₂Cl₂, 4 Å MS, rt, 16 h; B: inverse procedure, donor **4** (1.5 equiv), TMSOTf, CH₂Cl₂, 4 Å MS, -10 °C to rt, 2.5 h; C: donor **6** (1.5 equiv), AgOTf, CH₂Cl₂, 4 Å MS, -78 to 0 °C, 2 h; D: donor **5** (1.5 equiv), BF₃•OEt₂, CH₂Cl₂, 4 Å MS, -78 to 0 °C, 24 h; E: donor **6** (1.3 equiv), K₂CO₃, Bu₄NBr, CH₂Cl₂/H₂O 1:1, reflux, 5 h.



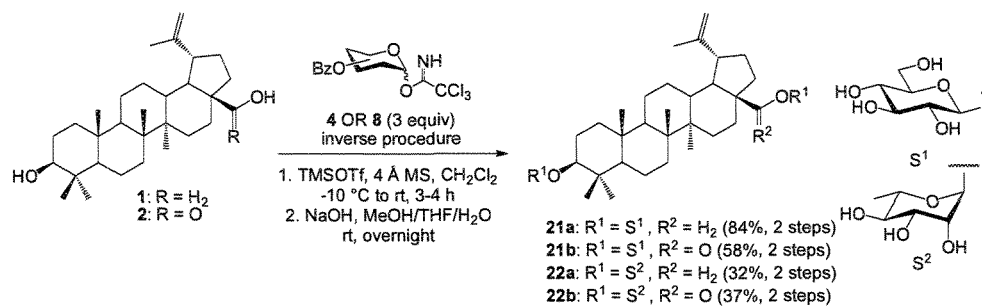
Scheme 2. Completion of the synthesis of bidesmosidic betulin saponins (**16a** and **16b**).



Scheme 3. Synthesis of bidesmosidic betulinic acid saponins (**3** and **19**).



Scheme 4. Attempts to synthesize benzoylated bidesmosidic betulinic saponins (**20**).
A: donor **4** (1.5 equiv), TMSOTf, CH₂Cl₂, 4 Å MS, rt, 16 h; B: inverse procedure, donor **4** (3 equiv), TMSOTf, CH₂Cl₂, 4 Å MS, -10 °C to rt, 3.5 h; C: donor **6** (1.5 equiv), Ag₂O, CH₃CN/CH₂Cl₂, 4 Å MS, rt, 4 d; D: donor **6** (1.5 equiv), AgOTf, CH₂Cl₂, 4 Å MS, 0 to 16 °C, 2 h.



Scheme 5. Synthesis of bidesmosidic saponins (**21a**, **21b**, **22a** and **22b**) by Schmidt's "inverse procedure".

CHAPITRE 5

HAEMOLYTIC ACTIVITY, CYTOTOXICITY, AND MEMBRANE CELL PERMEABILIZATION OF SEMI-SYNTHETIC AND NATURAL LUPANE- AND OLEANANE-TYPE SAPONINS

Charles Gauthier, Jean Legault, Karl Girard-Lalancette, Vakthang
Mshvildadze and André Pichette[‡]

(Article à soumettre à *Biochimica et Biophysica Acta*)

*Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales, Département des
Sciences Fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, 555 boul. de
l'Université, Chicoutimi, (Québec), Canada, G7H 2B1*

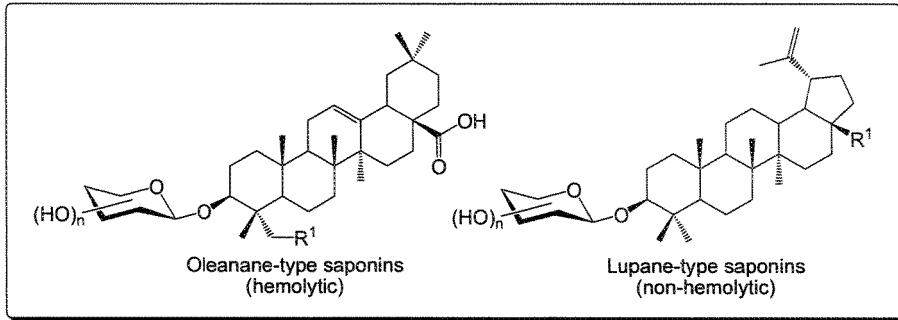
Keywords: Saponin; lupane; oleanane; haemolytic activity; cytotoxicity; membrane permeabilization; betulinic acid; betulin; hederacolchiside.

[‡] Corresponding author. Tel: +1 418 545-5011; fax: +1 418 545-5012; e-mail:

andre_pichette@uqac.ca

CONTRIBUTION DES AUTEURS

L'auteur principal de cet article (C. Gauthier) a rédigé toutes les sections du manuscrit. K. Girard-Lalancette a réalisé les tests d'activité hémolytique et de perméabilisation de la membrane cellulaire. Les composés de type lupane utilisés lors des tests biologiques provenaient de la banque de produits de C. Gauthier tandis que ceux de type oléanane provenaient de la banque à V. Mshvildadze. J. Legault et A. Pichette sont, respectivement, les co-directeur et directeur du présent projet de thèse.

RÉSUMÉ GRAPHIQUE

RÉSUMÉ

La majorité des saponines connues à ce jour induisent l'hémolyse des globules rouges de mammifères. Cette activité induisant une toxicité sanguine présente un désavantage important pour le développement futur de ces molécules glycosylées en tant qu'agents antitumoraux. Dans cette étude, les activités hémolytique et cytotoxique en plus des propriétés de perméabilisation des membranes cellulaires ont été évaluées pour une librairie moléculaire de 31 saponines naturelles et semi-synthétiques de type lupane et oléanane afin d'établir des relations significatives entre la structure et l'activité biologique. Les résultats montrent que les saponines de type lupane n'induisent pas l'hémolyse des globules rouges ni la perméabilisation des membranes cellulaires indépendamment de la nature des sections osidiques. Tandis que les saponines de type oléanane telles que la β -hédérine (25) et l'hédéracolchiside A₁ (27) provoquent la mort des cellules cancéreuses en perméabilisant les membranes cellulaires, les saponines de type lupane semblent agir selon un autre mécanisme qui pourrait être lié à l'induction de l'apoptose (suicide cellulaire programmé). En somme, cette étude suggère que les glycosides de type lupane 10 et 22 cytotoxiques contenant une section α -L-rhamnopyranose à la position C-3 pourraient représenter des agents antitumoraux prometteurs due à leur faible toxicité en regard de l'hémolyse des globules rouges.

ABSTRACT

The haemolysis of red blood cells inducing toxicity in most animals including humans is a major drawback for the clinical development of saponins as antitumor agents. In this study, the haemolytic and cytotoxic activities as well as the membrane cell permeabilization property of a library of 31 semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins were evaluated and the structure-activity relationships were established. It was shown that, lupane-type saponins do not exhibit any haemolytic activity and membrane cell permeabilization property at the maximum concentration tested ($IC_{50} > 100 \mu M$) independently of the nature of the sugar moieties. While oleanane-type saponins such as β -hederin (**25**) and hederacolchiside A_1 (**27**) cause the death of cancer cell lines by permeabilizing the cellular membranes, lupane-type saponins seem to proceed via another mechanism which could be related to the induction of apoptosis. The overall results suggest that the cytotoxic lupane-type glycosides **10** and **22** bearing an α -L-rhamnopyranose moiety at the C-3 position could represent promising antitumor agents for further studies on tumor-bearing mice since they are devoid of toxicity associated with the haemolysis of red blood cells.

INTRODUCTION

Saponins are natural compounds found in higher plants and exhibit a wide spectrum of biological activities [Sparg *et al.*, 2004]. Despite a marked interest of the scientific community during the past decade towards the isolation [Vincken *et al.*, 2007], total synthesis [Yu *et al.*, 2007] and pharmacological properties [Liu *et al.*, 2002; Sparg *et al.*, 2004] of these ubiquitous glycosides, the haemolytic activity of saponins inducing toxicity in most animals is a major drawback for their clinical development. Although the exact mechanism of the rupture of erythrocyte membranes (haemolysis) by saponins is not yet clearly understood, it was found to be correlated with their amphiphilic properties. It has been hypothesized that saponins interact with lipid membranes of cells [Melzig *et al.*, 2001] and form insoluble complexes with cholesterol leading to formation of pores [Seeman *et al.*, 1973], permeabilization of cells [Baumann *et al.*, 2000] and subsequent loss of haemoglobin in the extracellular medium. On the other hand, Winter and co-workers [Winter, 1994] proposed a different mechanism in which the haemolysis of erythrocytes is caused by the interaction of saponins with the water channel aquaporin resulting in an increase of the water transport.

Since all saponins are not haemolytic, some structure-activity relationship (SAR) studies were recently undertaken in order to find active compounds such as anticancer agents [Chwalek *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007] or vaccine adjuvants [Oda *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2005; Sun, 2006] devoid of toxicity. It was shown that there is no evident correlation between the haemolysis of red blood cells and cytotoxicity of saponins [Wang *et al.*, 2007], and both the nature of the aglycone and the osidic part are important for these biological activities [Chwalek *et al.*, 2006]. Voutquenne and co-workers [Voutquenne *et al.*, 2002] reported that, among 59 tested triterpenoid glycosides, bidesmosidic saponins bearing sugar moieties at both C-3 and C-28 positions were generally less haemolytic than C-3 monodesmosides toward erythrocytes. In another study, it was also pointed out that the presence of non-natural linkages (1,2-*cis*-glycosides) have detrimental effects for both the haemolytic and cytotoxic activities of saponins [Chwalek *et al.*, 2006]. However,

since the isolation and total synthesis of saponins are usually quite difficult to achieve, the SAR studies are often limited by the possibility of obtaining a broad variety of pure saponins in a convenient quantity for biological assays.

In the past few years, our laboratory has been interested in the synthesis of cytotoxic lupane-type saponins having pentacyclic triterpenoids betulinic acid (**1**) or betulin (**2**) as aglycones. To this date, more than fifty natural and non-natural saponins have been chemically synthesized such as monodesmosides [Gauthier *et al.*, 2006; Thibeault *et al.*, 2007; Gauthier *et al.*, 2008a] and bidesmosides [Gauthier *et al.*, 2008b] containing various sugar moieties. Our SAR studies have shown that highly potent [Gauthier *et al.*, 2008b] and/or selective [Gauthier *et al.*, 2006] anticancer agents are obtained for lupane-type saponins bearing an α -L-rhamnopyranose moiety at the C-3 position. Thus, we thought that it would be of interest to investigate the haemolytic activity of these lupane-type saponins in relation with their cytotoxicity profile in order to choose “lead” compounds devoided of undesirable toxicity for further *in vivo* studies on tumor bearing mice. To our knowledge, this is the first report on the haemolytic activity and SAR of saponins having betulinic acid (**1**) or betulin (**2**) as aglycones. As shown in Tables 1 and 2, natural oleanane-type saponins such as hederagenin 3 β -O- β -D-glucopyranoside (**7**), δ -hederin (**23**), α -hederin (**24**), β -hederin (**25**), hederacolchiside A (**26**) and hederacolchiside A₁ (**27**) isolated from species of the *Hedera* genus [Elias *et al.*, 1991; Mshvildadze *et al.*, 1992; Mshvildadze *et al.*, 1993; Mshvildadze *et al.*, 2001] were also investigated and their activities were compared to lupane-type saponins (**5**, **6**, **8-22**, **28-35**) and triterpenoid aglycones (**1-4**). α -Hederin (**24**) and hederacolchiside A₁ (**27**) were already shown to possess strong haemolytic [Chwalek *et al.*, 2006] and anticancer activities [Lee *et al.*, 2000; Muthu Kumara *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2001; Barthomeuf *et al.*, 2002; Bang *et al.*, 2005b; Rooney *et al.*, 2005; Gerkens *et al.*, 2007] both *in vitro* and *in vivo* which are related to their capacity to interact with biological membranes [Debiton *et al.*, 2004; Mazzucchelli *et al.*, 2008]. In this study, we report the *in vitro* haemolytic and cytotoxic activities as well as the membrane cell permeabilization property (calcein-

AM assay) of a library of 31 semi-synthetic and natural saponins of the lupane and oleanane family and discuss their SAR.

RESULTS

Haemolysis of red blood cells

In vitro haemolytic activities of triterpenoids **1-4** and saponins **5-35** on sheep red blood cells (erythrocytes) are shown in Figure 1. The values are expressed as the concentrations that cause 50% haemolysis of erythrocytes (HD_{50}). PBS buffer at pH 7.4 was used as a negative control and Sigma-Aldrich® Saponin mixture from quillaja bark (20-35% sapogenin) was used as a positive control. Significant differences in the values \pm standard deviation were calculated in comparison with PBS.

Firstly, the results in Figure 1 clearly indicate that lupane-type saponins were non-haemolytic compared to oleanane-type saponins with HD_{50} values mostly over 100 μ M similar to the negative control. While betulinic acid (**1**), betulin (**2**) and betulin glycosides were completely inactive, only three saponins with betulinic acid (**1**) as aglycone showed slight haemolytic activity significantly different from those of the control and oleanane glycosides ($P < 0.05$), i.e. saponin **21** bearing two α -L-rhamnopyranose moieties at both C-3 and C-28 ($HD_{50} = 85 \pm 3 \mu$ M), saponin **30** bearing an α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranose moiety at C-3 ($HD_{50} = 78 \pm 4 \mu$ M), and saponin **32** bearing an α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]- α -L-arabinopyranose moiety at C-3 ($HD_{50} = 94 \pm 11 \mu$ M).

In contrast, all natural oleanane-type saponins induced strong haemolysis of red blood cells with HD_{50} values ranging from 1.7 to 22 μ M. The saponins β -hederin (**25**) and hederacolchiside A₁ (**27**) with oleanolic acid (**4**) as aglycone were the most haemolytic of all tested saponins ($HD_{50} = 2.0 \pm 0.1$ and $1.7 \pm 0.1 \mu$ M, respectively) and were more active than the positive control. δ -Hederin (**23**) and α -hederin (**24**)

showing significantly ($P < 0.05$) similar haemolytic activity ($HD_{50} = 12 \pm 1$ and 10 ± 1 μM , respectively) were approximately five to six fold less active than saponins **25** and **27**. The activity of hederagenin saponin bearing a β -D-glucopyranose moiety at C-3, colchiside (**7**), was significantly higher than saponins **23** and **24** with an HD_{50} value of 16 ± 2 μM . The least potent oleanane-type saponin to induce the haemolysis of erythrocytes was hederacolchiside A (**26**) ($HD_{50} = 22 \pm 3$ μM). The related triterpenoids hederagenin (**3**) and oleanolic acid (**4**) did not exhibit haemolytic activity at the maximum concentration tested ($HD_{50} > 100$ μM).

Cytotoxic activity

The *in vitro* antiproliferative activity of compounds **1-35** against lung carcinoma (A549), colorectal adenocarcinoma (DLD-1) and normal skin fibroblasts (WS1) human cell lines was assessed using the resazurin reduction test [O'Brien *et al.*, 2000] in which the fluorescence is proportional to the cellular metabolic activity. Betulinic acid (**1**) was used as a positive control [Kessler *et al.*, 2007] in this assay. The cytotoxicity results presented in Table 3 are expressed as the concentration inhibiting 50% of the cell growth (IC_{50}). They are subdivided into five groups: triterpenoids (**1-4**; group I), lupane monodesmosides (**5, 6, 8-16**; group II), lupane bidesmosides (**17-22**; group III), oleanane saponins (**7, 23-27**; group IV), and lupane saponins containing α -L-arabinopyranose (**28-35**; group V).

In the first group, betulin (**2**) was the most cytotoxic triterpenoid ($IC_{50} = 3.6-6.6$ μM) followed by betulinic acid (**1**) ($IC_{50} = 10.3-15.0$ μM). In contrast, hederagenin (**3**) and oleanolic acid (**4**) were only moderately active against A549 cancer cell lines ($IC_{50} = 39 \pm 6$ and 27 ± 3 μM , respectively) while they did not exhibit any cytotoxicity against DLD-1.

As previously reported [Gauthier *et al.*, 2006; Thibeault *et al.*, 2007], betulinic acid 3 β -*O*- α -L-rhamnopyranoside (**10**, $IC_{50} = 2.6-3.9$ μM) was the most active monodesmosidic lupane-type saponin of group II against cancer cell lines followed

by betulin 3 β -*O*- α -D-mannopyranoside (**14**, IC₅₀ = 7.3-10.1 μ M), and betulinic acid 3 β -*O*- α -D-arabinopyranoside (**11**, IC₅₀ = 10-17 μ M). The saponins (**8**, **9**, **16**) bearing a glucopyranose moiety at either C-3 or C-28 were not able to exhibit cytotoxicity at the maximum concentration tested (IC₅₀ >100 μ M). Moreover, the unusual α -L-arabinofuranosides (**5**, **6**) were also completely inactive against cancer (IC₅₀ >100 μ M).

Of all tested compounds in this study, betulin bis-3,28- α -L-rhamnopyranoside (**22**) was the most potent to inhibit the growth of cancer cell lines with IC₅₀ ranging from 1.7 to 1.9 μ M [Gauthier *et al.*, 2008b]. Bidesmoside **21** bearing two rhamnose moieties was also strongly active (IC₅₀ 4.9-7.3 μ M) with a cytotoxicity profile slightly superior than betulinic acid (**1**). In addition, the bidesmosidic saponins **19** and **20** containing a rhamnose moiety at C-3 were significantly more active than **1** against colon adenocarcinoma cell lines (IC₅₀ = 11.0 \pm 0.5 and 10.6 \pm 0.9 μ M, respectively).

In group IV consisting of oleanane-type saponins, the order of anticancer activity was quite similar to the haemolytic activity. Indeed, there is a significant correlation between both biological activities (P <0.05, Pearson product moment correlation). However, oleanane saponins (**7**, **23-27**) were not as cytotoxic as the positive control betulinic acid (**1**) against A549 and DLD-1. The strongest cytotoxicities on human cell lines were exerted by β -hederin (**25**) and hederacolchiside A₁ (**27**) (IC₅₀ = 14-30 and 5.7-16 μ M, respectively). Other saponins (**7**, **23**, **24** and **26**) with hederagenin (**3**) as aglycone were only moderately active against cancer with IC₅₀ ranging from 30-62 μ M.

In the last group, lupane-type saponins (**30**, **31**, **32** and **35**) containing an α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranose moiety did not exhibit any cytotoxicity at maximum concentration tested. The most active saponin of group V was betulinic acid 3 β -*O*- α -L-arabinopyranoside (**28**) which exerted a cytotoxicity profile similar to the parent triterpenoid **1** against cancer cell lines (IC₅₀ = 11-12 μ M)

while the betulin analogue **29** was inactive ($IC_{50} >100 \mu M$). The addition of a glucose moiety at the C-28 position of **28** to give bidesmoside **33** had a detrimental effect on the anticancer activity ($IC_{50} = 50-76 \mu M$). In contrast, the cytotoxicity against A549 and WS1 was increased when a glucose moiety was added at the C-28 position of **29** to give bidesmoside **34** ($IC_{50} = 19 \pm 2$ and $4.5 \pm 0.3 \mu M$, respectively).

Permeabilization of cell membrane

In order to evaluate the propensity of saponins to permeabilize the cellular membrane, we performed the calcein-AM assay [Debiton *et al.*, 2004]. In this test, the calcein-AM enters passively into the cells, is converted into a green fluorescent and retained within intact cells. After treatment with drugs, the fluorescence is proportional to the number of cells (A549, DLD-1 and WS1) with undamaged membranes. The results presented in Table 3 are expressed as the drug concentration that decreased calcein fluorescence by 50% (IC_{50}).

As for the haemolytic assay, triterpenoids (**1-4**) and lupane-type saponins (**5, 6, 8-22, 28-35**) did not permeabilize the membrane of A549, DLD-1 and WS1 human cell lines at maximum concentration tested ($IC_{50} >200 \mu M$). On the other hand, regarding the oleanane-type saponins, β -hederin (**25**) and hederacolchiside A₁ (**27**) were the most active as they strongly permeabilized the membrane of all human cell lines with IC_{50} ranging from 2.8 to 4 μM in function of the type of cells. This membrane activity was significantly higher ($P <0.05$) than other saponins in this group having hederagenin (**3**) as aglycone such as colchiside (**7**, $IC_{50} = 65-102 \mu M$), δ -hederin (**23**, $IC_{50} = 40-54 \mu M$), α -hederin (**24**, $IC_{50} = 24-38 \mu M$) and hederacolchiside A (**26**, $IC_{50} = 86-159 \mu M$). Moreover, there is a significant correlation ($P <0.05$) between the haemolytic activity and the membrane permeabilization potential of oleanane saponins (**7, 23-27**).

DISCUSSION

Saponins are well known to exhibit cytotoxic and haemolytic activities [Sparg *et al.*, 2004] which are strongly correlated with the nature of both the aglycone and sugar side chains [Takechi *et al.*, 1995; Oda *et al.*, 2000]. However, it was reported that these two properties are not linked since they can proceed by different mechanisms [Chwalek *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007]. Recent studies demonstrated that several naturally occurring antitumor saponins cause the death of cancer cells by induction of apoptosis via the mitochondrial pathway [Haridas *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2005]. On the other hand, the haemolysis of erythrocytes was shown to be a function of the capacity of saponins to interact with the membrane cholesterol of red blood cells [Bangham *et al.*, 1962]. However, Hu and co-workers reported that the liposomal membrane disrupting activity of oleanolic acid saponins glycosylated at both C-3 and C-28 positions (bidesmosides) can occur without the presence of cholesterol [Hu *et al.*, 1996].

The haemolytic activity of saponins is a serious drawback to the further pharmaceutical development of this type of natural product although some saponins show only weak [Oleszek *et al.*, 1992] or no haemolytic effect at all [Woldemichael *et al.*, 2002]. In this SAR study, our results showed that, contrary to the majority of saponins including those of the oleanane family, lupane-type saponins do not exhibit any haemolytic activity at the maximum concentration tested ($HD_{50} > 100 \mu M$) independently of the nature of the sugar moieties. In fact, there were no significant differences between the haemolytic activities of lupane-type monodesmosides (**5**, **6**, **8-16**), bidesmosides (**17-22**) and those containing an α -L-arabinopyranose moiety (**28-35**). Similar results were reported by Yoshizumi *et al.* for lupane-type saponins with a modified ring-A isolated from the leaves of *Acanthopanax sessiliflorus* which did not lead to any haemolysis [Yoshizumi *et al.*, 2006]. Betulinic acid saponins **21**, **30** and **32** are the sole exceptions since they exerted weak activity against red blood cells ($HD_{50} = 78-94 \mu M$). With regard to saponins **30** and **32**, the slight haemolytic activity could be correlated with the presence of an α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -

L-arabinopyranose moiety at the C-3 position of the triterpenoid skeleton. Indeed, this unique disaccharide chain is also present in oleanane-type saponins such as α -hederin (**24**) which have been shown to induce strong haemolysis of sheep erythrocytes [Chwalek *et al.*, 2006]. Yamashita and co-workers reported that betulin (**2**) and betulinic acid (**1**) triterpenoids do not exhibit any haemolytic effect even at a concentration of 500 μM [Yamashita *et al.*, 2002] as corroborated by our results ($\text{HD}_{50} > 100 \mu\text{M}$). These findings confirm the non-toxicity of lupane-type triterpenoids [Pisha *et al.*, 1995; Zuco *et al.*, 2002] and are of great interest for their clinical utilization as anticancer [Kessler *et al.*, 2007] or chemopreventive [Chaturvedi *et al.*, 2008] agents. Although they are virtually not haemolytic, betulin (**2**) and betulinic acid (**1**) have been reported to induce alterations of erythrocyte membrane shape towards echinocytes [Ziegler *et al.*, 2004], which seems to be related with their capacity to inhibit the growth of *Plasmodium falciparum* [Ziegler *et al.*, 2006]. The *in vitro* antiplasmodial activity was shown to be due to the incorporation of triterpenoids **1** and **2** into the lipid bilayer of erythrocytes [Ziegler *et al.*, 2004].

In this study, the natural oleanane-type saponins (**7**, **23-27**) were shown to exhibit strong haemolytic activity ($\text{IC}_{50} = 1.7\text{-}22 \mu\text{M}$) compared to lupane-type saponins and natural aglycones **3** and **4** ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$). On the whole, it appears to be a direct correlation ($P < 0.05$) between the capacity of oleanane saponins to cause the lysis of red blood cells and their membrane cell permeabilization property. Moreover, the order of cytotoxicity seems to be linked with both the membrane alteration and haemolytic activities of oleanane saponins ($P < 0.05$). It is noteworthy that β -hederin (**25**) and hederacolchiside A₁ (**27**) with oleanolic acid (**4**) as aglycone were significantly more haemolytic and cytotoxic than α -hederin (**24**) and hederacolchiside A (**26**) bearing, respectively, the same sugar moieties. These results are in good agreement with those of Bartheuf *et al.* who reported that oleanolic acid saponins exhibit higher cytotoxicity than hederagenin saponins [Bartheuf *et al.*, 2002]. Furthermore, it was pointed out that the structural requirements of potent antitumor oleanane-type saponins including α -hederin (**24**), hederacolchiside A (**26**)

and A₁ (**27**) isolated from the roots of *Pulsatilla chinensis* [Mimaki *et al.*, 1999] and *P. koreana* [Bang *et al.*, 2005a] are the presence of an α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -L-Arap moiety at the C-3 position and a free carboxylic acid at the C-28 position [Bang *et al.*, 2005b]. Recently, hederacolchiside A₁ (**27**) was reported to induce membrane injury resulting in the formation of pores and permeabilization of the membrane of human melanoma (MEL-5) cells, which could be related to its anticancer activity [Debiton *et al.*, 2004; Mazzucchelli *et al.*, 2008]. Moreover, another study highlighted the apoptosis inducing activity of saponin **27** [Gerkens *et al.*, 2007]. These results suggest that the anticancer activity of hederacolchiside A₁ (**27**) and its analogues could be due to the complementary action of both the alteration of cellular membranes and apoptosis induction. Nevertheless, as revealed by the results of the haemolytic assay, it is obvious that the high toxicity towards erythrocytes of these oleanane-type saponins (**7**, **23-27**) could hamper their utilization as pharmaceutical agents.

While lupane-type saponins tested in this study were almost non-haemolytic, their cytotoxic activity were in some cases superior to oleanane-type saponins and greatly varied according to the nature of the sugar moieties linked to C-3 and C-28 [Gauthier *et al.*, 2006; Thibeault *et al.*, 2007; Gauthier *et al.*, 2008b]. Indeed, concerning monodesmosidic saponins (group II), the presence of α -L-Araf, β -D-Glcp or β -D-Galp moieties at the C-3 position of the lupane skeleton seems to have a deleterious effect on the anticancer activity. In contrast, saponins bearing α -D-Arap, α -D-Manp or β -D-Xylp at the C-3 position exhibited a cytotoxicity profile similar or slightly inferior to the parent triterpenoids **1** and **2**. The addition of an α -L-Rhap at C-3 of betulinic acid (**1**) gave the most active monodesmosidic saponin (**10**) against human cancer cell lines (IC₅₀ = 2.6-3.9 μ M). With regard to lupane-type saponins of group V, it is worth noting that saponins (**30-32**, **35**) bearing an α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -L-Arap moiety at the C-3 position were not able to inhibit the growth of cancer cell lines at the maximum concentration tested. Thus, our results suggest that this unique sugar moiety, which has been previously identified as a basic sequence for the antitumor activity of oleanolic acid and hederagenin monodesmosides [Lee *et al.*, 2000; Park *et*

al., 2001; Bartheuf *et al.*, 2002; Bang *et al.*, 2005b] such as saponins **24-27**, does not improve the *in vitro* cytotoxicity of lupane-type saponins. Notably, betulinic acid saponin **28** bearing an α -L-Arap without the presence of an α -L-Rhap linked at C-2' exhibited a cytotoxicity profile slightly superior to **1** against colorectal adenocarcinoma cell lines. As shown for monodesmosides **8** and **9**, the presence of a β -D-Glcp moiety at the C-3 position of the lupane skeleton has a detrimental effect on the cytotoxicity of bidesmosidic saponins **17** and **18**. These results may be explained by the high polarity of the glucose moiety which could prevent the diffusion of the saponins into the cellular cytoplasm [Chwalek *et al.*, 2006]. In contrast, bidesmosidic saponins (**19-22**) containing α -L-Rhap moieties strongly inhibit the growth of cancer cell lines, the most active compound being betulin bis-3,28- α -L-rhamnopyranoside (**22**) ($IC_{50} = 1.3-1.9 \mu M$). It was postulated that the high anticancer activity of rhamnose containing saponins may be attributable to their interaction with lectins which could recognize rhamnose and facilitate the diffusion of the drug into the cytoplasm [Cham *et al.*, 1990; Gauthier *et al.*, 2008b].

In this SAR study, as for the haemolytic assay, all tested lupane-type saponins were unable to permeabilize the membrane of both human cancer (A549, DLD-1) and healthy (WS1) cell lines as determined by the calcein-AM assay ($IC_{50} > 200 \mu M$). Therefore, we can hypothesize that the strong cytotoxicity of lupane-type saponins such as glycosides **10** and **22** may be explained by another mechanism which should not involve cellular membrane injuries. The parent triterpenoid betulinic acid (**1**) has been shown to induce apoptosis of cancer cells [Pisha *et al.*, 1995] independently of the p53 gene status through the perturbation of mitochondrial membrane potential and production of reactive oxygen species [Fulda *et al.*, 1997]. These processes trigger the release of mitochondrial apoptogenic factors, activation of caspases and subsequent DNA fragmentation [Fulda *et al.*, 1998]. Thus, in a study in progress in our laboratory, we investigated the mechanism of action of lupane-type saponins. The preliminary results showed that, similarly to betulinic acid (**1**), saponins **10** and **22** could induce the death of A549 and DLD-1 cancer cell lines through the induction

of apoptosis as revealed by both the cleavage of apoptotic factors such as PARP and caspase 3 and the characteristic morphological changes in the cells (data not shown).

In conclusion, the haemolytic and cytotoxic activities as well as the membrane cell permeabilization property of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins have been investigated and structure-activity relationships have been established. While oleanane-type saponins such as β -hederin (**25**) and hederacolchiside A₁ (**27**) cause the death of cancer cell lines by permeabilizing the cellular membranes, lupane-type saponins seem to proceed according to another mechanism which could be related to an apoptosis induction. The overall results suggest that lupane-type saponins such as the highly potent glycosides **10** and **22** represent promising anticancer agents for further studies on tumor-bearing mice since they are devoid of toxicity associated with the haemolysis of red blood cells in comparison with oleanane-type saponins. Work is currently in progress in our laboratory in order to elucidate the exact mechanism of the anticancer action of lupane-type saponins and results will be reported in due course.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals

DMSO grade Biotech and Saponin from quillaja bark (20-35% sapogenin content), the positive control used for the haemolysis assay, were purchased from Sigma-Aldrich[®] Canada. Betulinic acid (**1**) was purchased from Indofine Chemical Company Inc. and stored at 4 °C.

Triterpenes and saponins

Betulin (**2**) was extracted from the outer bark of *Betula papyrifera* Marsh. and purified by silica gel flash chromatography [Gauthier *et al.*, 2006]. Lupane-type saponins (**5**, **6**, **8-22**, **28-35**) were synthesized according to procedures previously

reported by our laboratory [Gauthier *et al.*, 2006; Thibeault *et al.*, 2007; Gauthier *et al.*, 2008a; Gauthier *et al.*, 2008b]. Oleanolic acid (4) was kindly provided by Laboratoire de Pharmacognosie-Homéopathie de l'Université de la Méditerranée de Marseille (France). Hederagenin 3 β -O- β -D-glucopyranoside (7), δ -hederin (23) and α -hederin (24) were isolated from the berries of *Hedera colchica* and purified as described previously [Mshvildadze *et al.*, 2001]. Hederagenin (3) and β -hederin (25) were obtained by acid and alkaline hydrolysis from hederasaponins C and B, respectively, isolated from the leaves of *Hedera helix* [Elias *et al.*, 1991]. Hederacolchiside A (26) and hederacolchiside A₁ (27) were isolated from the leaves of *Hedera colchica* and purified according to literature [Mshvildadze *et al.*, 1992; Mshvildadze *et al.*, 1993]. The chemical structures (Tables 1 and 2) of all triterpenes and saponins used in this study were confirmed by spectral data (MS, ¹H and ¹³C NMR) and their purity was determined by HPLC (\geq 5%).

Haemolytic assay

Sheep erythrocytes (Laboratoire Quelab, Montréal, QC, Canada) were first centrifuged at 3000 RPM for 5 min and then suspended in PBS to obtain a 1% erythrocytes solution. Samples were dissolved in a mixture of 5:1 DMSO/PBS to obtain a concentration of 500 μ g/mL. Concentration gradient were prepared within a range of 500 μ g/mL to 3,9 μ g/mL. A 160 μ L volume of 1% erythrocyte solution was added to 96 wells microplates (Costar, Corning Inc.) and a volume of 40 μ L of sample or control solution was added to obtain a final erythrocyte concentration of 0.8% and sample concentration gradient ranging from 100 μ g/mL to 0.78 μ g/mL. Microplates were incubated at 37°C on an orbital shaker for 60 min. Microplates were then centrifuged at 3000 RPM for 5 min, after what the supernatant was transferred to empty microplates. Absorbance of the supernatant was measured at 540 nm with a Varioskan plate reader (Thermo, Waltham, MA, USA). Each experiment was carried out twice in triplicate. HD₅₀ was calculated by comparison with the 100% haemolysis caused by the highest Saponin (Sigma-Aldrich® Canada) concentration and were expressed as mean \pm standard deviation.

Cells culture

Human lung carcinoma (A549), human colorectal adenocarcinoma (DLD-1) and human normal skin fibroblasts (WS1) cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). All cell lines were cultured in minimum essential medium containing Earle's salts and L-glutamine (Mediatech Cellgro, VA), to which were added 10% foetal bovine serum (Hyclone), vitamins (1×), penicillin (100 IU/mL) and streptomycin (100 µg/mL), essential amino acids (1×), and sodium pyruvate (1×) (Mediatech Cellgro, VA). Cells were kept at 37 °C in a humidified environment containing 5% CO₂.

Cytotoxicity assay

Exponentially growing cells were plated in 96-well microplates (Costar, Corning Inc.) at a density of 5×10^3 cells per well in 100 µL of culture medium and were allowed to adhere for 16 h before treatment. Increasing concentrations of each compound in biotech DMSO (Sigma-Aldrich) and the cells were incubated for 48 h. The final concentration of DMSO in the culture medium was maintained at 0.5% (v/v) to avoid solvent toxicity. Cytotoxicity was assessed using resazurin [O'Brien, J. *et al.*, 2000] on an automated 96-well Fluoroskan Ascent F1™ plate reader (Labsystems) using excitation and emission wavelengths of 530 and 590 nm, respectively. Fluorescence was proportional to the cellular metabolic activity in each well. Survival percentage was defined as the fluorescence in experimental wells compared to that in control wells after subtraction of blank values. Each experiment was carried out thrice in triplicate. IC₅₀ results were expressed as means ± standard deviation.

Calcein-AM assay

Exponentially growing A549, DLD-1 and WS1 cells were plated in 96-well microplates (Costar, Corning Inc.) at a density of 10^4 cells per well in 100 µL of

DMEM and were allowed to adhere for 24 h before treatment. Microplates were then washed with PBS, and 16 μM calcein-AM was added in 100 μL of culture medium. Microplates were incubated 60 min at 37°C and 5% CO_2 for the calcein to be incorporated into cells. Unabsorbed calcein was then removed and microplates were washed with PBS. Growing concentrations of samples or controls were added in 100 μL of DMEM without FBS. Microplates were incubated 30 min after what wells were washed again with PBS. Fluorescence was read with a Fluoroskan Ascent F1™ plate reader (Labsystems) using excitation and emission wavelengths of 485 and 530 nm, respectively. Fluorescence was proportional to the cell membrane integrity. Each experiment was carried out twice in triplicate. IC_{50} results were expressed as means \pm standard deviation.

Statistical analysis

Calcein-AM assay IC_{50} , haemolytic test HD_{50} and cytotoxic assay IC_{50} were determined by polynomial regression of dose-response curve after blank subtraction. Significant difference between samples were determined by Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks followed by *post hoc* multiple comparisons with Student-Newman-Keuls method. Probabilities (P) inferior to 0.05 were considered significant. Correlation coefficients were determined by Pearson Product Moment Correlation.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Professor François-Xavier Garneau for reviewing this manuscript. The financial support of Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT, fonds forestiers 02) is gratefully acknowledged. Charles Gauthier thanks Programme d'Aide Institutionnel à la Recherche de l'Université du Québec à Chicoutimi (PAIR-UQAC), Fondation de l'UQAC, Association Francophone pour le Savoir (ACFAS) and FQRNT for graduate scholarships.

REFERENCES

- Bang, S.-C.; Kim, Y.; Lee, J.-H.; Ahn, B.-Z. Triterpenoid saponins from the roots of *Pulsatilla koreana*. *J. Nat. Prod.* **2005a**, *68*, 268-272.
- Bang, S.-C.; Lee, J.-H.; Song, G.-Y.; Kim, D.-H.; Yoon, M.-Y.; Ahn, B.-Z. Antitumor activity of *Pulsatilla koreana* saponins and their structure-activity relationship. *Chem. Pharm. Bull.* **2005b**, *53*, 1451-1454.
- Bangham, A. D.; Horne, R. W. Action of saponin on biological cell membranes. *Nature* **1962**, *196*, 952-953.
- Barthomeuf, C.; Debiton, E.; Mshvildadze, V.; Kemertelidze, E.; Balansard, G. *In vitro* activity of hederacolchisid A₁ compared with other saponins from *Hedera colchica* against proliferation of human carcinoma and melanoma cells. *Planta Med.* **2002**, *68*, 672-675.
- Baumann, E.; Stoya, G.; Völkner, A.; Richter, W.; Lemke, C.; Linss, W. Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure. *Acta Histochem.* **2000**, *102*, 21-35.
- Cham, B. E.; Daunter, B. Solasodine glycosides. Selective cytotoxicity for cancer cells and inhibition of cytotoxicity by rhamnose in mice with sarcoma 180. *Cancer Lett.* **1990**, *55*, 221-225.
- Chaturvedi, P. K.; Bhui, K.; Shukla, Y. Lupeol: Connotations for chemoprevention. *Cancer Lett.* **2008**, *263*, 1-13.
- Chwalek, M.; Lalun, N.; Bobichon, H.; Plé, K.; Voutquenne-Nazabadioko, L. Structure-activity relationships of some hederagenin diglycosides: Haemolysis, cytotoxicity and apoptosis induction. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1760*, 1418-1427.

- Debiton, E.; Borel, M.; Communal, Y.; Mshvildadze, V.; Barthomeuf, C. In addition to membrane injury, an affinity for melanin might be involved in the high sensitivity of human melanoma cells to hederacolchiside A1. *Melanoma Res.* **2004**, *14*, 97-105.
- Elias, R.; Diaz Lanza, A. M.; Vidal-Ollivier, E.; Balansard, G. Triterpenoids saponins from the leaves of *Hedera helix*. *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 98-103.
- Fulda, S.; Friesen, C.; Los, M.; Scaffidi, C.; Mier, W.; Benedict, M.; Nunez, G.; Krammer, P. H.; Peter, M. E.; Debatin, K.-M. Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 4956-4964.
- Fulda, S.; Scaffidi, C.; Susin, S. A.; Krammer, P. H.; Kroemer, G.; Peter, M. E.; Debatin, K.-M. Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid. *J. Biol. Chem.* **1998**, *51*, 33942-33948.
- Gauthier, C.; Legault, J.; Lebrun, M.; Dufour, P.; Pichette, A. Glycosidation of lupane-type triterpenoids as potent in vitro cytotoxic agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6713-6725.
- Gauthier, C.; Legault, J.; Lavoie, S.; Rondeau, S.; Tremblay, S.; Pichette, A. Synthesis of two natural betulinic acid saponins containing α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranose and their analogues. *Tetrahedron* **2008a**, *64*, 7386-7399.
- Gauthier, C.; Legault, J.; Lavoie, S.; Rondeau, S.; Tremblay, S.; Pichette, A. Synthesis and cytotoxicity of bidesmosidic betulin and betulinic acid saponins. Accepted to *J. Nat. Prod.* **2008b** #np-2008-00579x.

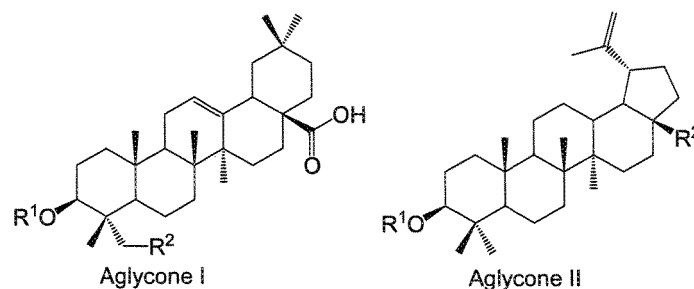
- Gerkens, P. C.; Dobson, R.; Tabatadze, N.; Mshvildadze, V.; Elias, R.; Peulen, O. J.; Jolois, O. M.; De Pauw-Gillet, M.-C. A. Apoptosis and cytolysis induced by giganteosides and hederacolchisides in HL-60 cells. *Anticancer Res.* **2007**, *27*, 2529-2534.
- Haridas, V.; Higuchi, M.; Jayatilake, G. S.; Bailey, D.; Mujoo, K.; Blake, M. E.; Arntzen, C. J.; Gutterman, J. U. Avicins: Triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth) induce apoptosis by mitochondrial perturbation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 5821-5826.
- Hu, M.; Konoki, K.; Tachibana, K. Cholesterol-independent membrane disruption caused by triterpenoid saponins. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1299*, 252-258.
- Kessler, J. H.; Mullauer, F. B.; de Roo, G. M.; Medema, J. P. Broad in vitro efficacy of plant-derived betulinic acid against cell lines derived from the most prevalent human cancer types. *Cancer Lett.* **2007**, *25*, 132-145.
- Lee, K.-T.; Sohn, I.-C.; Park, H.-J.; Kim, D.-W.; Jung, G.-O.; Park, K.-Y. Essential moiety for antimutagenic and cytotoxic activity of hederagenin monodesmosides and bisdesmosides isolated from the stem bark of *Kalopanax pictus*. *Planta Med.* **2000**, *66*, 329-332.
- Lee, M.-S.; Yuet-Wa, J. C.; Kong, S.-K.; Yu, B.; Eng-Choon, V. O.; Nai-Ching, H. W.; Chung-Wai, T. M.; Fung, K.-P. Effects of polyphyllin D, a steroidal saponin in *Paris polyphylla*, in growth inhibition of human breast cancer cells and in xenograft. *Cancer Biol. Ther.* **2005**, *4*, 1248-1254.
- Liu, J.; Henkel, T. Traditional Chinese medicine (TCM): Are polyphenols and saponins the key ingredients triggering biological activities? *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 1483-1485.

- Mazzucchelli, G. D.; Cellier, N. A.; Mshvildadze, V.; Elias, R.; Shim, Y.-H.; Touboul, D.; Quinton, L.; Brunelle, A.; Lapr evote, O.; De Pauw, E. A.; De Pauw-Gillet, M.-C. A. Pores formation on cell membranes by hederacolchiside A1 leads to a rapid release of proteins for cytosolic subproteome analysis. *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 1683-1692.
- Melzig, M. F.; Bader, G.; Loose, R. Investigations of the mechanism of membrane activity of selected triterpenoid saponins. *Planta Med.* **2001**, *67*, 43-48.
- Mimaki, Y.; Kuroda, M.; Asano, T.; Sashida, Y. Triterpene saponins and lignans from the roots of *Pulsatilla chinensis* and their cytotoxic activity against HL-60 cells. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1279-1283.
- Mshvildadze, V. D.; Dekanosidze, G. E.; Kemertelidze, E. P. Minor glycosides of *Hedera colchica*. *Chem. Nat. Compd.* **1992**, *5*, 588-589.
- Mshvildadze, V. D.; Dekanosidze, G. E.; Shashkov, A. S.; Kemertelidze, E. P. Minor glycosides from *Hedera colchica*. Structure of hederacolchisides A1 and C. *Bioorg. Khim.* **1993**, *62*, 1001-1007.
- Mshvildadze, V.; Elias, R.; Faure, R.; Debrauwer, L.; Dekanosidze, G.; Kemertelidze, E.; Balansard, G. Triterpenoid saponins from berries of *Hedera colchica*. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 752-754.
- Muthu Kumara, S. S.; Huat, B. T. K. Extraction, isolation and characterisation of antitumor principle, α -hederin, from the seeds of *Nigella sativa*. *Planta Med.* **2001**, *67*, 29-32.
- O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5421-5426.

- Oda, K.; Matsuda, H.; Murakami, T.; Katayama, S.; Ohgitani, T.; Yoshikawa, M. Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. *Biol. Chem.* **2000**, *381*, 67-74.
- Oleszek, W.; Jurzysta, M.; Ploszynski, M.; Colquhoun, I. J.; Price, K. R.; Fenwick, G. R. Zanic acid tridesmoside and other dominant saponins from Alfalfa (*Medicago sativa* L.) aerial parts. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 191-196.
- Park, H.-J.; Kwon, S.-H.; Lee, J.-H.; Lee, K.-H.; Miyamoto, K.-I.; Lee, K.-T. Kalopanaxsaponin A is a basic saponin structure for the anti-tumor activity of hederagenin monodesmosides. *Planta Med.* **2001**, *67*, 118-121.
- Pisha, E.; Chai, H.; Lee, I.-S.; Chagwedera, T. E.; Farnsworth, N. R.; Cordell, G. A.; Beecher, C. W. W.; Fong, H. H. S.; Kinghorn, A. D.; Brown, D. M.; Wani, M. C.; Wall, M. E.; Hieken, T. J.; Das Gupta, T. K.; Pezzuto, J. M. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat. Med.* **1995**, *1*, 1046-1051.
- Rooney, S.; Ryan, M. F. Effects of alpha-hederin and thymoquinone, constituents of *Nigella sativa*, on human cancer cell lines. *Anticancer Res.* **2005**, *25*, 2199-2204.
- Seeman, P.; Cheng, D.; Iles, G. H. Structure of membrane holes in osmotic and saponin hemolysis. *J. Cell. Biol.* **1973**, *56*, 519-527.
- Sparg, S. G.; Light, M. E.; van Staden, J. Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharm.* **2004**, *94*, 219-243.
- Sun, H.; Zheng, Q. Haemolytic activities and adjuvant effect of *Gynostemma pentaphyllum* saponins on the immune responses to ovalbumin in mice. *Phytother. Res.* **2005**, *19*, 895-900.

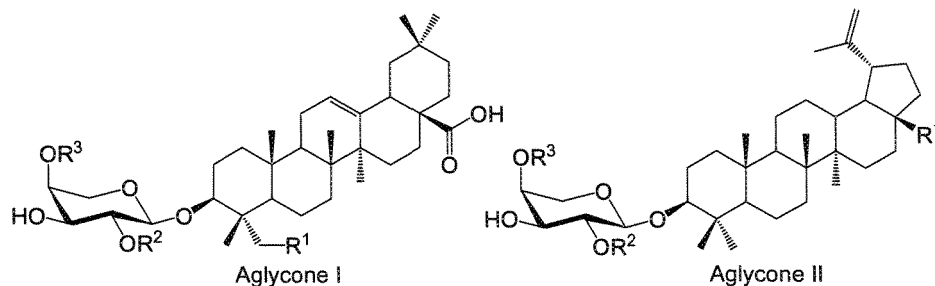
- Sun, H.-X. Haemolytic activities and adjuvant effect of *Bupleurum chinense* saponins on the immune responses to ovalbumin in mice. *Vaccine* **2006**, *24*, 1324-1331.
- Takechi, M.; Tanaka, Y. Haemolytic time course differences between steroid and triterpenoid saponins. *Planta Med.* **1995**, *61*, 76-77.
- Thibeault, D.; Gauthier, C.; Legault, J.; Bouchard, J.; Dufour, P.; Pichette, A. Synthesis and structure-activity relationship study of cytotoxic germanicane- and lupane-type 3 β -*O*-monodesmosidic saponins starting from betulin. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6144-6157.
- Vincken, J.-P.; Heng, L.; de Groot, A.; Gruppen, H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 275-297.
- Voutquenne, L.; Lavaud, C.; Massiot, G.; Le Men-Olivier, L. Structure-activity relationships of haemolytic saponins. *Pharm. Biol.* **2002**, *40*, 253-262.
- Wang, Y.; Zhang, Y.; Zhu, Z.; Zhu, S. ; Li, Y. ; Li, M.; Yu, B. Exploration of the correlation between the structure, hemolytic activity, and cytotoxicity of steroid saponins. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2528-2532.
- Winter, W. P. Mechanism of saponin induced red cell hemolysis: Evidence for the involvement of aquaporin CHIP28. *Blood* **1994**, *84*, suppl. 1 to 10, abstr. 445.
- Woldemichael, G. M.; Wink, M. Triterpene glycosides of *Lupinus angustifolius*. *Phytochemistry* **2002**, *60*, 323-327.
- Yamashita, K.; Lu, H.; Lu, J.; Chen, G. ; Yokoyama, T.; Sagara, Y. ; Manabe, M. ; Kodama, H. Effect of three triterpenoids, lupeol, betulin, and betulinic acid on the stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation of protetins in human neutrophils. *Clinica Chimica Acta* **2002**, *325*, 91-96.

- Yoshizumi, K.; Hirano, K.; Ando, H.; Hirai, Y.; Ida, Y.; Tsuji, T.; Tanaka, T.; Satouchi, K.; Terao, J. Lupane-type saponins from leaves of *Acanthopanax sessiliflorus* and their inhibitory activity on pancreatic lipase. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 335-341.
- Yu, B.; Zhang, Y.; Tang, P. Carbohydrate chemistry in the total synthesis of saponins. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 5145-5161.
- Zhu, J.; Xiong, L.; Yu, B.; Wu, J. Apoptosis induced by a new member of saponin family is mediated through caspase-8-dependent cleavage of Bcl-2. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *68*, 1831-1838.
- Ziegler, H. L.; Franzyk, H.; Sairafianpour, M.; Tabatabai, M.; Tehrani, M. D.; Bagherzadeh, K.; Hägerstrand, H.; Staerk, D.; Jaroszewski, J. W. Erythrocyte membrane modifying agents and the inhibition of *Plasmodium falciparum* growth: structure-activity relationships for betulinic acid analogues. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 119-127.
- Ziegler, H. L.; Staalsø, T.; Jaroszewski, J. W. Loading of erythrocyte membrane with pentacyclic triterpenes inhibits *Plasmodium falciparum* invasion. *Planta Med.* **2006**, *72*, 640-642.
- Zuco, V.; Supino, R.; Righetti, S. C.; Cleris, L.; Marchesi, E.; Gambacorti-Passerini, C.; Formelli, F. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Lett.* **2002**, *175*, 17-25.

Table 1. Chemical structures of triterpenes 1-4 and saponins 5-22.

Compound	Aglycone	R ¹	R ²	Reference
1* (betulinic acid)	II	H	COOH	Thibeault <i>et al.</i> , 2006
2* (betulin)	II	H	CH ₂ OH	Gauthier <i>et al.</i> , 2006
3* (hederagenin)	I	H	OH	Elias <i>et al.</i> , 1991
4* (oleanolic acid)	I	H	H	-
5	II	α -L-Araf	COOH	Gauthier <i>et al.</i> , 2008a
6	II	α -L-Araf	CH ₂ OH	Gauthier <i>et al.</i> , 2008a
7*	I	β -D-Glcp	OH	Mshvildadze <i>et al.</i> , 2001
8	II	β -D-Glcp	COOH	Gauthier <i>et al.</i> , 2006
9	II	β -D-Glcp	CH ₂ OH	Gauthier <i>et al.</i> , 2006
10*	II	α -L-Rhap	COOH	Gauthier <i>et al.</i> , 2006
11	II	α -D-Arap	COOH	Gauthier <i>et al.</i> , 2006
12	II	β -D-Galp	COOH	Thibeault <i>et al.</i> , 2007
13	II	α -D-Manp	COOH	Thibeault <i>et al.</i> , 2007
14	II	α -D-Manp	CH ₂ OH	Thibeault <i>et al.</i> , 2007
15	II	β -D-Xylp	COOH	Thibeault <i>et al.</i> , 2007
16	II	H	COO- β -D-Glcp	Gauthier <i>et al.</i> , 2006
17	II	β -D-Glcp	COO- β -D-Glcp	Gauthier <i>et al.</i> , 2008b
18	II	β -D-Glcp	CH ₂ O- β -D-Glcp	Gauthier <i>et al.</i> , 2008b
19	II	α -L-Rhap	COO- β -D-Glcp	Gauthier <i>et al.</i> , 2008b
20	II	α -L-Rhap	CH ₂ O- β -D-Glcp	Gauthier <i>et al.</i> , 2008b
21	II	α -L-Rhap	COO- α -L-Rhap	Gauthier <i>et al.</i> , 2008b
22	II	α -L-Rhap	CH ₂ O- α -L-Rhap	Gauthier <i>et al.</i> , 2008b

* Natural compounds.

Table 2. Chemical structures of saponins **23-35** containing α -L-arabinopyranose.

Compound	Agl.	R ¹	R ²	R ³	Reference
23* (δ -hederin)	I	OH	H	H	Mshvildadze <i>et al.</i> , 2001
24* (α -hederin)	I	OH	α -L-Rhap	H	Mshvildadze <i>et al.</i> , 2001
25* (β -hederin)	I	H	α -L-Rhap	H	Elias <i>et al.</i> , 1991
26* (hederacolchiside A)	I	OH	α -L-Rhap	β -D-Glcp	Mshvildadze <i>et al.</i> , 1992
27* (hederacolchiside A ₁)	I	H	α -L-Rhap	β -D-Glcp	Mshvildadze <i>et al.</i> , 1993
28	II	COOH	H	H	Gauthier <i>et al.</i> , 2008a
29	II	CH ₂ OH	H	H	Gauthier <i>et al.</i> , 2008a
30	II	COOH	α -L-Rhap	H	Gauthier <i>et al.</i> , 2008a
31	II	CH ₂ OH	α -L-Rhap	H	Gauthier <i>et al.</i> , 2008a
32*	II	COOH	α -L-Rhap	β -D-Glcp	Gauthier <i>et al.</i> , 2008a
33*	II	COO- β -D-Glcp	H	H	Gauthier <i>et al.</i> , 2008b
34	II	CH ₂ O- β -D-Glcp	H	H	Gauthier <i>et al.</i> , 2008b
35*	II	COO- β -D-Glcp	α -L-Rhap	H	Gauthier <i>et al.</i> , 2008a

* Natural compounds.

Table 3. Results of the cytotoxicity (resazurin reduction test) and membrane cell permeabilization (calcein-AM assay) of compounds **1-35**. Values in italics were previously reported by our laboratory (see references in Table 1 and 2).

group ^a	cpd	IC ₅₀ (μmol•L ⁻¹)					
		cytotoxicity			Membrane permeabilization		
		A549	DLD-1	WS1	A549	DLD-1	WS1
I	1	<i>10.3 ± 0.4</i>	<i>15.0 ± 0.3</i>	<i>12 ± 1</i>	>200	>200	>200
	2	<i>3.8 ± 0.1</i>	<i>6.6 ± 0.3</i>	<i>3.6 ± 0.1</i>	>200	>200	>200
	3	39 ± 6	>100	77 ± 3	>200	>200	>200
	4	27 ± 3	>100	>100	>200	>200	>200
II	5	>100	>100	>100	>200	>200	>200
	6	>100	>100	>100	>200	>200	>200
	8	>100	32 ± 9	>100	>200	>200	>200
	9	>100	>100	>100	>200	>200	>200
	10	<i>2.6 ± 0.6</i>	<i>3.9 ± 0.4</i>	<i>31 ± 3</i>	>200	>200	>200
	11	<i>10 ± 2</i>	<i>17 ± 3</i>	<i>47 ± 5</i>	>200	>200	>200
	12	>100	>100	>100	>200	>200	>200
	13	<i>34 ± 4</i>	<i>15 ± 1</i>	<i>13 ± 3</i>	>200	>200	>200
	14	<i>7.3 ± 0.4</i>	<i>10.1 ± 0.5</i>	<i>5.1 ± 0.6</i>	>200	>200	>200
	15	<i>15 ± 2</i>	<i>18 ± 2</i>	<i>20 ± 1</i>	>200	>200	>200
	16	>100	>100	>100	>200	>200	>200
	III	17	>100	>100	35 ± 3	>200	>200
18		>100	27 ± 2	20 ± 2	>200	>200	>200
19		<i>23 ± 1</i>	<i>11.0 ± 0.5</i>	9 ± 1	>200	>200	>200
20		<i>16.8 ± 0.9</i>	<i>10.6 ± 0.9</i>	5.3 ± 0.4	>200	>200	>200
21		<i>7.2 ± 0.5</i>	<i>7.3 ± 0.3</i>	4.9 ± 0.7	>200	>200	>200
22		<i>1.9 ± 0.1</i>	<i>1.9 ± 0.1</i>	1.3 ± 0.1	>200	>200	>200
IV	7	59 ± 12	59 ± 8	32 ± 4	65 ± 8	89 ± 16	102 ± 17
	23	58 ± 2	57 ± 15	30 ± 2	40 ± 8	54 ± 10	51 ± 12
	24	33 ± 4	60 ± 17	30 ± 6	28 ± 6	38 ± 11	24 ± 5
	25	15 ± 2	30 ± 6	14 ± 2	3 ± 1	4 ± 1	2.8 ± 0.9
	26	59 ± 16	62 ± 17	58 ± 7	110 ± 12	159 ± 4	86 ± 28
	27	15 ± 4	16 ± 7	5.7 ± 0.7	4 ± 1	4 ± 1	3 ± 1
V	28	12 ± 3	11 ± 2	19 ± 1	>200	>200	>200
	29	>100	>100	>100	>200	>200	>200
	30	>100	>100	>100	>200	>200	>200
	31	>100	>100	>100	>200	>200	>200
	32	>50	>50	>50	>200	>200	>200
	33	<i>76 ± 4</i>	<i>60 ± 5</i>	<i>50 ± 7</i>	>200	>200	>200
	34	>100	<i>19 ± 2</i>	<i>4.5 ± 0.3</i>	>200	>200	>200
	35	>50	>50	>50	>200	>200	>200

^a I : Triterpenoids; II : lupane monodesmosides; III : lupane bidesmosides; IV : oleanane saponins; V : lupane saponins containing α-L-arabinopyranose.

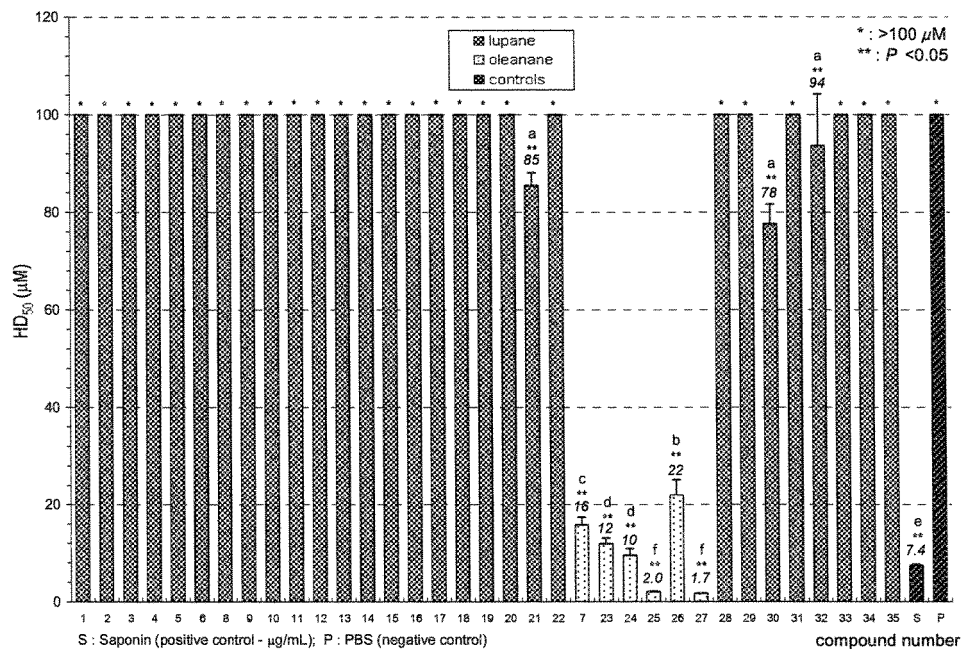


Figure 1. Haemolytic activity of triterpenes 1-4 and saponins 5-35. Data represent mean values \pm standard deviation of at least two independent experiments made in triplicate. HD₅₀ inferior to 100 μ M were compared using Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks followed by Student-Newman-Keuls multiple comparisons. Significant difference ($P < 0.05$) are represented by different letters over the columns.

CHAPITRE 6

SYNTHESIS, CYTOTOXICITY, AND HAEMOLYTIC ACTIVITY OF CHACOTRIOSIDE LUPANE-TYPE NEOSAPONINS AND THEIR GERMANICANE-TYPE REARRANGEMENT PRODUCTS

**Charles Gauthier, Jean Legault, Marianne Piochon, Samuel Tremblay, and
André Pichette[§]**

*Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales, Département des
Sciences Fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, 555 boul. de
l'Université, Chicoutimi, (Québec), Canada, G7H 2B1*

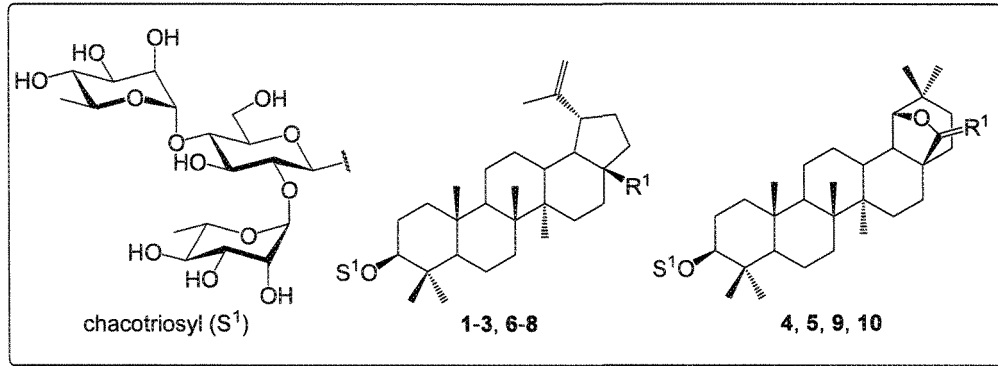
(Article à soumettre à *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*)

Keywords: Saponins; chacotrioside; lupane; germanicane; cytotoxicity; haemolytic activity.

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

CONTRIBUTION DES AUTEURS

L'auteur principal de cet article (C. Gauthier) a rédigé toutes les sections du manuscrit en plus d'effectuer la synthèse, la purification et la caractérisation de tous les nouveaux composés. M. Piochon et S. Tremblay ont participé, en partie, à la synthèse organique et à la purification des composés. J. Legault et A. Pichette sont, respectivement, les co-directeur et directeur du présent projet de thèse.

RÉSUMÉ GRAPHIQUE

RÉSUMÉ

Dans ce manuscrit, la synthèse selon une approche par glycosylations successives de saponines de lupéol, bétulinol et acide bétulinique porteuses d'une section chacotrioside à la position C-3 est décrite. Toutes les saponines ainsi que leurs produits de réarrangements de type germanicane ont été évalués pour leurs activités anticancéreuse et hémolytique. Dans l'ensemble, les résultats biologiques ont montré que l'ajout d'une section chacotrioside a un impact négatif sur l'activité anticancéreuse des saponines de type lupane. En revanche, bien qu'ils ne soient pas sélectifs, les dérivés de réarrangement 3β -O-chacotriosides d'allobétulinol (**9**) et de 28-oxoallobétulinol (**10**) ont exercé un profil de cytotoxicité jusqu'à quatre fois supérieur à l'acide bétulinique contre les lignées cellulaires cancéreuses du sein (MCF7) et de la prostate (PC-3) ($IC_{50} = 10-18 \mu M$). Il est intéressant de noter que seuls les chacotriosides contenant une fonction non-polaire en position 28 (**6**, **9** et **10**) ont exercé une activité hémolytique sur les globules rouges.

ABSTRACT

The concise synthesis, via a stepwise glycosylation approach, of lupeol, betulin and betulinic acid *O*-glycosides bearing a chacotriosyl moiety at the C-3 position is described. All neosaponins as well as their rearrangement products of the germanicane-type were evaluated *in vitro* for their anticancer and haemolytic activities. Although betulinic acid and betulin 3 β -*O*-chacotriosides were neither cytotoxic nor haemolytic, their rearrangement products allobetulin and 28-oxoallobetulin 3 β -*O*-chacotriosides (**9** and **10**) exhibited a cytotoxicity profile up to four-fold superior to betulinic acid against human breast (MCF7) and prostate (PC-3) adenocarcinomas cell lines (IC₅₀ = 10-18 μ M). However, these saponins were as cytotoxic on healthy cells (WS1) than on cancer cells. It is worth noting that only chacotriosides featuring non-polar functions at the C-28 position (**6**, **9** and **10**) exerted a haemolytic activity against red blood cells.

INTRODUCTION

The naturally occurring lupane-type triterpenoids lupeol (**1**), betulin (**2**) and betulinic acid (**3**) have been thoroughly investigated during the past years on account of their promising medicinal properties,¹⁻⁵ and particularly their chemopreventive⁶ and antitumor^{7,8} activities. Therefore, several studies have been undertaken, which focused generally on the preparation of anticancer derivatives of triterpenoids **2** and **3** modified at C-3 and/or C-28 positions.^{1,8-11} Recently, with the aim of increasing the water solubility of these non polar cholesterol-like triterpenoids and studying their structure-activity relationships, we synthesized a broad library of mono- and bidesmosidic lupane-type saponins,¹²⁻¹⁵ which have been evaluated for their cytotoxicity against the growth of human cancer cells. Our results revealed that the addition of rhamnose moieties at both C-3 and C-28 positions of triterpenoids **2** and **3** can give anticancer agents many fold stronger than betulinic acid (**3**).¹⁵ Furthermore, we showed that contrary to the majority of naturally occurring saponins,^{16,17} most of the lupane-type glycosides do not exhibit any haemolytic activity ($HD_{50} > 100 \mu M$) against red blood cells,¹⁸ which is of great interest regarding their clinical utilization as anticancer agents when intravenously delivered.

Saponins bearing a 2,4-branched trisaccharide containing rhamnose moieties such as chacotriosides are quite attractive concerning their anticancer activity. Indeed, dioscin, namely diosgenyl α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]- β -D-glucopyranoside, a well-known saponin isolated from several plant species used in traditional oriental medicine, have been shown to induce apoptosis within cancerous cells^{19,20} and to exhibit promising antitumor activities.²¹⁻²³ Moreover, the apoptosis inducing activity of solamargine, a solasodine steroidal alkaloid bearing the same chacotriosyl moiety, seems to be correlated with the presence of rhamnose moieties.^{24,25} Therefore, we thought that it will be of interest to prepare lupane-type saponins incorporating this particular 2,4-branched trisaccharide. Hence, as shown in Figure 1, we report here the synthesis of lupeol, betulin and betulinic acid monodesmosidic saponins (**6-8**) bearing a chacotriosyl moiety at the C-3 position as well as their germanicane-type rearrangement products (**9** and **10**). The

in vitro cytotoxic and haemolytic activities of all synthesized saponins are also reported.

RESULTS AND DISCUSSION

In this work, we chose to adopt a stepwise glycosylation strategy rather than a convergent one, in order to obtain exclusively a 1,2-*trans*-glycosidic linkage.²⁶ Thus, as depicted in Scheme 1, the synthesis began by coupling the lupane-type acceptors lupeol (**1**),¹² 28-*tert*-butyldiphenylsilyl betulin (**11**)¹⁴ or allyl betulinate (**12**)¹³ with the donor 2,3,4,6-tetra-*O*-benzoyl- α -D-glucopyranosyl trichloroacetimidate (**13**, 1.5 equiv)¹² under the promotion of the Lewis acid trimethylsilyl trifluoromethanesulfonate (TMSOTf, 0.1 equiv). After the glycosylation, removal of the benzoyl groups under standard deprotection conditions (NaOH 0.5 N, MeOH/THF/H₂O 1:2:1, room temperature) afforded target β -D-glucosides **14**¹² (90%), **15** (72%) and **16** (80%) in good to excellent yields after two steps. Then, the regioselective pivaloylation²⁷ at both C-6' and C-3' positions of the glucosides **14-16** using pivaloyl chloride (PivCl) in pyridine (Py) furnished, as expected, the protected derivatives **17-19** in moderate yields (60-62%). The Schmidt's inverse procedure²⁸ was chosen in order to synthesize the chacotrioside moiety. This approach was shown to give better yields than the normal procedure when two hydroxyl groups are simultaneously glycosylated.²⁹ Thus, coupling of the acceptor **17** with the donor 2,3,4-tri-*O*-benzoyl- α -L-rhamnopyranosyl trichloroacetimidate (**20**, 5.0 equiv) using TMSOTf (0.5 equiv) at -10 °C to room temperature followed by removal of benzoyl and pivaloyl groups led to the formation of the target chacotrioside lupeol saponin **6** in a moderated yield (57%, two steps). Surprisingly, under the same glycosylation conditions, the germanicane-type rearrangement products allobetulin and 28-oxoallobetulin 3 β -*O*-chacotriosides (**9** and **10**) were obtained in 32% and 24% yields, respectively, instead of the expected C-28 protected betulin and betulinic acid 3 β -*O*-chacotriosides. This result may be explained by the fact that triterpenes **2** and **3** can undergo a Wagner-Meerwein rearrangement in the presence of an excess of Lewis acids.^{13,30,31} Therefore, in light of these results, we performed, in a separate

experiment, the glycosylation of the acceptor **16** with the donor **20** using a smaller amount of TMSOTf (<0.2 equiv) in the reaction medium. As shown in Scheme 2, under these conditions, the fully protected chacotrioside derivative **21** was prepared in an excellent yield (96%) without any detectable trace of rearrangement products. The target chacotrioside betulinic acid saponin **8** (78%, two steps) was finally obtained after the hydrolysis of benzoyl and pivaloyl groups (NaOH 0.5 N, MeOH/THF/H₂O 1:1:1, 50 °C) followed by the subsequent deallylation at the C-28 position.

For some unclear reasons, all attempts to prepare the chacotrioside betulin saponin **7** from the glucosidic derivative **18** under various glycosylation conditions were unsuccessful (data not shown). Moreover, we tried to prepare the target neosaponin **7** by the reduction of the carboxylic acid function of **8** using aluminium lithium hydride (LiAlH₄) in refluxing THF.³² Unfortunately, the reaction resulted in a complex mixture of inseparable products. We next reasoned that using another less hindered protecting group than TBDPS at the C-28 position of betulin (**2**) such as a pivalate ester (Piv) should allow us to obtain better results. Thus, as depicted in Scheme 3, 28-*O*-pivaloyl betulin (**22**), which was synthesized in good yield (76%) by treatment of betulin (**2**) with PivCl in pyridine, was glycosylated at the C-3 position to afford **23** (68%, two steps) after deprotection of the benzoyl groups. Regioselective pivaloylation of **23** led to the formation of **24** (60%), which was then simultaneously glycosylated at both C-2' and C-4' positions with the TCA sugar donor **13** via the Schmidt's inverse procedure to provide the fully protected chacotriosidic derivative. Unexpectedly, deprotection of benzoyl and pivaloyl groups of the crude product using NaOH 0.5 N at 50 °C afforded 28-*O*-pivaloyl betulin 3 β -chacotrioside (**25**) instead of **7**. Thus, in order to cleave this sterically hindered primary pivalate ester, compound **25** was subjected to a basic hydrolysis with a higher concentration of NaOH (1.5 N) at reflux for a longer period of time (48 h). Under these conditions, the target chacotrioside saponin **7** was finally obtained in an excellent yield (88%) as a pure and homogeneous form. It is worth noting that, as revealed by the coupling constant values of the anomeric protons, 1,2-*trans*-

glycosidic linkages (α -L-Rhap and β -D-Glcp) were obtained for all newly synthesized neosaponins (**6-10**).³³

The cytotoxicity of the synthesized neosaponins (**6-10**) was evaluated *in vitro* by the resazurin reduction test³⁴ against lung carcinoma (A549), colorectal adenocarcinoma (DLD-1), breast adenocarcinoma (MCF7), prostate adenocarcinoma (PC-3) and normal skin fibroblasts (WS1) human cell lines. Betulinic acid (**3**) was used as a positive control.³⁵ Cytotoxicity results presented in Table 1 are expressed as the concentration inhibiting 50% of the cell growth (IC_{50}). Also, haemolytic activity of neosaponins **6-10** was assessed *in vitro* on sheep red blood cells (erythrocytes). As shown in Table 1, the values are expressed as the concentration inducing 50% haemolysis of erythrocytes (HD_{50}). PBS buffer at pH 7.4 was used as negative control and Sigma-Aldrich® Saponin mixture from quillaja bark (20-35% sapogenin) was used as positive control.

Firstly, the cytotoxic results indicate that the chacotrioside moiety has a negative impact on the anticancer activity of lupane-type triterpenoids ($IC_{50} > 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). These results are in good agreement with our previous investigations in which lupane-type saponins bearing highly polar sugar moieties at the C-3 position such as β -D-glucose^{12,15} or α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranose¹⁸ were not or only weakly cytotoxic against human cancer cell lines. On the other hand, it is worth noting that allobetulin and 28-oxoallobetulin chacotriosides (**9** and **10**) exhibited a cytotoxicity profile similar and even stronger than betulinic acid (**3**) with IC_{50} values ranging from 3.8 to $18 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Indeed, neosaponins **9** and **10** were about four-fold more active than betulinic acid (**3**) to inhibit the growth of human prostate adenocarcinoma cell lines ($IC_{50} = 10 \pm 1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). To our knowledge, it is the first time that such an increase in the anticancer activity of germanicane-type triterpenoids **4** and **5** was reported in the literature.¹³ Thus, the results suggest that the beneficial cytotoxic effect of the chacotrioside moiety is highly dependent of the nature of the aglycone.

Interestingly, it appears in this study that the chacotriose moiety increases the haemolytic activity of the less polar triterpenoids, i.e. lupeol (1), allobetulin (4) and 28-oxoallobetulin (5), but not for betulin (2) and betulinic acid (3).¹⁸ Moreover, the presence of a supplementary carbonyl group (lactone function) on neosaponin 10 increases the haemolytic activity up to ten-fold in comparison with neosaponin 9. Noteworthy, allobetulin chacotrioside (9) is a quite interesting compound for further *in vivo* studies since it is weakly haemolytic ($HD_{50} = 90 \pm 9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and exhibits a good cytotoxicity profile against cell lines derived from the most prevalent human cancer types. However, this saponin was as cytotoxic against healthy cells (WS1) than on cancer cells.

In summary, a series of five saponins of the lupane- and germanicane-type bearing a chacotrioside moiety at the C-3 position were synthesized via a stepwise glycosylation strategy and evaluated for both their cytotoxic and haemolytic activities. Although the lupane-type chacotriosides did not show any cytotoxic activity, allobetulin and 28-oxoallobetulin chacotriosides (9 and 10), which are the rearrangement products of triterpenoids 2 and 3 respectively, exhibited an anticancer activity profile similar and even stronger than betulinic acid (3) against human cancer cell lines. On the whole, the results suggest that the cytotoxic and haemolytic activities of saponins containing a chacotrioside moiety at the C-3 position are correlated with the nature of the aglycone.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Simon Rondeau for his contribution in organic synthesis, Karl Girard-Lalancette and Catherine Dussault for the biological assays, and Professor François-Xavier Garneau for his corrections and helpful commentaries about this manuscript. The financial support of Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT, fonds forestier 02) is gratefully acknowledged. Charles Gauthier thanks Programme d'Aide Institutionnel à la Recherche de l'Université du Québec à Chicoutimi (PAIR-UQAC), Fondation de l'UQAC and FQRNT for graduate scholarships.

REFERENCES AND NOTES

1. Cichewicz, R. H.; Kouzi, S. A. Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. *Med. Res. Rev.* **2004**, *24*, 90-114.
2. Patočka, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *J. Appl. Biomed.* **2003**, *1*, 7-12.
3. Yogeewari, P.; Sriram, D. Betulinic acid and its derivatives: A review on their biological properties. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 657-666.
4. Dzubak, P.; Hajduch, M.; Vydra, D.; Hustova, A.; Kvasnica, M.; Biedermann, D.; Markova, L.; Urban, M.; Sarek, J. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 394-411.
5. Sami, A.; Taru, M.; Salme, K.; Jari, Y.-K. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *29*, 1-13.
6. Chaturvedi, P. K.; Bhui, K.; Shukla, Y. Lupeol: Connotations for chemoprevention. *Cancer Lett.* **2008**, *263*, 1-13.
7. Eiznhamer, D. A.; Xu, Z.-Q. Betulinic acid: A promising anticancer candidate. *IDrugs* **2004**, *7*, 359-373.
8. Mukherjee, R.; Kumar, V.; Srivastava, S. K.; Agarwal, S. K.; Burman, A. C. Betulinic acid derivatives as anticancer agents: Structure activity relationship. *Curr. Med. Chem.-Anti-Cancer Agents* **2006**, *6*, 271-279.
9. Baglin, I.; Mitaine-Offer, A.-C.; Nour, M.; Tan, K.; Cavé, C.; Lacaille-Dubois, M.-A. A review of natural and modified betulinic, ursolic and echinocystic acid derivatives as potential antitumor and anti-HIV agents. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 159-165.
10. Krasutsky, P. A. Birch bark research and development. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 919-942.
11. Tolstikova, T. G.; Sorokina, I. V.; Tolstikov, G. A.; Tolstikov, A. G.; Flekhter, O. B. Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids: II. Semisynthetic lupane derivatives. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2006**, *32*, 261-276.

12. Gauthier, C.; Legault, J.; Lebrun, M.; Dufour, P.; Pichette, A. Glycosidation of lupane-type triterpenoids as potent in vitro cytotoxic agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6713-6725.
13. Thibeault, D.; Gauthier, C.; Legault, J.; Bouchard, J.; Dufour, P.; Pichette, A. Synthesis and structure-activity relationship study of cytotoxic germanicane- and lupane-type 3 β -*O*-monodesmosidic saponins starting from betulin. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6144-6157.
14. Gauthier, C.; Legault, J.; Lavoie, S.; Rondeau, S.; Tremblay, S.; Pichette, A. Synthesis of two natural betulinic acid saponins containing α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranose and their analogues. *Tetrahedron* **2008a**, *64*, 7386-7399.
15. Gauthier, C.; Legault, J.; Lavoie, S.; Rondeau, S.; Tremblay, S.; Pichette, A. Synthesis and cytotoxicity of bidesmosidic betulin and betulinic acid saponins. Accepted to *J. Nat. Prod.* **2008b**, #np-2008-00579x.
16. Francis, G.; Kerem, Z.; Makkar, H. P. S.; Becker, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Brit. J. Nutr.* **2002**, *88*, 587-605.
17. Sparg, S. G.; Light, M. E.; van Staden, J. Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *94*, 219-243.
18. Gauthier, C.; Legault, J.; Girard-Lalancette, K.; Mshvildadze, V.; Pichette, A. Haemolytic activity, cytotoxicity, and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins. Manuscript in preparation (**2008c**).
19. Liu, M.-J.; Wang, Z.; Ju, Y.; Zhou, J.-B.; Wang, Y.; Wong, R. N.-S. The mitotic-arresting and apoptosis-inducing effects of diosgenyl saponins on human leukemia cell lines. *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, *27*, 1059-1065.
20. Wang, Y.; Cheung, Y. H.; Yang, Z.; Chiu, J.-F.; Che, C.-M.; He, Q.-Y. Proteomic approach to study the cytotoxicity of dioscin (saponin). *Proteomics* **2006**, *6*, 2422-2432.
21. Hu, K.; Dong, A.; Yao, X.; Kobayashi, H.; Iwasaki, S. Antineoplastic agents; I. Three spirostanol glycosides from rhizomes of *Dioscorea collettii* var. *hypoglauca*. *Planta Med.* **1996**, *62*, 573-575.

22. Nakamura, T.; Komori, C.; Lee, Y.-Y.; Hashimoto, F.; Yahara, S.; Nohara, T.; Ejima, A. Cytotoxic activities of *Solanum* steroidal glycosides. *Biol. Pharm. Bull.* **1996**, *19*, 564-566.
23. Ikeda, T.; Tsumagari, H.; Honbu, T.; Nohara, T. Cytotoxic activity of steroidal glycosides from *Solanum* plants. *Biol. Pharm. Bull.* **2003**, *26*, 1198-1201.
24. Cham, B. E.; Daunter, B. Solasodine glycosides. Selective cytotoxicity for cancer cells and inhibition of cytotoxicity by rhamnose in mice with sarcoma 180. *Cancer Lett.* **1990**, *55*, 221-225.
25. Chang, L.-C.; Tsai, T.-R.; Wang, J.-J.; Lin, C.-N.; Kuo, K.-W. The rhamnose moiety of solamargine plays a crucial role in triggering cell death by apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *242*, 21-25.
26. Yu, B.; Zhang, Y.; Tang, P. Carbohydrate chemistry in the total synthesis of saponins. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, *31*, 5145-5161.
27. Jiang, L.; Chang, T.-H. Regioselective acylation of hexopyranosides with pivaloyl chloride. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6035-6038.
28. Schmidt, R. R.; Toepfer, A. Glycosylation with highly reactive glycosyl donors: Efficiency of the inverse procedure. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 3353-3356.
29. Zhang, Y.; Li, Y.; Guo, T.; Guan, H.; Shi, J.; Yu, Q.; Yu, B. Syntheses of chlorogenin 6 α -O-acyl-3-O- β -chacotriosides and their antitumor activities. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 1453-1459.
30. Li, T.-S.; Wang, J.-X.; Zheng, X.-J. Simple synthesis of allobetulin, 28-oxyallobetulin and related biomarkers from betulin and betulinic acid catalysed by solid acids. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1998**, 3957-3965.
31. Lavoie, S.; Pichette, A.; Garneau, F.-X. G.; Girard, M.; Gaudet, D. Synthesis of betulin derivatives with solid supported reagents. *Synthetic Commun.* **2001**, *31*, 1565-1571.
32. García-Granados, A.; López, P. E.; Melguizo, E.; Parra, A.; Simeó, Y. Partial synthesis of C-ring derivatives from oleanolic and maslinic acids. Formation of several triene systems by chemical and photochemical isomerisation processes. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 1491-1503.
33. Physical and analytical data for synthesized neosaponins (6-10):

Compound 6: $[\alpha]_D^{25}$ -40.0° (*c* 0.1, MeOH). ^1H NMR (MeOD, 400 MHz) δ : 5.36 (br s, 1H, Rha-H-1), 4.84 (br s, 1H, Rha-H-1), 4.68 (br s, 1H, H-29a), 4.56 (br s, 1H, H-29b), 4.42 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, Glc-H-1), 4.00-3.28 (m, 14H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'a, H-6'b, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-2''', H-3''', H-4''', H-5'''), 3.14 (dd, $J = 11.6$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 1H, H-3), 2.41 (m, 1H, H-19), 1.68 (s, 3H, H-30), 1.26 (d, $J = 5.9$ Hz, 3H, Rha-H-6), 1.20 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, Rha-H-6), 1.06, 1.03, 0.98, 0.87, 0.83, 0.82 (all s, $6 \times 3\text{H}$, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27, H-28). ^{13}C NMR (MeOD, 100 MHz) δ : 152.1 (C-20), 110.3 (C-29), 105.6 (C-1'), 103.2, 102.2, (C-1'', C-1'''), 90.6 (C-3), 80.6, 79.4, 78.3, 76.6, 74.1, 73.8, 72.6, 72.3 (2C), 72.2, 70.9, 70.2, 62.1 (C-6'), 57.5, 52.1, 49.6 (2C), 44.2, 44.1, 42.2, 41.2, 40.5, 39.7, 38.2, 36.8, 35.7, 31.0, 28.7, 28.5, 27.5, 26.7, 22.2, 19.7, 19.4, 18.5, 18.2, 18.0, 17.1 (2C), 17.0, 16.7, 15.1. HR-ESI-MS m/z 903.5432 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{80}\text{O}_{14}\text{Na}$: 903.5440).

Compound 7: $[\alpha]_D^{25}$ $+61.4^\circ$ (*c* 0.1, MeOH). ^1H NMR (MeOD, 400 MHz) δ : 5.36 (br s, 1H, Rha-H-1), 4.84 (br s, 1H, Rha-H-1), 4.68 (br s, 1H, H-29a), 4.57 (br s, 1H, H-29b), 4.41 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, Glc-H-1), 4.00-3.27 (m, 14H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'a, H-6'b, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-2''', H-3''', H-4''', H-5'''), 3.78 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H, H-28a), 3.28 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H, H-28b), 3.14 (dd, $J = 11.6$ Hz, $J = 4.0$ Hz, 1H, H-3), 2.42 (m, 1H, H-19), 1.68 (s, 3H, H-30), 1.26 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H, Rha-H-6), 1.20 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, Rha-H-6), 1.07, 1.03, 1.00, 0.86, 0.84 (all s, $5 \times 3\text{H}$, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27). ^{13}C NMR (MeOD, 100 MHz) δ : 151.9 (C-20), 110.3 (C-29), 105.5 (C-1'), 103.1, 102.1 (C-1'', C-1'''), 90.4 (C-3), 80.4, 79.3, 78.2, 76.5, 74.0, 73.7, 72.5, 72.2, 72.1, 72.1, 70.8, 70.0, 62.0 (C-6'), 60.4 (C-28), 57.4, 51.9, 50.1, 49.4, 49.3, 43.8, 42.2, 40.4 (2C), 38.7, 38.0, 35.5, 35.1, 30.9, 30.4, 28.4, 28.2, 27.4, 26.7, 22.0, 19.4, 19.3, 18.0, 17.9, 17.0, 16.9, 16.6, 15.3. HR-ESI-MS m/z 919.5394 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{80}\text{O}_{15}\text{Na}$: 919.5389).

Compound 8: $[\alpha]_D^{25}$ -53.8° (*c* 0.1, MeOH). ^1H NMR (MeOD, 400 MHz) δ : 5.36 (br s, 1H, Rha-H-1), 4.84 (br s, 1H, Rha-H-1), 4.70 (br s, 1H, H-29a), 4.58 (br s, 1H, H-29b), 4.41 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, Glc-H-1), 4.00-3.21 (m, 14H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'a, H-6'b, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-2''', H-3''', H-4''', H-

5'''), 3.13 (dd, $J = 11.8$ Hz, $J = 4.1$ Hz, 1H, H-3), 3.03 (td, $J = 11.0$ Hz, $J = 4.5$ Hz, 1H, H-19), 1.69 (s, 3H, H-30), 1.26 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H, Rha-H-6), 1.20 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, Rha-H-6), 1.02, 1.00, 0.96, 0.86, 0.83 (all s, 5×3 H, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27). ^{13}C NMR (MeOD, 100 MHz) δ : 180.6 (C-28), 152.3 (C-20), 110.3 (C-29), 105.6 (C-1'), 103.2, 102.2 (C-1'', C-1'''), 90.6 (C-3), 80.6, 79.4, 78.3, 76.6, 74.1, 73.8, 72.6, 72.3 (2C), 72.2, 70.9, 70.2, 62.1 (C-6'), 57.8, 57.6, 52.2, 50.6, 48.6, 43.7, 42.1, 40.5, 39.8, 38.4, 38.2, 35.8, 33.6, 31.9, 31.0, 28.5, 27.5, 27.1, 25.2, 22.2, 19.7, 19.4, 18.2, 18.1, 17.1, 17.0, 16.8, 15.3. HR-ESI-MS m/z 933.5179 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{78}\text{O}_{16}\text{Na}$: 933.5182).

Compound 9: $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -24.0° (c 0.2, MeOH). ^1H NMR (MeOD, 400 MHz) δ : 5.36 (br s, 1H, Rha-H-1), 4.84 (br s, 1H, Rha-H-1), 4.42 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, Glc-H-1), 4.00-3.28 (m, 17H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'a, H-6'b, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-2''', H-3''', H-4''', H-5''', H-19, H-28a, H-28b), 3.15 (dd, $J = 11.6$ Hz, $J = 4.0$ Hz, 1H, H-3), 1.26 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, Rha-H-6), 1.21 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, Rha-H-6), 1.03, 1.02, 0.96, 0.91, 0.89, 0.84, 0.83 (all s, 7×3 H, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27, H-28, H-29). ^{13}C NMR (MeOD, 100 MHz) δ : 105.6 (C-1'), 103.2, 102.1 (C-1'', C-1'''), 90.5 (C-3), 89.7 (C-19), 80.5, 79.3, 78.3, 76.6, 74.1, 73.8, 72.6, 72.3 (2C), 72.3 (C-28), 72.2, 70.9, 70.2, 62.1 (C-6'), 57.7, 52.7, 48.2, 42.8, 42.0 (2C), 40.6, 40.5, 38.3, 37.7, 37.3, 35.8, 35.2, 33.9, 29.4, 28.5, 27.7 (2C), 27.5, 27.2, 25.0, 22.4, 19.4, 18.2, 18.1, 17.4, 17.1, 16.4, 14.1. HR-ESI-MS m/z 919.5380 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{48}\text{H}_{80}\text{O}_{15}\text{Na}$: 919.5389).

Compound 10: $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -21.5° (c 0.2, MeOH). ^1H NMR ($\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$, 400 MHz) δ : 5.39 (br s, 1H, Rha-H-1), 4.85 (br s, 1H, Rha-H-1), 4.42 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, Glc-H-1), 4.02-3.28 (m, 15H, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'a, H-6'b, H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H-2''', H-3''', H-4''', H-5''', H-19), 3.15 (dd, $J = 12.0$ Hz, $J = 4.0$ Hz, 1H, H-3), 1.30 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, Rha-H-6), 1.24 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, Rha-H-6), 1.03, 1.03, 1.00, 0.93, 0.91, 0.87, 0.84 (all s, 7×3 H, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27, H-28, H-29). ^{13}C NMR ($\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$, 100 MHz) δ : 182.0 (C-28), 105.0 (C-1'), 102.7, 101.3 (C-1'', C-1'''), 90.2 (C-3), 87.5 (C-19), 80.6, 78.6, 77.7, 75.7, 73.6, 73.2, 71.8, 71.8, 71.7, 71.4, 70.4, 69.5, 61.7 (C-6'), 57.0, 52.1, 47.2 (2C), 41.4, 40.7, 40.1, 40.0, 37.8, 37.0, 34.2 (2C), 33.0, 32.6, 29.2,

- 28.7, 28.2, 27.0, 26.9, 26.2, 24.3, 21.7, 18.8, 17.9, 17.8, 17.2, 16.8, 16.0, 14.2.
HR-ESI-MS m/z 933.5177 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{48}H_{78}O_{16}Na$: 933.5182).
34. O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5421-5426.
 35. Kessler, J. H.; Mullauer, F. B.; de Roo, G. M.; Medema, J. P. Broad in vitro efficacy of plant-derived betulinic acid against cell lines derived from the most prevalent human cancer types. *Cancer Lett.* **2007**, *25*, 132-145.

Table 1. Cytotoxic (IC_{50}) and haemolytic (HD_{50}) activities of chacotrioside neosaponins **6-10**.

Cpd	HD_{50}^a ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	IC_{50}^a ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)				
		A549 ^b	DLD-1 ^c	MCF7 ^d	PC-3 ^e	WS1 ^f
1	>100	>50	>50	>50	>50	>50
2	>100	3.8 ± 0.1	6.6 ± 0.3	NT ^g	NT ^g	3.6 ± 0.1
3^h	>100	10.3 ± 0.4	15.0 ± 0.3	41 ± 1	40 ± 2	12 ± 1
4	>100	>50	>50	>50	>50	>50
5	>100	>50	>50	>50	>50	>50
6	30 ± 2	>50	>50	>50	>50	>50
7	>100	>50	>50	>50	>50	>50
8	>100	>50	>50	>50	>50	>50
9	90 ± 9	14 ± 2	13 ± 2	15 ± 2	13 ± 2	9 ± 1
10	8.0 ± 0.9	13 ± 1	14 ± 1	18 ± 2	10 ± 1	3.8 ± 0.2
PBS	>100	-	-	-	-	-
Saponin ⁱ	7.4 ± 0.3	-	-	-	-	-

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

^b Human lung carcinoma.

^c Human colorectal adenocarcinoma.

^d Human breast adenocarcinoma.

^e Human prostate adenocarcinoma.

^f Human normal skin fibroblasts.

^g Not tested.

^h Betulinic acid (**3**) was used as a positive control for the cytotoxic assay.

ⁱ Value in $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

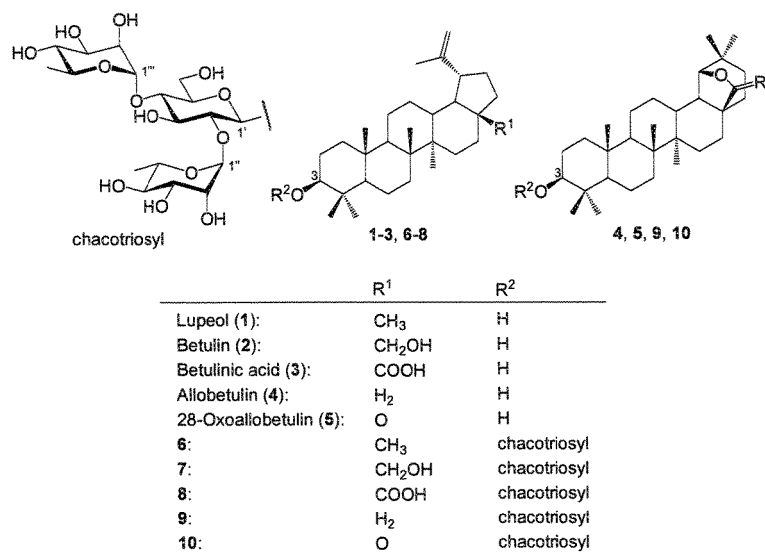
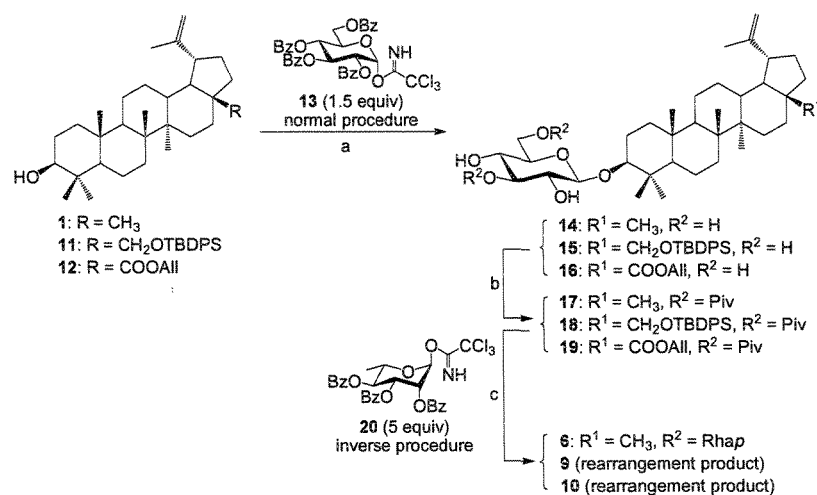
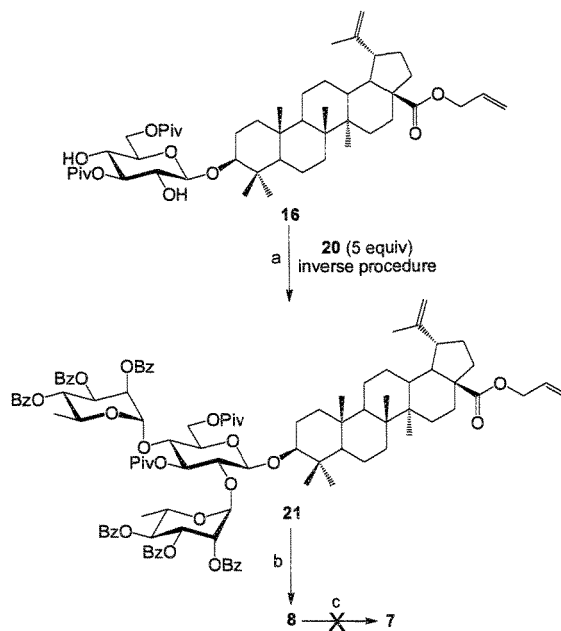


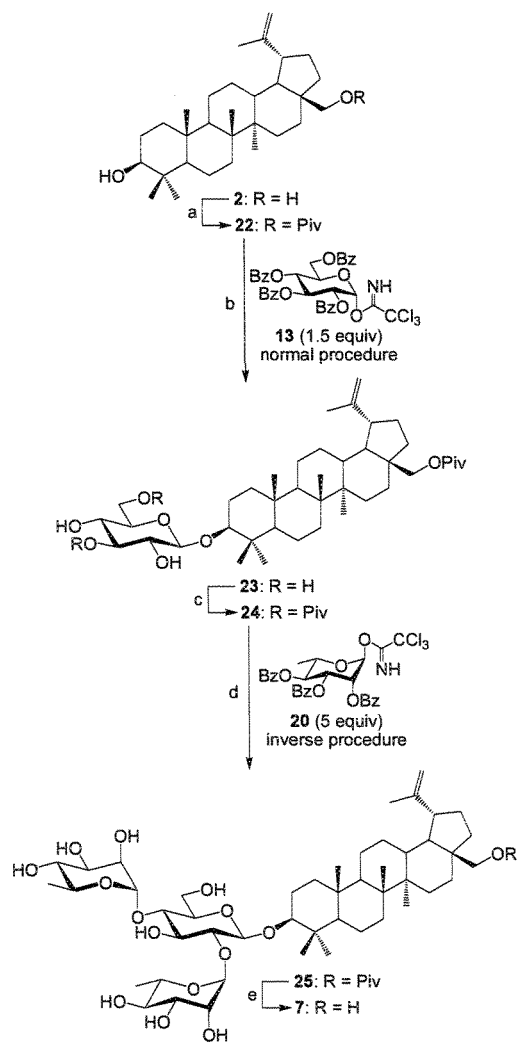
Figure 1. Triterpenes 1-5 and chacotrioside neosaponins 6-10.



Scheme 1. Reagents and conditions: (a) (i) TCA **13** (1.5 equiv), TMSOTf (0.1 equiv), 4 Å MS, CH₂Cl₂, rt, 2 h; (ii) NaOH (0.5 N), MeOH/THF/H₂O 1:2:1, rt, overnight, 90% for **14** (two steps); 72% for **15** (two steps); 80% for **16** (two steps); (b) PivCl (5.1 equiv), Py, 0 °C to rt, 4 h, 60% for **17**; 61% for **18**; 62% for **19**; (c) (i) TCA **20** (5.0 equiv), TMSOTf (0.5 equiv), 4 Å MS, CH₂Cl₂, -10 °C to rt, 3.5-5 h; (ii) NaOH (0.5 N), MeOH/THF/H₂O 1:2:1, rt, 3 days, 57% for **6** (two steps); 32% for **9** (two steps); 24% for **10** (two steps).



Scheme 2. Reagents and conditions: (a) TCA **20** (5.0 equiv), TMSOTf (<0.2 equiv), 4 Å MS, CH₂Cl₂, rt, 3 h, 96%; (b) (i) NaOH (0.5 N), MeOH/THF/H₂O 1:1:1, 50 °C, 5 h; (ii) Pd⁰(PPh₃)₄ (0.3 equiv), PPh₃ (0.6 equiv), pyrrolidine (2.0 equiv), THF, rt, 4 h, 78% (two steps); (c) LiAlH₄ (2.6 equiv), THF, reflux, 4 h.



Scheme 3. Reagents and conditions: (a) PivCl (1.2 equiv), Py, 0°C to rt, 6 h, 76%; (b) (i) TCA **13** (1.5 equiv), TMSOTf (0.1 equiv), 4 Å MS, CH₂Cl₂, rt, 2h; (ii) NaOH (0.5 N), MeOH/THF/H₂O 1:2:1, rt, overnight, 68% (two steps); (c) PivCl (5.1 equiv), Py, 0°C to rt, overnight, 60%; (d) (i) TCA **20** (5.0 equiv), TMSOTf (<0.2 equiv), 4 Å MS, CH₂Cl₂, rt, 3 h; (ii) NaOH (0.5 N), MeOH/THF/H₂O 1:1:1, 50 °C, 5 h, 54% (two steps); (e) NaOH (1.5 N), MeOH/H₂O 2:1, reflux, 48 h, 88%.

CHAPITRE 7

SYNTHÈSE DE L'ACIDE 28-O- β -D-GLUCURONIDE BÉTULINIQUE POUR APPLICATION DANS UNE STRATÉGIE « PRODRUGUE MONOTHÉRAPIE »

Charles Gauthier, Jean Legault, Simon Rondeau et André Pichette**

*Laboratoire d'Analyse et de Séparation des Essences Végétales, Département des
Sciences Fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, 555 boul. de
l'Université, Chicoutimi, (Québec), Canada, G7H 2B1*

(Article soumis à *Tetrahedron Letters* #TETL-D-08-03181, voir Annexe 5)

Mots clés: Acyl glucuronides; acide bétulinique; prodrogue monothérapie;
anticancéreux.

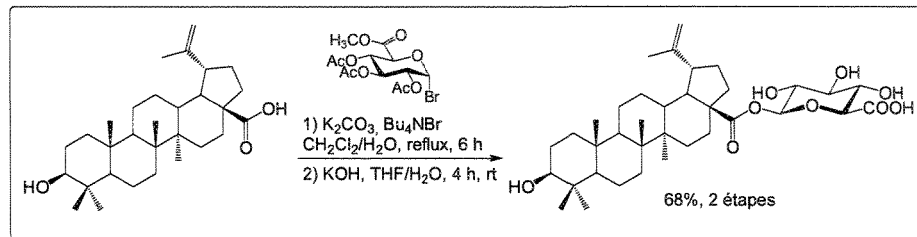
** Auteur de correspondance. Tél: +1 418 545-5011; fax: +1 418 545-5012; courriel:

andre_pichette@uqac.ca

CONTRIBUTION DES AUTEURS

L'auteur principal de cet article (C. Gauthier) a rédigé toutes les sections du manuscrit en plus d'effectuer la synthèse, la purification et la caractérisation de tous les nouveaux composés. Les tests de stabilité et d'hydrolyse enzymatique ont également été réalisés par C. Gauthier. S. Rondeau a participé, dans le cadre de son projet de fin d'études, à la synthèse organique et à la purification des composés. J. Legault et A. Pichette sont, respectivement, le co-directeur et le directeur du présent projet de thèse.

RÉSUMÉ GRAPHIQUE



RÉSUMÉ

La préparation des métabolites acyl-glucuronides d'agents thérapeutiques contenant une ou des fonctions acides carboxyliques est souvent utile pour leur développement préclinique ou clinique. À cet effet, une méthodologie destinée à synthétiser l'acide 28-*O*- β -D-glucuronide bétulinique (**217**) a été mise au point et décrite dans ce chapitre. Des tentatives de couplage entre l'acide bétulinique (**15**) et l'allyle glucuronate (**218**) selon les conditions rapportées par Mitsunobu et d'acylation sélective n'ont pas donné le produit escompté. De plus, l'oxydation de l'acide 28-*O*- β -D-glucopyranoside bétulinique (**176**) a également été tentée à l'aide du système d'oxydation TEMPO/KBr/Ca(OCl)₂ sans toutefois permettre l'obtention de l'acyl glucuronide **217**. En revanche, la synthèse du glucuronide **217** a été réalisée avec succès (68%, deux étapes) par l'utilisation des conditions réactionnelles de transfert de phase. Cette méthodologie de synthèse pourrait être appliquée ultérieurement pour la préparation des métabolites glucuronidés du bevirimat (**214-216**) et autres drogues contenant un ou des acide(s) carboxylique(s). Par ailleurs, les résultats ont montré que l'acyl glucuronide **217** pourrait être un candidat intéressant en tant que prodrogue en regard de certains critères spécifiques à la stratégie PMT: bonne stabilité, hydrosolubilité supérieure à l'aglycone, non cytotoxique, non hémolytique et molécule activée sélectivement par l'enzyme β -D-glucuronidase au niveau du tissu tumoral.

INTRODUCTION

La glucuronidation est l'une des principales voies métaboliques de phase II par laquelle l'organisme transforme une drogue ou un xénobiotique en une substance hydrosoluble ce qui permet son excrétion subséquente par le système rénal [Shipkova *et al.*, 2005]. La réaction de glucuronidation est catalysée par des enzymes de la famille des uridine diphosphate glucuronosyltransférases (UDPGTs). Les composés contenant des alcools aliphatiques et des phénols sont métabolisés en éther *O*-glucuronides tandis que ceux contenant un acide carboxylique sont métabolisés en ester *O*-glucuronides (acyl glucuronides). Étant donné que les glucuronides possèdent habituellement une activité biologique plus faible que l'aglycone correspondant, la métabolisation par glucuronidation est généralement considérée comme un processus de détoxification [Shipkova *et al.*, 2003]. Toutefois, plusieurs exceptions existent puisque le glucuronide peut subir des réactions d'hydrolyse enzymatique catalysées par la β -glucuronidase régénérant l'aglycone biologiquement actif et prolongeant ainsi l'effet de la drogue. De plus, dans certains cas, comme par exemple pour la morphine-6-glucuronide, la glucuronidation peut être à l'origine d'un maintien ou d'une augmentation significative de l'effet pharmacologique [Shipkova *et al.*, 2005].

Plusieurs études ont démontré que les acyls glucuronides de drogues contenant un acide carboxylique sont des composés chimiquement très réactifs qui peuvent être à l'origine de nombreux effets secondaires et toxicité [Stachulski *et al.*, 2006]. En effet, les acyl glucuronides peuvent subir des réactions hydrolytiques, des réarrangements intramoléculaires et se lier de manière irréversible avec des protéines du plasma sanguin [Yang *et al.*, 2006]. Ainsi, la détermination et la caractérisation des drogues métabolisées sous la forme d'acyl glucuronides et les protéines auxquelles ils peuvent se lier ont des implications cliniques et toxicologiques très importantes lors du développement pharmaceutique d'une nouvelle molécule contenant un acide carboxylique.

Le bevirimat (**21**, PA-457) ou l'acide 3 β -O-(3',3'-diméthylsuccinyl) bétulinique est un agent anti-VIH très prometteur actuellement en phase clinique qui contient deux groupements acide carboxylique. Récemment, une étude supportée financièrement par la compagnie Panacos Pharmaceuticals a montré que, après une administration orale chez le rat, le bevirimat (**21**, Figure 48) est métabolisé en différents acyl glucuronides (**214-216**, Figure 48) excrétés principalement dans la bile [Wen *et al.*, 2006]. Selon cette étude, le glucuronide prédominant est le monoglucuronide **214** avec des quantités moindres de monoglucuronide **215** et de diglucuronide **216**. Les monoglucuronides **214** et **215** ont présenté une très grande stabilité aussi bien dans le tampon phosphate (0,1 M; pH 4, 7,4 et 9) que dans le plasma sanguin alors que le diglucuronide **216** était légèrement moins stable. De plus, tous les glucuronides du PA-457 ont été hydrolysés en présence de la β -D-glucuronidase [Wen *et al.*, 2006].

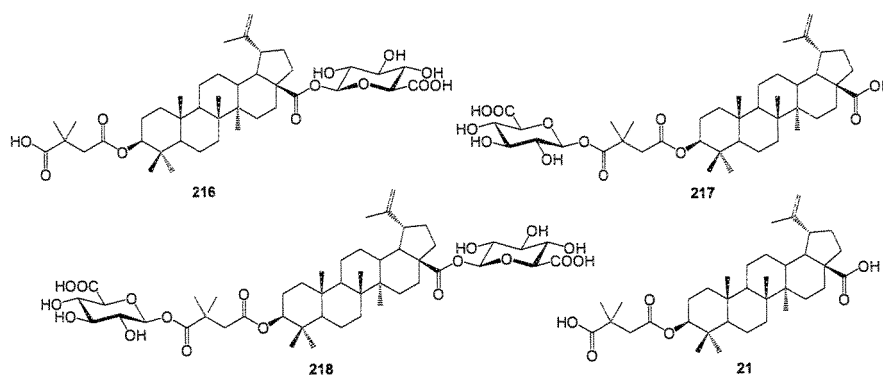


Figure 48. Acyl glucuronides (**214-216**) du bevirimat (**21**)

La préparation d'une grande quantité de glucuronides **214** à **216** sous une forme pure (lien β exclusif) est donc nécessaire afin d'évaluer l'activité biologique et la toxicité potentielle de ces métabolites et ainsi accélérer le processus de développement du bevirimat (**21**) en tant qu'agent anti-VIH. Dans le cadre de ce projet préliminaire, une méthodologie pour la synthèse chimique de l'acide 28-O- β -D-glucuronide bétulinique (**217**, Figure 49) a été développée. La stabilité, la cytotoxicité, l'activité hémolytique et la cinétique d'hydrolyse enzymatique du glucuronide **217** ont également été évaluées afin de déterminer s'il pourrait être utilisé dans une stratégie « prodrogue monothérapie » (PMT) [Chen *et al.*, 2003]. Il est important de noter ici

que les résultats présentés dans ce chapitre constituent des travaux non-terminés qui nécessiteraient donc des études supplémentaires afin d'être publiés (synthèse des glucuronides **214-216** et/ou étude anticancéreuse *in vivo*).

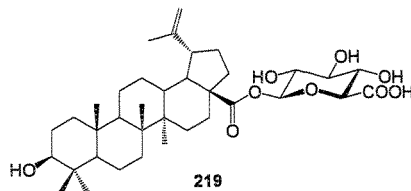


Figure 49. Acide 28-*O*- β -D-glucuronide bétulinique (**217**)

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Alors que les publications rapportant la synthèse d'éther *O*-glucuronides sont abondantes dans la littérature scientifique [Stachulski *et al.*, 1998; Ferguson *et al.*, 2001; Harding *et al.*, 2005], peu d'études ont été effectuées concernant la préparation de dérivés acyl glucuronides [Stachulski *et al.*, 2006; Stachulski, 2007]. Une première méthode consiste à coupler l'allyle glucuronate (**218**) avec un acide carboxylique selon les conditions proposées par Mitsunobu [Juteau *et al.*, 1997]. L'avantage de cette méthode réside dans l'utilisation d'un sucre minimalement protégé ce qui réduit considérablement le nombre d'étapes de la voie de synthèse. Ainsi, tel qu'illustré à la figure 50, le couplage de l'allyle α,β -D-glucuronate (**218**) obtenu à la suite de l'allylation de l'acide D-glucuronique [Bowkett *et al.*, 2007] a été effectué avec l'acide bétulinique (**15**) en présence de triphénylphosphine (PPh₃) et de diisopropylazodicarboxylate (DIAD) dans le THF. Toutefois, après la séparation sur colonne de gel de silice, le seul produit obtenu s'est avéré être l'acide 28-*O*- α -D-glucuronide bétulinique (**219**) non désiré dans un rendement de 9%. La nature 1,2-*cis* (α -glucuronide) du lien glycosidique a été déterminée par la faible valeur de la constante de couplage du proton anomérique sur le spectre RMN ¹H (6,17 ppm, br s, H-1'). Il est intéressant de noter que, lors de cette réaction, la désallylation de l'acide carboxylique s'est effectuée en même temps que la glucuronidation. Une autre

méthodologie développée par le groupe de Stachulski [Perrie *et al.*, 2005; Bowkett *et al.*, 2007] qui permet l'obtention préférentielle du β -glucuronide (1,2-*trans*) a donc été utilisée. Celle-ci consiste en l'acylation sélective de l'allyle glucuronate (**218**) avec un acide carboxylique en présence de *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tétraméthyluronium hexafluorophosphate (HATU) et de *N*-méthylmorpholine (NMM) dans l'acétonitrile. Malheureusement, selon ces conditions réactionnelles, aucun produit formé n'a été détecté par TLC et l'acide bétulinique (**15**) a été entièrement récupéré après purification (Figure 50). L'ajout de THF dans le milieu réactionnel afin d'augmenter la solubilité du triterpène **15** n'a pas permis d'améliorer ce résultat.

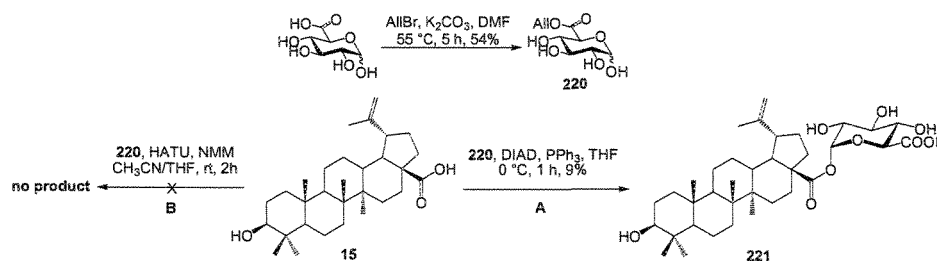


Figure 50. Synthèse d'acyl glucuronides via Mitsunobu (A) et l'acylation sélective (B)

Nous nous sommes donc tournés vers une autre approche qui consiste à oxyder sélectivement l'alcool primaire d'un β -glucoside à l'aide du système d'oxydation catalysé par TEMPO (2,2,6,6-tétraméthylpiperidine-1-oxyl) [Lin *et al.*, 2004; De Souza, 2006]. Ainsi, l'oxydation de l'acide 28-*O*- β -D-glucopyranoside bétulinique (**174**) [Baglin *et al.*, 2003] a été tentée avec le système d'oxydation TEMPO-KBr-Ca(OCl)₂ en conditions aqueuses (*t*-BuOH/H₂O) (Figure 51). Encore une fois, sous ces conditions, le produit initial n'a pas réagi possiblement en raison d'un manque de solubilité de la molécule initiale dans le milieu réactionnel.

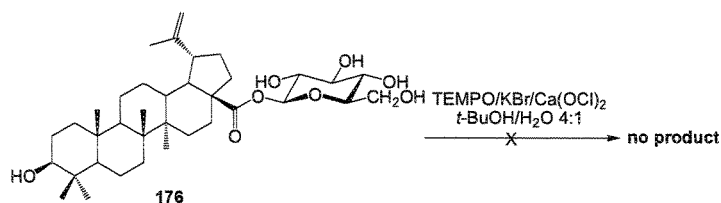


Figure 51. Synthèse d'acyl glucuronides via le système d'oxydation TEMPO/KBr/Ca(OCl)₂

La synthèse du 28-acyl glucuronide désiré (**217**) a finalement été réussie en utilisant des conditions réactionnelles de transfert de phase [Bliard *et al.*, 1994]. Tel qu'indiqué à la figure 52, le bromure de méthyl 2,3,4-tri-*O*-acétyl glucuronate (**220**), produit commercial très instable à la température de la pièce, a été couplé avec l'acide bétulinique (**15**) en présence de carbonate de potassium (K₂CO₃) et de bromure de tétrabutylammonium (Bu₄NBr) à reflux pendant six heures dans une solution hétérogène de CH₂Cl₂/H₂O 1:1. Après la purification, l'acide 28-*O*-(méthyl-2,3,4-tri-*O*-acétyl-β-D-glucuronate) bétulinique (**221**) a été obtenu dans un excellent rendement de 76%. La déprotection subséquente des groupements acétyles simultanément à la saponification de l'ester de méthyle sous conditions basiques (KOH, THF/H₂O) a permis la formation du 28-acyl glucuronide **217** (89%). Selon la RMN ¹H, le lien glycosidique était exclusivement de nature 1,2-*trans* (5,55 ppm, d, *J*_{1,2} = 8,1 Hz, H-1').

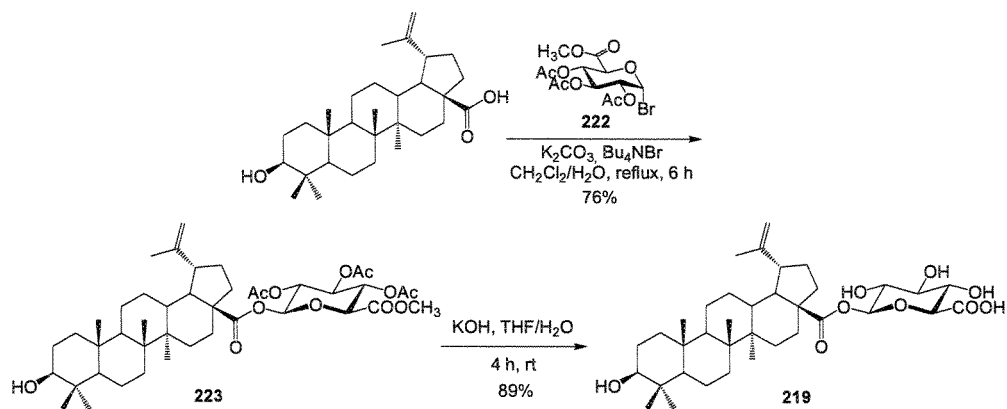


Figure 52. Synthèse de l'acide 28-*O*-β-D-glucuronide bétulinique (**217**) par synthèse en phase hétérogène

Il serait évidemment très intéressant d'utiliser cette méthodologie de glucuronidation afin de préparer les différents glucuronides du bevirimat (**214-216**). Par exemple, l'une ou l'autre des voies de synthèse présentées à la figure 53 seraient appropriées pour la synthèse du monoglucuronide majoritaire **214**. L'avantage de la deuxième voie (B) réside dans le fait que la séparation des produits formés pourrait se faire sans l'utilisation du HPLC-préparatif ce qui diminuerait grandement les coûts associés à la préparation de **214**.

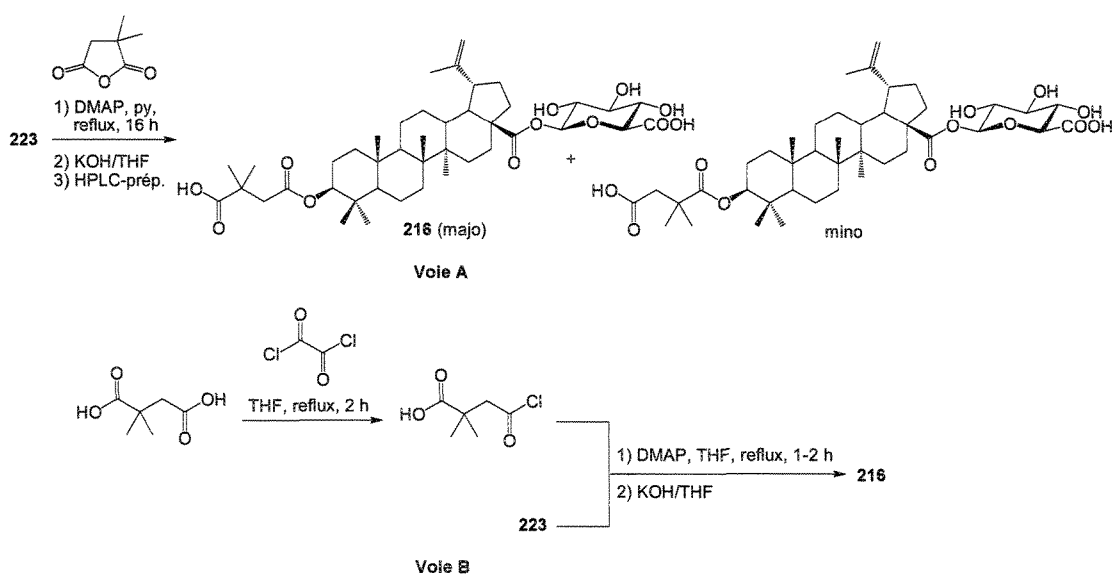


Figure 53. Voies de synthèse potentielles du monoglucuronide de bevirimat (**214**)

Les molécules anticancéreuses porteuses d'une section glucuronylée (glucuronides) peuvent être considérées, dans certains cas, comme des prodrogues puisqu'elles peuvent s'activer sélectivement au niveau du tissu cancéreux [de Graaf *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003; Shipkova *et al.*, 2005]. En effet, il est connu que l'activité de l'enzyme β -D-glucuronidase est plus élevée dans les zones nécrotiques des tumeurs [Bosslet *et al.*, 1998]. De plus, cette enzyme est plus active dans un pH cytoplasmique acide caractéristique de certaines cellules cancéreuses [Sperker *et al.*, 1997]. Plusieurs critères doivent être pris en considération afin de déterminer si une molécule peut servir dans une stratégie dite par « prodrogue monothérapie » (PMT): 1) solubilité aqueuse supérieure à l'aglycone; 2) bonne stabilité dans le plasma

sanguin; 3) cytotoxicité plus faible que l'aglycone; 4) molécule activée sélectivement au niveau du tissu tumoral [Chen *et al.*, 2003].

Ainsi, afin de déterminer si l'acide 28-*O*- β -D-glucuronide bétulinique (**217**) pourrait être utilisé en tant que prodrogue anticancéreuse dans une stratégie PMT, différentes expérimentations ont été entreprises. Tout d'abord, la cytotoxicité du glucuronide **217** a été évaluée à l'aide du test de viabilité cellulaire à la résazurine [O'Brien *et al.*, 2000] sur différentes lignées cancéreuses humaines (A549 et DLD-1) de même que sur une lignée saine (WS1). Comme le montre le tableau 5, l'acyl glucuronide **217** n'a démontré aucune activité à inhiber la croissance des cellules ($IC_{50} > 100 \mu M$). À titre de comparaison, l'acide bétulinique (**15**) possède un IC_{50} se situant entre 10,3 et 15,0 μM sur les mêmes lignées cellulaires [Gauthier *et al.*, 2006]. De surcroît, l'activité hémolytique de la molécule **217** a été évaluée sur des érythrocytes de mouton (Tableau 5). Aucune hémolyse des globules rouges n'a été décelée après traitement avec **217** ($HD_{50} > 100 \mu M$) comme c'est le cas pour la majorité des triterpènes et glycosides de type lupane [Gauthier *et al.*, 2008].

Tableau 5. Cytotoxicité (IC_{50}) et activité hémolytique (HD_{50}) du glucuronide **217**

	Cytotoxicité ^a			Hémolyse ^a (HD_{50} , μM)
	(IC ₅₀ , μM)			
	A549 ^b	DLD-1 ^c	WS1 ^d	
	>100	>100	>100	>100

^a Trois expériences indépendantes en triplicata.

^b Carcinome du poumon humain.

^c Adénocarcinome du colon humain.

^d Fibroblastes normaux humains.

Un autre paramètre important à considérer est la stabilité du composé **217** en solution. Ainsi, après plus de 72 heures dans le tampon phosphate (0,02 M; pH 7,2), aucune décomposition du glucuronide **217** n'a été détectée selon les analyses par HPLC (H₂O/CH₃CN). Il est également intéressant de noter que, comparativement à l'acide bétulinique (**15**), le composé **217** a pu être dissous à une concentration

relativement élevée ($\approx 150 \mu\text{M}$) dans une solution aqueuse ce qui démontre son hydrosolubilité supérieure. Finalement, le clivage de l'acyl glucuronide **217** par l'enzyme β -D-glucuronidase ($43 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) provenant de la bactérie *Escherichia coli* dans un tampon phosphate ($0,02 \text{ M}$; pH 7,2) a été mesuré par HPLC analytique. Les résultats ont révélé que l'acide bétulinique (**15**) est relâchée dans la solution (Figure 54) montrant ainsi que le glucuronide **217** est un bon substrat pour l'enzyme comme c'est le cas avec les différents métabolites glucuronidés du bevirimat [Wen *et al.*, 2006].

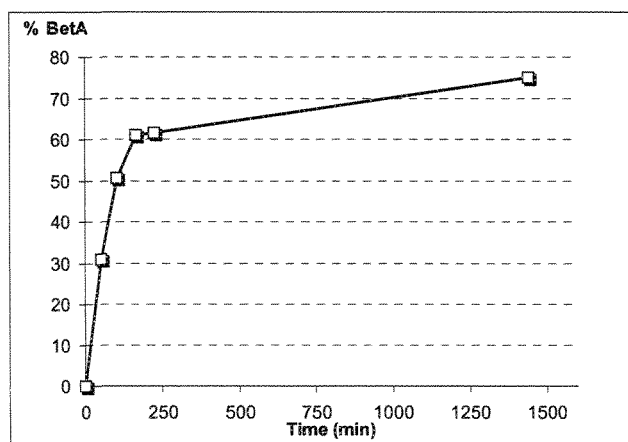


Figure 54. Hydrolyse enzymatique du glucuronide **217** relâchant l'acide bétulinique (**15**).

CONCLUSION

En somme, pour la première fois, la synthèse de l'acide 28-O- β -D-glucuronide bétulinique (**217**) a été réalisée avec succès par l'utilisation des conditions réactionnelles de transfert de phase. La méthodologie de synthèse pourrait être appliquée ultérieurement pour la préparation des métabolites glucuronidés du bevirimat (**214-216**) et autres drogues carboxyliques. Les résultats ont montré que le glucuronide **217** pourrait être utilisé en tant que prodrogue dans une stratégie PMT (bonne stabilité, hydrosolubilité supérieure, non cytotoxique, non hémolytique, bon substrat pour la β -D-glucuronidase). De futures études *in vivo* sur un modèle de

souris porteuses de tumeurs murines seraient donc nécessaires afin de prouver l'efficacité du glucuronide **217**.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Procédure générale

Les réactifs chimiques et les solvants ont été achetés chez Sigma-Aldrich® et utilisés dès leur réception. Les réactions sensibles à l'air et/ou à l'eau ont été réalisées avec des solvants fraîchement distillés dans une verrerie chauffée sous vide maintenue sous une atmosphère d'argon ou d'azote. Les réactifs sensibles à l'humidité ont été introduits par l'intermédiaire d'une seringue sèche. Les chromatographies sur couche mince ont été réalisées avec du gel de silice (60 F₂₅₄, plaques de 0,25 mm) acheté chez Silicycle® (Canada). Les composés ont été visualisés sous lumière UV₂₅₄ et/ou après traitement avec du molybdate de cérium [2 g Ce(SO₄)₄(NH₄)₄, 5 g MoO₄(NH₄)₂, 200 mL H₂O et 20 mL H₂SO₄]. Les purifications ont été effectuées par chromatographies éclaircies sur colonne avec du gel de silice (60 à 230 mesh) de la compagnie Silicycle® (Canada). Tous les rendements représentent généralement le plus haut résultat obtenu pour trois expériences indépendantes. Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance 400 MHz (¹H) et 100 MHz (¹³C) muni d'une sonde QNP de 5 mm. L'élucidation des structures chimiques était basée sur les expériences de RMN ¹H, ¹³C, DEPT-135, COSY, TOCSY, HMBC, HSQC et NOESY. Les signaux sont rapportés en tant que m (multiplet), s (singulet), d (doublet), t (triplet), dd (doublet de doublet), br s (singulet large) et les constantes de couplage sont rapportées en hertz (Hz). Les déplacements chimiques sont rapportés en parties par million (ppm) en fonction du solvant résiduel ou du TMS. Les rotations optiques ont été réalisés en utilisant la raie D du sodium à température ambiante avec un polarimètre automatique de type Rudolph Research Analytical Autopol IV. Les spectres de masse haute résolution à ionisation par électrospray (HR-ESI-MS) ont été obtenus au département de chimie de l'Université de Montréal (Canada).

Synthèse de l'allyle α,β -D-glucuronate (218)

À une solution d'acide D-glucuronique (10,0 g; 51,5 mmol) dissous dans le DMF (361 mL) est ajoutée K_2CO_3 (21,4 g; 154 mmol) et AllBr (17,8 mL; 206 mmol). Le milieu réactionnel est agité pendant 4 h à 55 °C. Après l'abaissement de la température, la solution est acidifiée à pH 3-4 avec HCl 10%. Ensuite, du toluène est ajouté (2× 400 mL) et les solvants sont évaporés sous vide jusqu'à siccité. Le produit brut est recristallisé dans le MeOH, les cristaux sont filtrés sur Büchner et rincé avec MeOH à froid pour donner **218** (6,49 g; 54%) sous la forme d'un solide blanc amorphe. Les données RMN 1H et ^{13}C du produit **218** sont en accord avec celles de la littérature [Juteau *et al.*, 1997]. HR-ESI-MS m/z 257,0632 $[M+Na]^+$ (calculé pour $C_9H_4O_7Na$: 257,0629).

Synthèse de l'acide 28-O- α -D-glucuronide bétulinique (219)

À une solution d'acide bétulinique (**15**; 50 mg; 0,11 mmol), d'allyle glucuronate (**218**; 13 mg; 0,055 mmol) et de PPh_3 (29 mg; 0,11 mmol) dans le THF (0,55 mL) est ajouté DIAD (22 μ L; 0,11 mmol) à 0 °C sur une période de 5 minutes. Le milieu réactionnel est agité pendant 4 h à température ambiante et les solvants sont évaporés sous vide jusqu'à siccité. Le résidu est ensuite purifié par chromatographie éclair sur colonne de gel de silice ($CH_2Cl_2/MeOH$ 49:1 à 47:3) pour donner **219** (6,0 mg; 9%) sous la forme d'une poudre blanche amorphe. RMN 1H (MeOD, 400 MHz) δ : 6,17 (s, 1H, H-1'), 4,99 (dd, $J = 5,9$ Hz, $J = 4,3$ Hz, 1H, H-3'), 4,87 (d, $J = 4,3$ Hz, 1H, H-2'), 4,71 (br s, 1H, H-29a), 4,58 (br s, 1H, H-29b), 4,57 (m, 1H, H-4'), 4,29 (br s, 1H, H-5'), 3,12 (dd, $J = 11,3$ Hz, $J = 5,4$ Hz, 1H, H-3), 3,00 (td, $J = 11,0$ Hz, $J = 4,5$ Hz, 1H), 1,68 (s, 1H, H-30), 0,99, 0,95, 0,94, 0,86, 0,74 (tous s, 5× 3H, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27). RMN ^{13}C (MeOD, 100 MHz) δ : 176,6 (C-6'), 175,9 (C-28), 152,1 (C-20), 110,3 (C-29), 104,0 (C-1'), 84,1 (C-2'), 81,8 (C-3'), 79,8 (C-3), 78,9 (C-5'), 70,1 (C-4'), 58,1 (C-17), 57,0 (C-5), 52,2 (C-9), 50,9 (C-18), 48,5 (C-19), 43,6 (C-14), 42,1 (C-8), 40,2 (C-1), 40,1 (C-4), 39,7 (C-13), 38,5 (C-10), 37,3 (C-22), 35,7 (C-7), 32,5 (C-16), 31,6 (C-21), 31,1 (C-15), 28,8 (C-23), 28,2 (C-12), 27,0 (C-2),

22,2 (C-11), 19,7 (C-30), 19,6 (C-6), 16,9, 16,8, 16,3 (C-24, C-25, C-26), 15,2 (C-27). HR-ESI-MS m/z 631,3852 $[M+H]^+$ (calculé pour $C_{36}H_{56}O_9$: 631,3852).

Synthèse de l'acide 28-O-(méthyl-2,3,4-tri-O-acétyl- β -D-glucuronate) bétulinique (221)

À une solution d'acide bétulinique (**15**; 200 mg; 0,438 mmol) et de bromure de méthyl 2,3,4-tri-O-acétyl glucuronate (**220**; 261 mg; 0,657 mmol) dans CH_2Cl_2 (5,1 mL) est ajouté K_2CO_3 (151 mg; 1,10 mmol), H_2O (5,1 mL) et Bu_4NBr (56 mg; 0,18 mmol). Le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant 6 h, dilué avec CH_2Cl_2 et la phase organique est lavée avec H_2O (2 \times) et une solution aqueuse saturée en NaCl (1 \times). Les solvants de la solution séchée avec $MgSO_4$ anhydre sont évaporés sous vide jusqu'à siccité. Le résidu est ensuite purifié par chromatographie éclair sur colonne de gel de silice (hexanes/EtOAc 9:1 à 13:7) pour donner **221** (255 mg; 76%) sous la forme d'une poudre blanche cristalline. RMN 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 5,74 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-1'), 5,35 (m, 1H, H-3'), 5,25 (m, 2H, H-2', H-4'), 4,73 (br s, 1H, H-29a), 4,60 (br s, 1H, H-29b), 4,16 (d, $J = 10,0$ Hz, 1H, H-5'), 3,73 (s, 3H, CO_2CH_3), 3,18 (dd, $J = 11,4$ Hz, $J = 5,1$ Hz, 1H, H-3), 2,94 (td, $J = 11,1$ Hz, $J = 5,1$ Hz, 1H, H-19), 2,05, 2,05, 2,02 (tous s, 3 \times 3H, $O(CO)CH_3$), 1,67 (s, 3H, H-30), 0,96, 0,96, 0,89, 0,82, 0,75 (tous s, 5 \times 3H, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27). RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz) δ : 173,9 (C-28), 170,0, 169,4, 168,9, 166,7 (C-6' et 3 \times $O(CO)CH_3$), 150,1 (C-20), 109,8 (C-29), 90,8 (C-1'), 78,9 (C-3), 74,0 (C-5'), 72,0 (C-3'), 69,7 (C-4'), 69,2 (C-2'), 56,8 (C-17), 55,3 (C-5), 50,5 (C-9), 49,1 (C-18), 46,7 (C-19), 42,4 (C-14), 40,6 (C-8), 38,8 (C-4), 38,7 (C-1), 38,1 (C-13), 37,2 (C-10), 36,3 (C-22), 34,4 (C-7), 31,6 (C-16), 30,2 (C-21), 29,7 (C-15), 28,0 (C-23), 27,4 (C-2), 25,4 (C-12), 20,8 (C-11), 20,6, 20,6, 20,5 (3 \times $O(CO)CH_3$), 19,4 (C-30), 18,3 (C-6), 16,1, 16,0, 15,4, 14,7 (C-24, C-25, C-26, C-27). HR-ESI-MS m/z 795,4280 $[M+Na]^+$ (calculé pour $C_{43}H_{64}O_{12}Na$: 795,4290).

Synthèse de l'acide 28-O-β-D-glucuronide bétulinique (217)

À une solution de l'acide 28-O-(méthyl-2,3,4-tri-O-acétyl-β-D-glucuronate) bétulinique (**221**; 101 mg; 0,129 mmol) dans THF (19,1 mL) et H₂O (4,8 mL) est ajoutée KOH (72 mg; 1,3 mmol). Le milieu réaction est agité pendant 4,5 h à température ambiante. La solution est ensuite acidifiée à pH 3-4 avec HCl 10% et les solvants sont évaporés sous vide jusqu'à sécheresse. Le résidu est purifié par chromatographie éclair sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 à 2:3) pour donner **217** (72 mg; 89%) sous la forme d'une poudre blanche amorphe. R_f 0,16 (CH₂Cl₂/MeOH 3:1); $[\alpha]_D^{25}$ -28,0° (c 0,2; MeOH); RMN ¹H (CDCl₃/MeOD 1:1, 400 MHz) δ : 5,55 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, H-1'), 4,72 (br s, 1H, H-29a), 4,60 (br s, 1H, H-29b), 3,79 (m, 1H, H-5'), 3,53 (m, 2H, H-3', H-4'), 3,42 (m, 1H, H-2'), 3,15 (dd, $J = 6,0$ Hz, $J = 10,0$ Hz, 1H, H-3), 3,00 (td, $J = 11,0$ Hz, $J = 4,5$ Hz, 1H, H-19), 1,69 (s, 1H, H-30), 0,98, 0,95, 0,94, 0,83, 0,75 (tous s, 5× 3H, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27). RMN ¹³C (CDCl₃/MeOD 1:1, 100 MHz) δ : 175,7 (C-28), 175,6 (C-6'), 151,1 (C-20), 110,0 (C-29), 94,2 (C-1'), 77,3 (C-3'), 75,8 (C-5'), 73,1 (C-2'), 72,4 (C-4'), 79,2 (C-3), 57,3 (C-17), 56,0 (C-5), 51,2 (C-9), 50,1 (C-18), 47,5 (C-19), 43,0 (C-14), 41,3 (C-8), 39,4 (C-1), 39,4 (C-4), 38,6 (C-13), 37,7 (C-10), 36,8 (C-22), 34,8 (C-7), 32,3 (C-16), 30,8 (C-21), 30,1 (C-15), 28,3 (C-23), 27,4 (C-12), 26,1 (C-2), 21,4 (C-11), 19,5 (C-30), 18,8 (C-6), 16,5, 16,2, 15,8 (C-24, C-25, C-26), 15,1 (C-27). HR-ESI-MS m/z 655,3804 [M+Na]⁺ (calculé pour C₃₆H₅₆O₉Na: 655,3817).

Culture cellulaire et évaluation de la cytotoxicité

Les lignées cellulaires humaines de carcinome de poumon (A549), de l'adénocarcinome du côlon (DLD-1) et des fibroblastes normaux (WS1) ont été obtenues chez ATCC (American Type Culture Collection). Toutes les lignées cellulaires ont été cultivées dans un milieu essentiel contenant des sels Earle et de la L-glutamine (Mediatech Cellgro, VA) auquel est ajouté 10% de sérum bovin fœtal (Hyclone), des vitamines (1X), de la pénicilline (100 I.U./mL), de la streptomycine (100 µg/mL), des acides aminés essentiels (1X) et du pyruvate de sodium (1X)

(Mediatech Cellgro, VA). Les cellules ont été gardées à 37 °C dans un environnement humidifié contenant 5% de CO₂. Pour l'évaluation de la cytotoxicité, les cellules en croissance exponentielle ont été placées dans des microplaques à 96 puits (Costar, Corning Inc.) à une densité de 5×10^3 cellules par puits dans 100 μL de milieu de culture et ont été laissées adhérer pendant 16 h avant le traitement. Par la suite, des concentrations croissantes du glucuronide **217** dissous dans le DMSO (Sigma-Aldrich) ont été ajoutées (100 μL par puits) et les cellules ont été incubées pendant 48 h. La concentration finale de DMSO dans le milieu de culture a été maintenue à 0,5% (v/v) pour éviter la toxicité potentielle du solvant. Les mesures de cytotoxicité ont été effectuées en utilisant le test de réduction à la résazurine [O'Brien *et al.*, 2000] à l'aide d'un Fluoroskan Ascent F1™ (Labsystems) à des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 530 et 590 nm, respectivement. Le pourcentage de survie a été calculé à partir de la courbe de la concentration en fonction du pourcentage de survie défini comme la fluorescence dans les puits expérimentaux comparés aux puits contrôles après soustraction du blanc. Chaque expérience a été effectuée trois fois d'une manière indépendante en triplicata.

Évaluation de l'activité hémolytique

Le sang de mouton (Laboratoire Quelab, Montréal, QC, Canada) a premièrement été centrifugé à 3 000 RPM pendant 5 min et a ensuite été suspendu dans le PBS afin d'obtenir une solution contenant 1% d'érythrocytes (globules rouges). Le glucuronide **217** a été dissous dans un mélange DMSP/PBS 5:1 à une concentration de $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Le gradient de concentration a été préparé à l'intérieur d'un intervalle allant de 500 à $3,9 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Un volume de 160 μL de la solution à 1% d'érythrocytes a été ajouté dans des microplaques à 96 puits (Costar, Corning Inc.) et un volume de 40 μL de l'échantillon ou de la solution contrôle (Saponin mixture, Sigma-Aldrich, Canada) a été ajouté afin d'obtenir une concentration finale de 0,8% en érythrocytes et un gradient de concentration allant de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ à $0,78 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Les microplaques ont été incubées et agitées pendant 60 min à 37 °C. Les microplaques ont ensuite été centrifugées à 3 000 RPM pendant 5 min, après quoi le surnageant a été transféré dans des microplaques vides. L'absorbance du surnageant

a été mesuré à 540 nm avec un appareil de type Varioskan (Thermo, Waltham, MA, USQ). Chaque expérience a été réalisée deux fois en triplicate. La dose causant 50% d'hémolyse (HD_{50}) a été calculée en comparaison avec 100% d'hémolyse causée par la plus haute concentration en saponines (Sigma-Aldrich, Canada).

Stabilité dans le tampon phosphate

Une solution contenant $158 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (1 mg/10 mL) du glucuronide **217** dans le tampon phosphate ($0,02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; pH 7,2) est passée aux ultrasons, agitée et incubée à 37 °C. Des aliquots (200 μL) sont pipetés à différents temps (24 h, 48 h et 72 h) et analysés par HPLC analytique munie d'une colonne de C_{18} en phase inverse ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$). Les produits sont visualisés à l'aide du détecteur UV à 210 nm.

Hydrolyse enzymatique

Une solution contenant $158 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (1 mg/10 mL) du glucuronide **217** dans le tampon phosphate ($0,02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; pH 7,2) est passée aux ultrasons, agitée et incubée à 37 °C. Après 24 h, la solution est filtrée et mise en présence de l'enzyme β -D-glucuronidase ($43 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) provenant d'*Escherichia coli*. Par la suite, des aliquots (200 μL) sont pipetés à différents temps (0, 50, 105, 165, 225, 285, 345 et 1 440 min) et analysés par HPLC analytique munie d'une colonne de C_{18} en phase inverse ($\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$). Les produits sont visualisés à l'aide du détecteur UV à 210 nm.

RÉFÉRENCES

- Baglin, I.; Poumaroux, A.; Nour, M.; Tan, K.; Mitaine-Offer, A. C.; Lacaille-Dubois, M. A.; Chauffert, B.; Cavé, C. New ursolic and betulinic derivatives as potential cytotoxic agents. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2003**, *18*, 111-117.
- Bliard, C.; Massiot, G.; Nazabadioko, S. Glycosylation of acids under phase transfer conditions. Partial synthesis of saponins. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 6107-6108.

- Bosslet, K.; Straub, R.; Blumrich, M.; Czech, J.; Gerken, M.; Sperker, B.; Kroemer, H. K.; Gesson, J.-P.; Koch, M.; Monneret, C. Elucidation of the mechanism enabling tumor selective prodrug monotherapy. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 1195-1201.
- Bowkett, E. R.; Harding, J. R.; Maggs, J. L.; Park, B. K.; Perrie, J. A.; Stachulski, A. V. Efficient synthesis of 1 β -*O*-acyl glucuronides via selective acylation of allyl or benzyl D-glucuronate. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 7596-7605.
- Chen, X.; Wu, B.; Wang, P. G. Glucuronides in anti-cancer therapy. *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents.* **2003**, *3*, 139-150.
- de Graaf, M.; Boven, E.; Scheeren, H. W.; Haisma, H. J.; Pinedo, H. M. Beta-glucuronidase-mediated drug release. *Curr. Pharm. Design* **2002**, *8*, 1391-1403.
- De Souza, M. V. N. TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidine-*N*-oxyl) an important reagent in alcohol oxidation and its application in synthesis of natural products. *Mini-Rev. Org. Chem.* **2006**, *3*, 155-165.
- Ferguson, J. R.; Harding, J. R.; Killick, D. A.; Lombard, K. W.; Scheinmann, F.; Stachulski, A. V. Putative metabolites of fulvestrant, an estrogen receptor downregulator. Improved glucuronidation using trichloroacetimidates. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **2001**, 3037-3041.
- Gauthier, C.; Legault, J.; Lebrun, M.; Dufour, P.; Pichette, A. Glycosidation of lupane-type triterpenoids as potent in vitro cytotoxic agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6713-6725.
- Gauthier, C.; Legault, J.; Girard-Lalancette, K.; Mshvildadze, V.; Pichette, A. Haemolytic activity, cytotoxicity, and membrane cell permeabilization of

semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins. Manuscript in preparation (2008).

Harding, J. R.; King, C. D.; Perrie, J. A.; Sinnott, D.; Stachulski, A. V. Glucuronidation of steroidal alcohols using iodosugar and imidate donors. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1501-1507.

Juteau, H.; Gareau, Y.; Labelle, M. A convenient synthesis of β -acyl glucuronides. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1481-1484.

Lin, F.; Peng, W.; Xu, W.; Han, X.; Yu, B. A facile preparation of uronates via selective oxidations with TEMPO/KBr/Ca(OCl)₂ under aqueous conditions. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 1219-1223.

O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5421-5426.

Perrie, J. A.; Harding, J. R.; Holt, D. W.; Johnston, A.; Meath, P.; Stachulski, A. V. Effective synthesis of 1β -acyl glucuronides by selective acylation. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2591-2594.

Shipkova, M.; William Armstrong, V.; Oellerich, M.; Wieland, E. Acyl glucuronides drug metabolites: Toxicological and analytical implications. *Ther. Drug Monit.* **2003**, *25*, 1-16.

Shipkova, M.; Wieland, E. Glucuronidation in therapeutic drug monitoring. *Clin. Chim. Acta* **2005**, *358*, 2-23.

- Sperker, B.; Backman, J. T.; Kroemer, H. K. The role of β -glucuronidase in drug disposition and drug targeting in humans. *Clin. Pharmacokinet.* **1997**, *33*, 18-31.
- Stachulski, A. V.; Jenkins, G. N. The synthesis of *O*-glucuronides. *Nat. Prod. Rep.* **1998**, *15*, 173-186.
- Stachulski, A. V.; Harding, J. R.; Lindon, J. C.; Maggs, J. L.; Park, B. K.; Wilson, I. D. Acyl glucuronides: Biological activity, chemical reactivity, and chemical synthesis. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6931-6945.
- Stachulski, A. V. The chemistry and biological activity of acyl glucuronides. *Curr. Opin. Drug Disc.* **2007**, *10*, 58-66.
- Wen, Z.; Stern, S. T.; Martin, D. E.; Lee, K.-H.; Smith, P. C. Structural characterization of anti-HIV drug candidate PA-457 [3-*O*-(3'-3'-dimethylsuccinyl)-betulinic acid] and its acyl glucuronides in rat bile and evaluation of in vitro stability in human and animal liver microsomes and plasma. *Drug Metab. Dispos.* **2006**, *34*, 1436-1442.
- Yang, X.-X.; Hu, Z.-P.; Boelsterli, U. A.; Zhou, S.-F. Drug acyl glucuronides: Reactivity and analytical implication. *Curr. Pharm. Anal.* **2006**, *2*, 259-277.

CHAPITRE 8

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSIONS

Le présent projet de doctorat constitue, d'une part, une contribution majeure en ce qui a trait à la synthèse de saponines triterpéniques de type lupane, et représente, d'autre part, une avancée scientifique importante pour le développement biopharmaceutique futur des saponines naturelles et semi-synthétiques en tant qu'agents anticancéreux. En termes de relations structure-activité, les résultats des différents chapitres de cette thèse indiquent clairement que l'activité inhibitrice de la croissance des cellules cancéreuses induite par les saponines à base d'acide bétulinique (**15**) et de bétulinol (**16**) est fortement modulée par la nature de la section osidique. En effet, que ce soit le type de sucre (D-glucose, L-rhamnose, L-arabinose, acide D-glucuronique, etc.), le nombre de liaisons à la génine (mono- et bidesmosides), la position de la section sucre sur le squelette lupane (C-3 et/ou C-28) et le type de ramification de la chaîne osidique (branchée ou linéaire), toutes ces modifications structurales recèlent une importance cruciale pour le potentiel anticancéreux des saponines de type lupane. De surcroît, à la lumière des résultats obtenus, il apparaît évident que la nature de l'aglycone ou génine triterpénique joue un rôle essentiel dans l'induction des activités anticancéreuse et hémolytique.

L'objectif principal des travaux de synthèse organique présentés au chapitre 3 consistait en la préparation de deux saponines naturelles isolées de plantes utilisées en médecine traditionnelle orientale, soit un monodesmoside et un bidesmoside à génine acide bétulinique (**15**) contenant à la position C-3 une section α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranose réputée pour accroître l'activité

anticancéreuse des triterpènes de type oléanane. Les saponines ont été obtenues à partir de l'allyle bétulinate (**204**) dans des rendements globaux de 10% pour le monodesmoside et de 27% pour le bidesmoside selon une approche de glycosylation linéaire impliquant huit étapes de synthèse. Par ailleurs, dans le cadre de ce projet, six autres saponines non-naturelles à génine acide bétulinique (**15**) et bétulinol (**16**) contenant des sections L-arabinofuranose et -pyranose ont également été préparées avec d'excellents rendements. Le choix judicieux des différents groupements protecteurs, sucres donneurs activés et conditions de glycosylation s'est avéré essentiel à l'atteinte des objectifs fixés. Tandis que les données physico-chimiques (RMN, HRMS et $[\alpha]_D$) mesurées pour la saponine naturelle monodesmosidique concordait avec celles de la molécule isolée des racines *P. koreana*, celles du bidesmoside ne concordait pas. Par conséquent, une analyse RMN à haut champ (700 MHz) a permis de confirmer la structure de la saponine bidesmosidique synthétique qui s'est avérée différente de la molécule isolée des feuilles de *S. rotundifolia*. De plus, les analyses RMN ont permis de constater l'instabilité conformationnelle typique du L-arabinopyranose oscillant entre les conformères chaises 4C_1 et 1C_4 lorsque substitué en position 2' par un groupement stériquement encombré telle qu'une section L-rhamnopyranose. Malheureusement, l'évaluation de la cytotoxicité de ces composés sur différentes lignées cellulaires cancéreuses (chapitre 5) a montré que, contrairement aux génines de type acide oléanolique, la présence de sections α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -L-Arap ou α -L-Araf en position C-3 a un impact négatif sur la cytotoxicité des génines de type lupane. Une seule exception concerne l'acide 3 β -O- α -L-arabinopyranoside bétulinique qui a démontré un profil de cytotoxicité similaire à celui du triterpène correspondant sur des lignées cellulaires humaines du cancer du poumon et du côlon ($IC_{50} = 11-12 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Ces résultats biologiques préliminaires ainsi que ceux obtenus dernièrement par un groupe de recherche tchèque [Cmoch *et al.*, 2008] semblent indiquer que les sections osidiques très polaires à la position C-3 contenant plus d'une unité osidique diminuent drastiquement l'activité cytotoxique des triterpènes de type lupane.

Les travaux présentés au chapitre 4 de cette thèse relataient la synthèse et l'évaluation de l'activité anticancéreuse de plusieurs saponines bidesmosidiques à génine acide bétulinique (**15**) et bétulinol (**16**). Ainsi, une série de huit bidesmosides dont une molécule naturelle ont facilement été préparés dans de très bons rendements à l'échelle du laboratoire par l'utilisation judicieuse de différentes procédures de glycosylation telles que la méthode inverse de Schmidt et les conditions de glycosylation par transfert de phase. L'étude des relations structure-activité établie à la suite de ces travaux suggère que certaines saponines bidesmosidiques de type lupane peuvent être considérées en tant qu'agents antitumoraux potentiels contre les types de cancer les plus prévalents chez l'homme. Plus particulièrement, le bétulinol 3,28-*O*-bis- α -L-rhamnopyranoside s'est révélé un puissant anticancéreux inhibant très fortement la croissance des cellules cancéreuses ($IC_{50} = 1,7-1,9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) avec une efficacité près de 10 fois supérieure à l'acide bétulinique (**15**) ce qui en fait la molécule la plus cytotoxique de tous les triterpènes et saponines testées dans le cadre de cette thèse (chapitre 5). Une telle augmentation de l'activité anticancéreuse en lien avec la présence de sections sucres de type L-rhamnose a déjà été rapportée dans la littérature pour certains glycosides stéroïdiques [Cham *et al.*, 1990]. Ces résultats suggèrent fortement que les membranes des cellules cancéreuses pourraient contenir des récepteurs protéiques tels que des lectines hautement glycosylées spécifiques aux sections L-rhamnose, ce qui faciliterait la diffusion de la saponine à l'intérieur du cytoplasme avant l'induction de l'apoptose cellulaire [Wang *et al.*, 2007]. Afin de tester cette hypothèse, il serait intéressant d'évaluer la cytotoxicité de la saponine après un traitement préalable des cellules cancéreuses avec différentes concentrations de L-rhamnose. Ainsi, une activité cytotoxique moindre ou nulle signifierait que les récepteurs sont saturés et qu'ils ne peuvent donc plus se lier à la partie sucre de la saponine. Cette expérience relativement simple permettrait donc de démontrer la présence de substrats protéiques membranaires spécifiques aux sections L-rhamnose.

La forte activité hémolytique des saponines est un frein majeur à leur développement biopharmaceutique. À cet effet, le principal objectif des travaux rapportés au chapitre 5 consistait à évaluer l'activité hémolytique d'une série de saponines triterpéniques de type lupane semi-synthétiques en comparaison avec certaines saponines de type

oléanane tels que l' α -hédérine (**28**), la β -hédérine (**38**) et l'hédéracolchiside A₁ (**45**), molécules naturelles réputées pour leur fort pouvoir hémolytique. Les résultats ont révélé que les saponines de type lupane, tout comme leurs homologues triterpéniques, n'induisent pas la lyse des globules rouges (érythrocytes) à des concentrations supérieures à 100 μM , et ce, indépendamment de la nature de la ou des section(s) osidique(s). Ces résultats prometteurs sont donc très encourageants pour l'utilisation clinique des saponines triterpéniques de type lupane en tant qu'agents antitumoraux. Toutefois, des exceptions subsistent pour certaines saponines à génine acide bétulinique porteuses de sections $\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-L-Arap}$ ou $\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow\text{2)-}[\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow\text{4)]-}\alpha\text{-L-Arap}$ à la position C-3 ainsi que pour l'acide 3,28-*O*-bis- $\alpha\text{-L-rhamnopyranoside}$ bétulinique. Quoique faible, leur pouvoir hémolytique ($\text{HD}_{50} = 78\text{-}94 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) semble donc corrélé avec la présence de ces sections sucres particulières. Lors de cette étude, l'action perméabilisante des membranes cellulaires par les saponines a également été évaluée. Il est très intéressant de constater qu'il y a une corrélation directe ($P < 0,05$) entre les activités cytotoxique et hémolytique des saponines naturelles de type oléanane et leur capacité à perméabiliser les membranes cellulaires. En revanche, en ce qui concerne les saponines de type lupane, aucune d'entre elles n'a été en mesure de perméabiliser la membrane des cellules cancéreuses ($\text{IC}_{50} > 200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). L'activité anticancéreuse des saponines de type lupane ne semble donc pas liée à un mécanisme faisant intervenir la formation de pores au sein des membranes cellulaires comme c'est le cas pour l'hédéracolchiside A₁ (**45**) [Mazzucchelli *et al.*, 2008]. Une étude en cours dans notre laboratoire a montré que, tout comme l'acide bétulinique (**15**), le mécanisme d'action du bétulinol 3,28-*O*-bis- $\alpha\text{-L-rhamnopyranoside}$ est directement lié à l'induction de l'apoptose cellulaire. En effet, des changements morphologiques cellulaires caractéristiques de l'apoptose ainsi que le clivage de facteurs apoptotiques tels que le PARP et la caspase 3 ont été mesurés après traitement des cellules cancéreuses avec ce bidesmoside.

La dioscine (**24**), une saponine stéroïdique bioactive utilisée en médecine traditionnelle orientale, contient une portion trisaccharidique particulière à la position

C-3 nommée α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]- β -D-glucopyranoside ou chacotriose. L'objectif des travaux décrits dans le chapitre 6 consistait donc à préparer des saponines triterpéniques à génine acide bétulinique (15), bétulinol (16) et lupéol (17) contenant cette section trisaccharidique branchée particulière afin d'évaluer leurs activités anticancéreuse et hémolytique. Les saponines ont été synthétisées selon une approche de glycosylation linéaire impliquant la protection régiosélective des alcools en positions 3' et 6' de la section glucose suivie du couplage subséquent avec deux unités rhamnoses via la méthode inverse de Schmidt. Les résultats ont montré que, comme c'était le cas pour les saponines contenant une section α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -L-Arap (chapitre 3), l'ajout d'une section chacotriosidique hautement polaire en position C-3 du squelette lupane a un impact négatif sur l'activité anticancéreuse des triterpènes ($IC_{50} > 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). En revanche, les dérivés de réarrangement également obtenus lors de ce projet, c'est-à-dire les chacotriosides d'allobétulinol et de 28-oxoallobétulinol, ont exercé une forte activité inhibitrice envers la croissance des cellules cancéreuses du poumon, du côlon, du sein et de la prostate ($IC_{50} = 10\text{-}18 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). De plus, contrairement aux saponines de type lupane, le chacotrioside de 28-oxoallobétulinol s'est révélé fortement hémolytique ($HD_{50} = 8,0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). L'ensemble de ces résultats indiquent donc que les activités anticancéreuse et hémolytique des saponines sont grandement influencées à la fois par la nature de la génine triterpénique et de la section osidique branchée en position C-3. Il serait très intéressant de vérifier si le chacotriose de 28-oxoallobétulinol induit la mort de cellules cancéreuses par un mécanisme apoptotique ou plutôt, comme les résultats le laissent entendre, par l'action de la saponine sur la membrane cellulaire.

La préparation des métabolites acyl-glucuronides de drogues contenant des acides carboxyliques est une étape nécessaire à leur développement biopharmaceutique. En effet, plusieurs études ont démontré que les acyls glucuronides de molécules contenant un acide carboxylique sont des composés chimiquement très réactifs qui peuvent être à l'origine de nombreux effets secondaires [Stachulski *et al.*, 2006]. Ainsi, après plusieurs essais infructueux (chapitre 7), la synthèse de l'acide 28-O- β -

D-glucuronide bétulinique (**217**) a été réalisée avec succès (68%, deux étapes) par l'utilisation des conditions réactionnelles de transfert de phase. Cette méthodologie de synthèse pourrait être appliquée ultérieurement pour la préparation des métabolites glucuronidés du bevirimat (**214-216**), un agent anti-HIV prometteur à squelette lupane présentement en phase clinique, ou autres drogues contenant un ou des acide(s) carboxylique(s). Par ailleurs, il est connu que certains glucuronides peuvent être utilisés en tant que prodrogues activées sélectivement au niveau du tissu tumoral en raison de l'activité plus élevée de l'enzyme β -D-glucuronidase dans les zones nécrotiques des tumeurs [Chen *et al.*, 2003]. À cet égard, les résultats présentés au chapitre 7 ont montré que l'acyl glucuronide **217** pourrait être un candidat intéressant en tant que prodrogue selon certains critères spécifiques à la stratégie PMT. En effet, la molécule possède une très bonne stabilité dans le tampon phosphate, une hydrosolubilité supérieure à l'acide bétulinique, elle est non cytotoxique et non hémolytique, et constitue un bon substrat libérant l'aglycone cible en présence de l'enzyme β -D-glucuronidase. Il est toutefois évident que de futures études *in vivo* sur un modèle de souris porteuses de tumeurs murines ou humaines seront nécessaires afin de prouver l'efficacité de l'acide 28-O- β -D-glucuronide bétulinique (**217**) en tant que prodrogue anticancéreuse.

En terminant, il est clair que les résultats prometteurs de ces travaux de recherche pavent la voie à de futures études dans le domaine des saponines triterpéniques et autres produits naturels glycosylés. Par exemple, en se basant sur les méthodologies développées et sur les principales conclusions tirées à la suite des études de relations structure-activité, la synthèse de plusieurs dérivés glycosylés de produits naturels hydroxylés tels que des sesquiterpènes, diterpènes, triterpènes et flavonoïdes seraient très certainement envisageables. D'ailleurs, de récents travaux réalisés au laboratoire LASEVE ont révélé que l'activité cytotoxique de l' α -bisabolol, un alcool sesquiterpénique naturel, est significativement augmentée après l'ajout d'une section osidique de type L-rhamnose. De surcroît, les stratégies de synthèse développées lors de ce projet pourraient permettre la préparation à plus grande échelle de saponines à haut potentiel pharmacologique à partir du bétulinol extrait des écorces de bouleau.

Ainsi, des études approfondies concernant le mécanisme d'action, les propriétés pharmacocinétiques et le potential antitumoral *in vivo* des saponines les plus prometteuses pourraient être entreprises. L'obtention d'une grande quantité de saponines sous une forme pure et à faible coût permettrait donc d'accélérer drastiquement le développement biopharmaceutique de cette importante classe de produits naturels. Il est de l'avis de l'auteur de cette thèse que, suite aux nombreuses études réalisées ou en cours dans ce domaine, l'approbation clinique et la commercialisation des saponines en tant qu'agents thérapeutiques devraient aboutir dans les prochaines années.

LISTE DES PUBLICATIONS

10. **Gauthier, C.**; Legault, J.; Piochon, M.; Tremblay, S.; Pichette, A. Synthesis, cytotoxicity, and haemolytic activity of chacotrioside lupane-type neosaponins and their germanicane-type rearrangement products. À soumettre à *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*.
9. **Gauthier, C.**; Legault, J.; Girard-Lalancette K.; Mshvildadze, V.; Pichette, A. Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins. À soumettre à *Biochimica & Biophysica Acta*.
8. **Gauthier, C.**; Legault, J.; Rondeau, S.; Pichette, A. Synthesis of Betulinic Acid Acyl Glucuronide for Application in Anticancer Prodrug Monotherapy. Soumis à *Tetrahedron Letters* le 14 novembre 2008 (#TETL-D-08-03181).
7. **Gauthier, C.**; Legault, J.; Pichette, A. Recent Progress in the Synthesis of Naturally Occurring Triterpenoid Saponins. Soumis à *Mini-Reviews in Organic Chemistry* le 28 octobre 2008.
6. **Gauthier, C.**; Legault, J.; Lavoie, S.; Rondeau, S.; Tremblay, S.; Pichette, A. Synthesis and Cytotoxicity of Bidesmosidic Betulin and Betulinic Acid Saponins. Accepté dans *Journal of Natural Products* (#np-2008-00579x).
5. **Gauthier, C.**; Legault, J.; Lavoie, S.; Rondeau, S.; Tremblay, S.; Pichette, A. Synthesis of Two Natural Betulinic Acid Saponins Containing α -L-Rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-Arabinopyranose and their Analogues. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 7386-7399.

4. Thibeault*, D.; **Gauthier***, C.; Legault, J.; Bouchard, J.; Dufour, P.; Pichette, A. Synthesis and structure-activity relationships study of cytotoxic germanicane- and lupane-type 3 β -O-monodesmosidic saponins starting from betulin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, *15*, 6144-6157. (*Ces auteurs ont contribué également au travail)
3. **Gauthier, C.**; Legault, J.; Lebrun, M.; Dufour, P.; Pichette, A. Glycosidation of lupane-type triterpenoids as potent *in vitro* cytotoxic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2006**, *14*, 6713-6725.

LISTE DES BREVETS

2. Pichette, A.; Legault, J.; **Gauthier, C.** Bidesmosidic betulin and betulinic acid derivatives and uses thereof as antitumor agents. USPTO Patent Application. Demande déposée le 10 septembre **2008** (#61/095815).
1. Pichette, A.; Legault, J.; **Gauthier, C.** Triterpene derivatives and uses thereof as antitumor or anti-inflammatory agents. Canadian and United States Patent Application, **2008**, 73 pp.

RÉFÉRENCES

- Agrawal, P. K.; Jain, D. C.; Gupta, R. K.; Thakur, R. S. Carbon-13 NMR spectroscopy of steroidal saponins and steroidal saponins. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 2479-2496.
- Agrawal, P. K.; Jain, D. C. ¹³C NMR spectroscopy of oleanane triterpenoids. *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.* **1992**, *24*, 1-90.
- Agrawal, P. K.; Pathak, A. K. Nuclear magnetic resonance spectroscopic approaches for the determination of interglycosidic linkage and sequence in oligosaccharides. *Phytochem. Anal.* **1996**, *7*, 113-130.
- Atopkina, L. N.; Denisenko, V. A.; Uvarova, N. I.; Elyakov, G. B. Semisynthetic analogues of ginsenosides, glycosides from ginseng. *Carbohydr. Res.* **1988**, *177*, 101-109.
- Baglin, I.; Mitaine-Offer, A.-C.; Nour, M.; Tan, K.; Cavé, C.; Lacaille-Dubois, M.-A. A review of natural and modified betulinic, ursolic and echinocystic acid derivatives as potential antitumor and anti-HIV agents. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2003a**, *3*, 159-165.
- Baglin, I.; Poumaroux, A.; Nour, M.; Tan, K.; Mitaine-Offer, A. C.; Lacaille-Dubois, M. A.; Chauffert, B.; Cavé, C. New ursolic and betulinic derivatives as potential cytotoxic agents. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2003b**, *18*, 111-117.
- Bang, S.-C.; Kim, Y.; Lee, J.-H. ; Ahn, B.-Z. Triterpenoid saponins from the roots of *Pulsatilla koreana*. *J. Nat. Prod.* **2005a**, *68*, 268-272.

- Bang, S.-C.; Lee, J.-H.; Song, G.-Y.; Kim, D.-H.; Yoon, M.-Y.; Ahn, B.-Z. Antitumor activity of *Pulsatilla koreana* saponins and their structure-activity relationship. *Chem. Pharm. Bull.* **2005b**, *53*, 1451-1454.
- Bang, S.-C.; Seo, H.-H.; Yun, H.-Y.; Jung, S.-H. Facile synthesis of trisaccharide moiety corresponding to antitumor activity in triterpenoid saponins isolated from *Pulsatilla* roots. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 1734-1739.
- Bang Son, L.; Kaplun, A. P.; Symon, A. V.; Shpilevsky, A. A. Solubilization of betulinic acid, a new antimelanoma compound. *Proceed. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* **1998**, *25*, 419-420.
- Barthomeuf, C.; Debiton, E.; Mshvildadze, V.; Kemertelidze, E.; Balansard, G. *In vitro* activity of hederacolchisid A₁ compared with other saponins from *Hedera colchica* against proliferation of human carcinoma and melanoma cells. *Planta Med.* **2002**, *68*, 672-675.
- Baumann, E.; Stoya, G.; Völkner, A.; Richter, W.; Lemke, C.; Linss, W. Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure. *Acta Histochem.* **2000**, *102*, 21-35.
- Bi, Y.; Xu, J.-Y.; Wu, X.-M. Advances in research of betulinic acids. *Chin. J. New Drugs* **2005**, *14*, 23-26.
- Bliard, C.; Massiot, G.; Nazabadioko, S. Glycosylation of acids under phase transfer conditions. Partial synthesis of saponins. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 6107-6108.
- Braca, A.; Autore, G.; De Simone, F.; Marzocco, S.; Morelli, I.; Venturella, F.; De Tommasi, N. Cytotoxic saponins from *Schefflera rotundifolia*. *Planta Med.* **2004**, *70*, 960-966.

- Braca, A. ; Abdel-Razik, A. F.; Mendez, J.; De Tommasi, N. Triterpenoid saponins from *Campsiandra guayanensis*. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 240-246.
- Bradette-Hébert, M.-E.; Legault, J.; Lavoie, S.; Pichette, A. A new labdane diterpene from the flowers of *Solidago canadensis*. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, *56*, 82-84.
- Bruneton, J. In *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales*; Éditions Technique & Documentation: Paris, 1995.
- Butler, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 2141-2153.
- Cham, B. E.; Daunter, B. Solasodine glycosides. Selective cytotoxicity for cancer cells and inhibition of cytotoxicity by rhamnose in mice with sarcoma 180. *Cancer Lett.* **1990**, *55*, 221-225.
- Chang, S.-Y.; Yook, C.-S.; Nohara, T. Lupane-triterpene glycosides from leaves of *Acanthopanax koreanum*. *Phytochemistry* **1999**, *50*, 1369-1374.
- Chari, V. M.; Neelakantan, S.; Seshadri, T. R. Chemical components of *Betula utilis* & *Celtis australis*. *Indian J. Chem.* **1968**, *6*, 231-234.
- Chatterjee, P.; Pezzuto, J. M.; Kouzi, S. A. Glucosidation of betulinic acid by *Cunninghamella* species. *J. Nat. Prod.* **1990**, *62*, 761-763.
- Chen, X.; Wu, B.; Wang, P. G. Glucuronides in anti-cancer therapy. *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents.* **2003**, *3*, 139-150.
- Cheng, M.-S.; Yan, M.-C.; Liu, Y.; Zheng, L.-G.; Liu, J. Synthesis of β -hederin and Hederacolchiside A₁: triterpenoid saponins bearing a unique cytotoxicity-inducing disaccharide moiety. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 60-67.

- Cheng, S. Du, Y.; Bing, F.; Zhang, G. Synthesis of flaccidoside II, a bidesmosidic triterpene saponin isolated from Chinese folk medicine Di Wu. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 462-469.
- Chwalek, M.; Lalun, N.; Bobichon, H.; Plé, K.; Voutquenne-Nazabadioko, L. Structure-activity relationships of some hederagenin diglycosides: Haemolysis, cytotoxicity and apoptosis induction. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1760*, 1418-1427.
- Cichewicz, R. H.; Kouzi, S. A. Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. *Med. Res. Rev.* **2004**, *24*, 90-114.
- Cioffi, G.; Braca, A.; Autore, G.; Morelli, I.; Pinto, A.; Venturella, F.; De Tommasi, N. Cytotoxic saponins from *Schefflera fagueti*. *Planta Med.* **2003**, *69*, 750-756.
- Cmoch, P.; Pakulski, Z.; Swaczynová, J.; Strnad, M. Synthesis of lupane-type saponins bearing mannosyl and 3,6-branched trimannosyl residues and their evaluation as anticancer agents. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 995-1003.
- Cragg, G. M.; Newman, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *100*, 72-79.
- Csuk, R.; Schmuck, K.; Schäfer, R. A practical synthesis of betulinic acid. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6769-6770.
- da Rocha, A. B.; Lopes, R. M.; Schwartzmann, G. Natural products in anticancer therapy. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2001**, *1*, 364-369.
- Debiton, E.; Borel, M.; Communal, Y.; Mshvildadze, V.; Barthomeuf, C. In addition to membrane injury, an affinity for melanin might be involved in the high

sensitivity of human melanoma cells to hederacolchiside A1. *Melanoma Res.* **2004**, *14*, 97-105.

Deng, S.; Yu, B.; Hui, Y.; Yu, H.; Han, X. Synthesis of three diosgenyl saponins: dioscin, polyphyllin D, and balanitin 7. *Carbohydr. Res.* **1999a**, *317*, 53-62.

Deng, S.; Yu, B.; Xie, J.; Hui, Y. Highly efficient glycosylation of sapogenins. *J. Org. Chem.* **1999b**, *64*, 7265-7266.

de Oliveira, B. H.; Santos, C. A. M.; Espíndola, P. D. M. Determination of the triterpenoid, betulinic acid, in *Doliocarpus schottianus* by HPLC. *Phytochem. Anal.* **2002**, *13*, 95-98.

De Tommasi, N.; Pizza, C. Triterpenoid saponins from *Schefflera divaricata*. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 663-668.

Dufour, D.; Pichette, A.; Mshvildadze, V.; Bradette-Hébert, M.-E.; Lavoie, S.; Longtin, A.; Laprise, C.; Legault, J. Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Ledum groenlandicum* Retzius. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *111*, 22-28.

Dzubak, P.; Hajduch, M.; Vydra, D.; Hustova, A.; Kvasnica, M.; Biedermann, D.; Markova, L.; Urban, M.; Sarek, J. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 394-411.

Eiznhamer, D. A.; Xu, Z.-Q. Betulinic acid: A promising anticancer candidate. *IDrugs* **2004**, *7*, 359-373.

Elbandy, M.; Miyamoto, T.; Chauffert, B.; Delaude, C.; Lacaille-Dubois, M. A. Novel acylated triterpene glycosides from *Muraltia heisteria*. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 193-197.

- Eleutério, M. I. P.; Schimmel, J.; Ritter, G.; do Céu Costa, M.; Schmidt, R. R. Synthesis of saponins with allobetulin and glycyrrhetic acid as aglycones. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 5293-5304.
- Evers, M.; Poujade, C.; Soler, F.; Ribeill, Y.; James, C.; Lelièvre, Y.; Gueguen, J.-C.; Reisdorf, D.; Morize, I.; Pauwels, R.; De Clercq, E.; Hénin, Y.; Bousseau, A.; Mayaux, J.-F.; Le Pecq, J.-B.; Dereu, N. Betulinic acid derivatives: A new class of human immunodeficiency virus type 1 specific inhibitors with a new mode of action. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1056-1068.
- Flekther, O. B.; Baltina, L. A.; Tolstikov, G. A. Glycals in the stereoselective synthesis of triterpene 2-deoxy- α -L-glycosides under conditions of acidic catalysis. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 992-994.
- Flekther, O. B.; Medvedeva, N. I.; Tret'yakova, E. V.; Galin, F. Z.; Tolstikov, G. A. Synthesis of methyl esters of betulinic acid 2-deoxy- α -glycosides and 28-oxo-19,28-epoxyoleanane. *Chem. Nat. Compd.* **2006**, *42*, 706-709.
- Francis, G.; Kerem, Z.; Makkar, H. P. S.; Becker, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Brit. J. Nutr.* **2002**, *88*, 587-605.
- Fuchino, H.; Konishi, S.; Satoh, T.; Yagi, A.; Saitsu, K.; Tatsumi, T.; Tanaka, N. Chemical evaluation of *Betula* species in Japan. II. Constituents of *Betula platyphylla* var. *japonica*. *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, *44*, 1033-1038.
- Fuchino, H.; Satoh, T.; Shimizu, M.; Tanaka, N. Chemical evaluation of *Betula* species in Japan. IV. Constituents of *Betula davurica*. *Chem. Pharm. Bull.* **1998a**, *46*, 166-168.

- Fuchino, H.; Satoh, T.; Yokochi, M.; Tanaka, N. Chemical evaluation of *Betula* species in Japan. V. Constituents of *Betula ovalifolia*. *Chem. Pharm. Bull.* **1998b**, *46*, 169-170.
- Fuchino, H.; Satoh, T.; Hida, J.; Terada, M.; Tanaka, N. Chemical evaluation of *Betula* species in Japan. VI. Constituents of *Betula schmidtii*. *Chem. Pharm. Bull.* **1998c**, *46*, 1051-1053.
- Fujioka, T.; Kashiwada, Y.; Kilkuskie, R. E.; Cosentino, L. M.; Ballas, L. M.; Jiang, J. B.; Janzen, W. P.; Chen, I.-S.; Lee, K.-H. Anti-AIDS agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzygium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 243-247.
- Fulda, S.; Scaffidi, C.; Susin, S. A.; Krammer, P. H.; Kroemer, G.; Peter, M. E.; Debatin, K.-M. Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 33942-33948.
- Fulda, S.; Jeremias, I.; Steiner, H. H.; Pietsch, T.; Debatin, K.-M. Betulinic acid: A new cytotoxic agent against malignant brain-tumor cells. *Int. J. Cancer* **1999**, *82*, 435-441.
- Fulda, S.; Debatin, K.-M. Betulinic acid induces apoptosis through a direct effect on mitochondria in neuroectodermal tumors. *Med. Pediatr. Oncol.* **2000**, *35*, 616-618.
- Fulda, S.; Debatin, K.-M. Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by betulinic acid. *Neoplasia* **2005**, *7*, 162-170.
- Gaidi, G.; Miyamoto, T.; Lacaille-Dubois, M. A. Junceosides A-C, new triterpene saponins from *Arenaria juncea*. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1533-1537.

- Galgon, T.; Höke, D.; Dräger, B. Identification and quantification of betulinic acid. *Phytochem. Anal.* **1999**, *10*, 187-190.
- Galgon, T.; Wohlrab, W.; Dräger, B. Betulinic acid induces apoptosis in skin cancer cells and differentiation in normal human keratinocytes. *Exp. Dermatol.* **2005**, *14*, 736-743.
- Gao, X.-D.; Ye, W.-C.; Yu, A. C. H.; Zhang, Y.; Tan, R.-X.; Li, M.; Wendy Hsiao, W. L. Pulsatilloside A and anemoside A₃ protect PC12 cells from apoptosis induced by sodium cyanide and glucose deprivation. *Planta Med.* **2003**, *69*, 171-174.
- García-Granados, A.; López, P. E.; Melguizo, E.; Parra, A.; Simeó, Y. Remote hydroxylation of methyl groups by regioselective cyclopalladation. Partial synthesis of hyptatic acid-A. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3500-3509.
- Gauthier, C.; Legault, J.; Lebrun, M.; Dufour, P.; Pichette, A. Glycosidation of lupane-type triterpenoids as potent in vitro cytotoxic agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2006a**, *14*, 6713-6725.
- Gauthier, C. Glycosidation de triterpènes pentacycliques de type lupane et évaluation *in vitro* de leur potentiel anticancéreux. Mémoire de maîtrise en ressources renouvelables, Université du Québec à Chicoutimi, **2006b**, 219 pp.
- Gauthier, C.; Pichette, A. Recent progress in the synthesis of naturally occurring triterpenoid saponins. Soumis à *Mini-Rev. Org. Chem.* **2008a**.
- Gauthier, C.; Legault, J.; Lavoie, S.; Rondeau, S.; Tremblay, S.; Pichette, A. Synthesis of two natural betulinic acid saponins containing α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranose and their analogues. *Tetrahedron* **2008b**, *64*, 7386-7399.

- Gauthier, C.; Legault, J.; Lavoie, S.; Rondeau, S.; Tremblay, S.; Pichette, A. Synthesis and cytotoxicity of bidesmosidic betulin and betulinic acid saponins. Accepted dans *J. Nat. Prod.* **2008c** (#np-2008-000579x).
- Gauthier, C.; Legault, J.; Rondeau, S.; Pichette, A. Synthesis of betulinic acid acyl glucuronide for application in anticancer prodrug monotherapy. Soumis à *Tetrahedron Lett.* **2008d** (#TETL-D-08-03181).
- Gerken, P. C.; Dobson, R.; Tabatadze, N.; Mshvildadze, V.; Elias, R.; Peulen, O. J.; Jolois, O. M.; De Pauw-Gillet, M.-C. A. Apoptosis and cytolysis induced by giganteosides and hederacolchisides in HL-60 cells. *Anticancer Res.* **2007**, *27*, 2529-2534.
- Glebko, L. I.; Krasovskaj, N. P.; Strigina, L. I.; Ulanova, K. P.; Denisenko, V. A.; Dmitrenok, P. S. Triterpene glycosides from *Pulsatilla chinensis*. *Russ. Chem. B.* **2002**, *51*, 1945-1950.
- Gu, J.-Q.; Wang, Y.; Franzblau, S. G.; Montenegro, G.; Timmermann, B. N. Dereplication of pentacyclic triterpenoids in plants by GC-EI/MS. *Phytochem. Anal.* **2006**, *17*, 102-106.
- Habiyaremye, I.; Stevanovic-Janezic, T.; Riedl, B.; Garneau, F.-X. G.; Jean, F.-I. Pentacyclic triterpene constituents of yellow birch bark from Quebec. *J. Wood Chem. Technol.* **2002**, *22*, 83-91.
- Haridas, V.; Higuchi, M.; Jayatilake, G. S.; Bailey, D.; Mujoo, K.; Blake, M. E.; Arntzen, C. J.; Gutterman, J. U. Avicins: Triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth) induce apoptosis by mitochondrial perturbation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 5821-5826.

- Harinantenaina, L.; Kasai, R.; Yamasaki, K. Cussosaponins A-E, triterpene saponins from the leaves of *Cussonia racemosa*, a Malagasy endemic plant. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 1290-1293.
- Hayek, E. W. H.; Jordis, U.; Moche, W.; Sauter, F. A bicentennial of betulin. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 2229-2242.
- Hu, M.; Konoki, K.; Tachibana, K. Cholesterol-independent membrane disruption caused by triterpenoid saponins. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1299*, 252-258.
- Huang, L.; Ho, P.; Lee, K.-H.; Chen, C.-H. Synthesis and anti-HIV activity of bi-functional betulinic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2279-2289.
- Inanaga, J.; Hirata, K.; Saeki, H.; Katsuki, T.; Yamaguchi, M. A rapid esterification by mixed anhydride and its application to large-ring lactonization. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1979**, *52*, 1989-1993.
- Jäger, S.; Winkler, K.; Pfüller, U.; Scheffler, A. Solubility studies of oleanolic acid and betulinic acid in aqueous solutions and plant extracts of *Viscum album* L. *Planta Med.* **2007**, *73*, 157-162.
- Jain, S. A.; Srivastava, S. K. Betulin-3 β -O- β -D-xylopyranoside from the roots of *Amoora rohituka*. *Indian J. Pharm. Sci.* **1984**, 161-162.
- Jean, F.-I. Analyse de produits naturels de *Taxus canadensis*. Mémoire de maîtrise en ressources renouvelables, UQAC, **1992**, 104 pp.
- Jemal, A.; Siegel, R.; Ward, E.; Murray, T.; Xu, J.; Smigal, C.; Thun, M. J. Cancer statistics, 2006. *A Cancer Journal for Clinicians.* **2006**, 106-130.

- Jeong, H.-J.; Chai, H.-B.; Park, S.-Y.; Kim, D. S. H. L. Preparation of amino acid conjugates of betulinic acid with activity against human melanoma. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1201-1204.
- Jiang, L.; Chan, T.-H. Regioselective acylation of hexopyranosides with pivaloyl chloride. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6035-6038.
- Jung, G.-R.; Kim, K.-J.; Choi, C.-H.; Lee, T.-B.; Han, S. I.; Han, H.-K.; Lim, S.-C. Effect of betulinic acid on anticancer drug-resistant colon cancer cells. *Basic Clin. Pharmacol.* **2007**, *101*, 277-285.
- Just, M. J.; Recio, M. C.; Giner, R. M.; Cuéllar, M. J.; Mánez, S.; Bilia, A. R.; Ríos, J.-L. Anti-inflammatory activity of unusual lupane saponins from *Bupleurum fruticosens*. *Planta Med.* **1998**, *64*, 404-407.
- Kashiwada, Y.; Hashimoto, F.; Cosentino, L. M.; Chen, C.-H.; Garrett, P. E.; Lee, K.-H. Betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives as potent anti-HIV agents. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1016-1017.
- Kessler, J. H.; Mullauer, F. B.; de Roo, G. M.; Medema, J. P. Broad in vitro efficacy of plant-derived betulinic acid against cell lines derived from the most prevalent human cancer types. *Cancer Lett.* **2007**, *25*, 132-145.
- Kim, D. S. H. L.; Chen, Z.; Nguyen, V. T.; Pezzuto, J. M.; Qiu, S.; Lu, Z.-Z. A concise semi-synthetic approach to betulinic acid from betulin. *Synthetic Commun.* **1997**, *27*, 1607-1612.
- Kim, J.-H.; Yang, H.; Park, J.; Boons, G.-I. A general strategy for stereoselective glycosylations. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12090-12097.
- Kim, Y.-J.; Wang, P.; Navarro-Villalobos, M.; Rohde, B. D.; Derryberry, J.; Gin, D. Y. Synthetic studies of complex immunostimulants from *Quillaka saponaria*:

Synthesis of the potent clinical immunoadjuvant QS-21A_{api}. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11906-11915.

Kitajima, J.; Tanaka, Y. Two new triterpenoid glycosides from the leaves of *Schefflera octophylla*. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 2727-2730.

Klinotová, E.; Křeček, V.; Klinot, J.; Endová, M.; Eisenreichová, J.; Buděšínský, M.; Štícha, M. Glycosylation of triterpene alcohols and acids of the lupane and a-secolupane series. *Collect. Czech. Chem. C.* **1997**, *62*, 1776-1798.

Koenigs, W.; Knorr, E. Some derivatives of grape sugars and galactose. *Ber.* **1901**, *34*, 957-981.

Koike, K.; Jia, Z.; Nikaido, T. New triterpenoid saponins and sapogenins from *Saponaria officinalis*. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1655-1659.

Kolomitsyn, I. V.; Holy, J.; Perkins, E.; Krasutsky, P. A. Analysis and antiproliferative activity of bark extractives of *Betula neoalaskana* and *B. papyrifera*. Synthesis of the most active extractive component – betulin 3-caffeate. *Nat. Prod. Commun.* **2007**, *2*, 17-26.

Krasutsky, P. A.; Carlson, R. M.; Nesterenko, V. V. US Patent 6,271,405, **2001**.

Krasutsky, P. A. Birch bark research and development. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 919-942.

Kvasnica, M.; Sarek, J.; Klinitova, E.; Dzubak, P.; Hajduch, M. Synthesis of phthalates of betulinic acid and betulin with cytotoxic activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3447-3454.

- Lacaille-Dubois, M. A. Biologically and pharmacologically active saponins from plants: recent advances. *Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal Plants*. Kluwer Academic Publishers, Pays-Bas, **2000**, 205-218.
- Lautrette, S.; Granet, R.; Krausz, P. A new method of solvent free *O*- and *N*-glycosylation using activated carbon fiber (ACF) as a promoter. Application to the synthesis of saponin and nucleoside analogues. *Chem. Commun.* **2004**, 586-587.
- Lee, K.-T.; Sohn, I.-C.; Park, H.-J.; Kim, D.-W.; Jung, G.-O.; Park, K.-Y. Essential moiety for antimutagenic and cytotoxic activity of hederagenin monodesmosides and bisdesmosides isolated from the stem bark of *Kalopanax pictus*. *Planta Med.* **2000**, *66*, 329-332.
- Lee, K.-H. Current developments in the discovery and design of new drug candidates from plant natural products leads. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 273-283.
- Lee, M.-S.; Yuet-Wa, J. C.; Kong, S.-K.; Yu, B.; Eng-Choon, V. O.; Nai-Ching, H. W.; Chung-Wai, T. M.; Fung, K.-P. Effects of polyphyllin D, a steroidal saponin in *Paris polyphylla*, in growth inhibition of human breast cancer cells and in xenograft. *Cancer Biol. Ther.* **2005**, *4*, 1248-1254.
- Legault, J.; Dahl, W.; Debiton, E.; Pichette, A.; Madelmont, J. C. Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by alpha-humulene as possible mechanism of action. *Planta Med.* **2003**, *69*, 402-407.
- Legault, J.; Pichette, A. Potentiating effect of beta-caryophyllene on anticancer activity of alpha-humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. *J. Pharm. Pharmacol.* **2007**, *59*, 1643-1647.
- Levy, D. E.; Fügedi, P. In *The Organic Chemistry of Sugars*. CRC Press: Boca Raton, 2006.

- Li, M.; Han, X.; Yu, B. Synthesis of monomethylated dioscin derivatives and their antitumor activities. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 117-121.
- Lin, F.; Peng, W.; Xu, W.; Han, X.; Yu, B. A facile preparation of uronates via selective oxidation with TEMPO/KBr/Ca(OCl)₂ under aqueous conditions. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 1219-1223.
- Liu, J.; Henkel, T. Traditional Chinese medicine (TCM): Are polyphenols and saponins the key ingredients triggering biological activities? *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 1483-1485.
- Liu, Y.; Zhao, D.-M.; Lu, X.-H.; Wang, H.; Chen, H.; Ke, Y.; Leng, L.; Cheng, M.-S. Synthesis of bisdesmosidic kryptogenyl saponins using the 'random glycosylation' strategy and evaluation of their antitumor activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 156-160.
- Marie-Victorin, F. Flore Laurentienne. 3^e Édition, Gaëtan Morin Éditeur ltée, Boucherville, **2002**, 1093 pp.
- Matsuya, Y.; Itoh, T.; Nemoto, H. Total synthesis of A-nor B-aromatic OSW-1 aglycon: A highly effective approach to optically active *trans*-4,5-benzhydrindane. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2221-2224.
- Mayaux, J.-F.; Bousseau, A.; Pauwels, R.; Huet, T.; Hénin, Y.; Dereu, N.; Evers, M.; Soler, F.; Poujade, C.; De Clercq, E.; Le Pecq, J.-B. Triterpene derivatives that block entry of human immunodeficiency virus type 1 into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 3564-3568.
- Mazzucchelli, G. D.; Cellier, N. A.; Mshvildadze, V.; Elias, R.; Shim, Y.-H.; Touboul, D.; Quinton, L.; Brunelle, A.; Laprévote, O.; De Pauw, E. A.; De Pauw-Gillet, M.-C. A. Pores formation on cell membranes by

hederacolchiside A1 leads to a rapide release of proteins for cytosolic subproteome analysis. *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 1683-1692.

Melek, F. R.; Miyase, T.; Abdel-Khalik, S. M.; Hetta, M. H.; Mahmoud, I. I. Triterpenoid saponins from *Oreopanax guatemalensis*. *Phytochemistry* **2002**, *60*, 185-195.

Melzig, M. F.; Bader, G.; Loose, R. Investigations of the mechanism of membrane activity of selected triterpenoid saponins. *Planta Med.* **2001**, *67*, 43-48.

Mimaki, Y.; Yokosuka, A.; Kuroda, M.; Hamanaka, M.; Sakuma, C.; Sashida, Y. New bidesmosidic triterpene saponins from the roots of *Pulsatilla chinensis*. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1226-1229.

Ming, L.; Han, X.; Yu, B. Synthesis of monomethylated dioscin derivatives and their antitumor activities. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 117-121.

Minocha, P. K.; Tiwari, K. P. A triterpenoidal saponin from roots of *Acanthus illicifolius*. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 135-137.

Mishra, M.; Srivastava, S. K. Betulinic acid-3-O- β -D-maltoside from *Acacia leucophloea* wild. *Indian J. Pharm. Sci.* **1985**, *47*, 154-155.

Miyashita, H.; Ikeda, T.; Nohara, T. Synthesis of neosaponins and neoglycolipids containing a chacotriosyl moiety. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 2182-2191.

Miyashita, H.; Kai, Y.; Nohara, T.; Ikeda, T. Efficient synthesis of α - and β -chacotriosyl glycosides using appropriate donors, and their cytotoxic activity. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 1309-1315.

- Mshvildadze, V.; Elias, R.; Faure, R.; Debrauwer, L.; Dekanosidze, G.; Kemertelidze, E.; Balansard, G. Triterpenoid saponins from berries of *Hedera colchica*. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 752-754.
- Mshvildadze, V.; Legault, J.; Lavoie, S.; Gauthier, C.; Pichette A. Anticancer diarylheptanoid glycosides from the inner bark of *Betula papyrifera*. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 2531-2536.
- Mukherjee, R.; Kumar, V.; Srivastava, S. K.; Agarwal, S. K.; Burman, A. C. Betulinic acid derivatives as anticancer agents: Structure activity relationship. *Curr. Med. Chem.—Anti-Cancer Agents* **2006**, *6*, 271-279.
- Muthu Kumara, S. S.; Kwong Huat, B. T. Extraction, isolation and characterisation of antitumor principle, α -hederin, from the seeds of *Nigella sativa*. *Planta Med.* **2001**, *67*, 29-32.
- Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 461-477.
- Nisbet, L. J.; Moore, M. Will natural products remain an important source of drug research for the future? *Curr. Opin. Biotech.* **1997**, *8*, 708-712.
- Noda, Y.; Kaiya, T.; Kohda, K.; Kawazoe, Y. Enhanced cytotoxicity of some triterpenes toward leukemia L1210 cells cultured in low pH media: Possibility of a new mode of cell killing. *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, *45*, 1665-1670.
- O'Connell, M. M.; Bentley, M. D.; Campbell, C. S.; Cole, B. J. W. Betulin and lupeol in bark from four white-barked birches. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 2175-2176.

- Ohara, S.; Hishiyama, S. Utilization of triterpenoids I. Synthesis of betulin glycosides by cyclodextrin glycosyltransferase. *Mokuzai Gakkaishi* **1994**, *40*, 444-451.
- Ohara, S.; Ohira, T. Plant growth regulation effects of triterpenoid saponins. *J. Wood Sci.* **2003**, *49*, 59-64.
- Okazaki, S.; Kinoshita, K.; Koyama, K.; Takahashi, K.; Yuasa, H. New triterpene saponins from *Stenocereus eruca* (Cactaceae). *J. Nat. Med.* **2007**, *61*, 24-29.
- Ovesná, Z.; Vachálková, A.; Horváthová, K.; Tóthová, D. Pentacyclic triterpenoic acids: new chemoprotective compounds. *Neoplasma* **2004**, *51*, 327-333.
- Pakulski, Z. Regioselective glycosylation of unprotected mannosides: A convenient access to high-mannose type saponins. *Polish. J. Chem.* **2005**, *79*, 361-367.
- Park, H.-J.; Kwon, S.-H.; Lee, J.-H.; Lee, K.-H.; Miyamoto, K.-I.; Lee, K.-T. Kalopanaxsaponin A is a basic saponin structure for the anti-tumor activity of hederagenin monodesmosides. *Planta Med.* **2001**, *67*, 118-121.
- Patočka, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *J. Appl. Biomed.* **2003**, *1*, 7-12.
- Peng, W.; Sun, J.; Lin, F.; Han, X.; Yu, B. Facile synthesis of ginsenoside Ro. *Synlett.* **2004a**, *2*, 259-262.
- Peng, W.; Han, X.; Yu, B. Synthesis of a typical glucuronide-containing saponin, 28-*O*- β -D-glucopyranosyl oleanane 3-*O*- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucuronopyranoside. *Synthesis* **2004b**, *10*, 1641-1647.

- Pezzuto, J. M. Plant-derived anticancer agents. *Biochem. Pharmacol.* **1997**, *53*, 121-133.
- Pichette, A.; Liu, H.; Roy, C.; Tanguay, S.; Simard, F.; Lavoie, S. Selective oxidation of betulin for the preparation of betulinic acid, an antitumor compound. *Synthetic Commun.* **2004**, *34*, 3925-3937.
- Pichette, A.; Lavoie, S.; Morin, P.; Mshvildadze, V.; Lebrun, M.; Legault, J. New labdane diterpenes from the stem bark of *Larix laricina*. *Chem. Pharm. Bull.* **2006**, *54*, 1429-1432.
- Pichette, A.; Legault, J.; Gauthier, C. Triterpenes derivatives and uses thereof as antitumor agents or anti-inflammatory agents. Canadian and United States Patent Application, **2008a**, 73 pp.
- Pichette, A.; Legault, J.; Gauthier, C. Bidesmosidic betulin and betulinic acid derivatives and uses thereof as antitumor agents. USPTO Patent Pending, demande déposée le 10 septembre **2008b** #61/095815.
- Pikul, S.; Switzer, G. Zirconium tetrachloride as a convenient catalyst for the glycosylation of sterols with 2,3,4,6,6'-penta-*O*-acetyl-5-hydroxymethylgalactosyl fluoride. *Tetrahedron: Assymetr.* **1997**, *8*, 1165-1168.
- Pisha, E.; Chai, H.; Lee, I.-S.; Chagwedera, T. E.; Farnsworth, N. R.; Cordell, G. A.; Beecher, C. W. W.; Fong, H. H. S.; Kinghorn, A. D.; Brown, D. M.; Wani, M. C.; Wall, M. E.; Hieken, T. J.; Das Gupta, T. K.; Pezzuto, J. M. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. *Nat. Med.* **1995**, *1*, 1046-1051.

- Plasman, V.; Braekman, J. C.; Daloze, D.; Luhmer, M.; Windsor, D.; Pasteels, J. M. triterpene saponins in the defensive secretion of a chrysomelid beetle, *Platyphora ligata*. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 646-649.
- Plaza, A.; Cinco, M.; Tubaro, A.; Pizza, C.; Piacente, S. New triterpene glycosides from the stems of *Anomospermum grandifolium*. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1606-1610.
- Plé, K.; Chwalek, M.; Voutquenne-Nazabadioko, L. Synthesis of α -hederin, δ -hederin, and related triterpenoid saponins. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 1588-1603.
- Plé, K.; Chwalek, M.; Voutquenne-Nazabadioko, L. Synthesis of L-arabinopyranose containing hederagenin saponins. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 4347-4362.
- Purohit, M. C.; Pant, G.; Rawat, M. S. M. A betulinic acid glycoside from *Schefflera venulosa*. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 2419.
- Qin, G.-W. Some progress on chemical studies of triterpenoid saponins from Chinese medicinal plants. *Curr. Org. Chem.* **1998**, *2*, 613-625.
- Rao, A. V.; Gurfinkel, D. M. The bioactivity of saponins: Triterpenoid and steroidal glycosides. *Drug Metab. Drug Interac.* **2000**, *17*, 211-235.
- Rooney, S.; Ryan, M. F. Effects of alpha-hederin and thymoquinone, constituents of *Nigella sativa*, on human cancer cell lines. *Anticancer Res.* **2005**, *25*, 2199-2204.
- Sahu, N. P.; Achari, B. Advances in structural determination of saponins and terpenoid glycosides. *Curr. Org. Chem.* **2001**, *5*, 315-334.

- Saito, S.; Kuroda, K.; Hayashi, Y.; Sasaki, Y.; Nagamura, Y.; Nishida, K.; Ishiguro, I. Preparation of glycyrrhetic acid glycosides having various $\beta(1\rightarrow2)$ -linked disaccharides and their cytoprotective effects on carbon tetrachloride-induced hepatic injury. *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 2333-2339.
- Salzwedel, K.; Martin, D. E.; Sakalian, M. Maturation inhibitors: a new therapeutic class targets the virus structure. *AIDS Rev.* **2007**, *9*, 162-172.
- Sami, A.; Taru, M.; Salme, K.; Jari, Y.-K. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *29*, 1-13.
- Samoshina, N. F.; Denisenko, M. V.; Denisenko, V. A.; Uvarova, N. I. Synthesis of glycosides of lupane-type triterpene acids. *Chem. Nat. Compd.* **2003**, *39*, 575-582.
- Saxena, B. B.; Zhu, L.; Hao, M.; Kisilis, E.; Katdare, M.; Oktem, O.; Bomshteyn, A.; Rathnam, P. Boc-lysinated-betulonic acid: A potent, anti-prostate cancer agent. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6349-6358.
- Schimmel, J.; Eleutério, M. I. P.; Ritter, G.; Schmidt, R. R. Synthesis of saponins with cholestanol, cholesterol, and friedelanol as aglycones. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 1701-1721.
- Schmidt, M. L.; Kuzmanoff, K. L.; Ling-Indeck, L.; Pezzuto, J. M. Betulinic acid induces apoptosis in human neuroblastoma cell lines. *Eur. J. Cancer* **1997**, *33*, 2007-2010.
- Schmidt, R. R.; Behrendt, M.; Toepfer, A. Nitriles as solvents in glycosylation reactions: Highly selective β -glycoside synthesis. *Synlett* **1990**, 694-696.
- Schmidt, R. R.; Toepfer, A. Glycosylation with highly reactive glycosyl donors: Efficiency of the inverse procedure. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 3353-3356.

- Schmidt, R. R. Anomeric-oxygen activation for glycoside synthesis: the trichloroacetimidate method. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1994**, *50*, 21-123.
- Seeman, P.; Cheng, D.; Iles, G. H. Structure of membrane holes in osmotic and saponin hemolysis. *J. Cell. Biol.* **1973**, *56*, 519-527.
- Setzer, W. N.; Setzer, M. C. Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2003**, *3*, 540-556.
- Shi, B.; Wu, H.; Yu, B.; Wu, J. 23-Oxa-analogues of OSW-1: Efficient synthesis and extremely potent antitumor activity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4324-4327.
- Shi, B.; Tang, P.; Hu, X.; Liu, J. O.; Yu, B. OSW saponins: Facile synthesis toward a new type of structures with potent antitumor activities. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10354-10367.
- Simard, F.; Legault, J.; Lavoie, S.; Mshvildadze, V.; Pichette A. Isolation and identification of cytotoxic compounds from the wood of *Pinus resinosa*. *Phytother. Res.* (**2008**), doi: 10.1002/ptr.2416.
- Société Canadienne du Cancer / National Cancer Institute of Canada. *Canadian Cancer Statistics 2007*, Toronto, Canada, **2007**.
- Soler, F.; Poujade, C.; Evers, M.; Carry, J.-C.; Hénin, Y.; Bousseau, A.; Huet, T.; Pauwels, R.; De Clercq, E.; Mayaux, J.-F.; Le Pecq, J.-B.; Dereu, N. Betulinic acid derivatives: A new class of specific inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 entry. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1069-1083.

- Sousa, A. F.; Pinto, P. C. R. O.; Silvestre, A. J. D.; Pascoal Neto, C. Triterpenic and other lipophilic components from industrial cork byproducts. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6888-6893.
- Sparg, S. G.; Light, M. E.; van Staden, J. Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *94*, 219-243.
- Sporn, M. B.; Liby, K.; Yore, M. M.; Suh, N.; Albini, A.; Honda, T.; Sundararajan, C.; Gribble, G. W. Platforms and networks in triterpenoid pharmacology. *Drug Develop. Res.* **2007**, *68*, 174-182.
- Srivastava, S. K.; Srivastava, S. D.; Nigam, S. S. Lupa-20(29)-ene-3-O- α -L-rhamnopyranoside from the roots of *Cordia obliqua*. *J. Indian Chem. Soc.* **1983**, *60*, 202.
- Stachulski, A. V.; Harding, J. R.; Lindon, J. C.; Maggs, J. L.; Park, B. K.; Wilson, I. D. Acyl glucuronides: Biological activity, chemical reactivity, and chemical synthesis. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6931-6945.
- Strickley, R. G. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharm. Res.* **2004**, *21*, 201-230.
- Sun, I.-C.; Wang, H.-K.; Kashiwada, Y.; Shen, J.-K.; Cosentino, L. M.; Chen, C.-H.; Yang, L.-M.; Lee, K.-H. Anti-AIDS agents. 34. Synthesis and structure-activity relationships of betulin derivatives as anti-HIV agents. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4648-4657.
- Sun, I.-C.; Chen, C.-H.; Kashiwada, Y.; Wu, J.-H.; Wang, H.-K.; Lee, K.-H. Anti-AIDS agents 49. Synthesis, anti-HIV, and anti-fusion activities of IC9564 analogues based on betulinic acid. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4271-4275.

- Sun, J.; Han, X.; Yu, B. Synthesis of a typical *N*-acetylglucosamine-containing saponin, oleanolic acid 3-yl α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranoside. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 827-833.
- Sung, T. V.; Peter-Katalinic, J.; Adam, G. A bidesmosidic triterpenoid saponin from *Schefflera octophylla*. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3717-3720.
- Tan, N.; Zhou, J.; Zhao, S. Advances in structural elucidation of glucuronide oleanane-type triterpene carboxylic acid 3,28-*O*-bidesmosides (1962-1997). *Phytochemistry* **1999**, *52*, 153-192.
- Tan, Y.; Yu, R.; Pezzuto, J. M. Betulinic acid-induced programmed cell death in human melanoma cells involves mitogen-activated protein kinase activation. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 2866-2875.
- Tang, P.; Mamdami, F.; Hu, X.; Liu, J. O.; Yu, B. Synthesis of OSW saponin analogs with modified sugar residues and their antiproliferative activities. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *17*, 1003-1007.
- Tapondjou, A. L.; Miyamoto, T.; Lacaille-Dubois, M.-A. Glucuronide triterpene saponins from *Bersama engleriana*. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 2126-2132.
- Taylor, W. C. Constituents of some Asian medicinal plants. *Pure & Appl. Chem.* **1994**, *66*, 2375-2378.
- Thibeault, D.; Gauthier, C.; Legault, J.; Bouchard, J.; Dufour, P.; Pichette, A. Synthesis and structure-activity relationship study of cytotoxic germanicane- and lupane-type 3 β -*O*-monodesmosidic saponins starting from betulin. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6144-6157.

- Tiwari, K. P.; Minocha, P. K. Pavophylline, a new saponin from the stem of *Pavonia zeylanica*. *Phytochemistry* **1980a**, *19*, 701-704.
- Tiwari, K. P.; Srivastava, S. D.; Srivastava, S. K. α -L-Rhamnopyranosyl-3 β -hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid from the stem of *Dillenia pentagyna*. *Phytochemistry* **1980b**, *19*, 980-981.
- Tolstikova, T. G.; Sorokina, I. V.; Tolstikov, G. A.; Tolstikov, A. G.; Flekhter, O. B. Biological activity and pharmacological prospects of lupane triterpenoids: I. Natural lupane derivatives. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2006a**, *32*, 37-49.
- Tolstikova, T. G.; Sorokina, I. V.; Tolstikov, G. A.; Tolstikov, A. G.; Flekhter, O. B. Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids: II. Semisynthetic lupane derivatives. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **2006b**, *32*, 261-276.
- Udeani, G. O.; Zhao, G.-M.; Geun Shin, Y.; Cooke, B. P.; Graham, J.; Beecher, C. W. W.; Kinghorn, A. D.; Pezzuto, J. M. Pharmacokinetics and tissue distribution of betulinic acid in CD-1 mice. *Biopharm. Drug Dispos.* **1999**, *20*, 379-383.
- Uvarova, N. I.; Oshitok, G. I.; Elyakov, G. B. Synthesis of steroid and triterpenoid glycosides by the orthoester method. *Carbohydr. Res.* **1973**, *27*, 79-87.
- Uvarova, N. I.; Atopkina, L. N.; Elyakov, G. B. Synthesis of triterpene and steroid glycosides. *Carbohydr. Res.* **1980**, *83*, 33-42.
- Villani, P.; Orsière, T.; Sari-Minodier, I.; Bouvenot, G.; Botta, A. Étude in vitro de l'activité antimutagène de l'alphahédérine. *Ann. Biol. Clin.* **2001**, *59*, 285-289.

- Vincken, J.-P.; Heng, L.; de Groot, A.; Gruppen, H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 275-297.
- Voutquenne, L.; Lavaud, C.; Massiot, G.; Le Men-Olivier, L. Structure-activity relationships of haemolytic saponins. *Pharm. Biol.* **2002**, *40*, 253-262.
- Wada, T.; Ohkubo, A.; Mochizuki, A.; Sekine, M. 2-(Azidomethyl)benzoyl as a new protecting group in nucleosides. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1069-1072.
- Walthelm, U.; Dittrich, K.; Gelbrich, G.; Schöpke, T. Effects of saponins on the water solubility of different model compounds. *Planta Med.* **2001**, *67*, 49-54.
- Wang, G.-S.; Zhao, C.-F.; Xu, J.-D. Studies on the glycosides in the leaves of *Oplopanax elatus* NAKAI (I). *Chem. Res. Chinese U.* **1994**, *10*, 185-192.
- Wang, P.; Li, C.; Zang, J.; Song, N.; Zhang, X.; Li, Y. Synthesis of two bidesmosidic ursolic acid saponins bearing a 2,3-branched trisaccharide residue. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 2086-2096.
- Wang, P.; Li, C.-X.; Wang, G.-F.; Li, Y.-X. Synthesis of an ursolic acid saponin with *N*-acetylglucosamine-containing trisaccharide residue. *Chin. J. Chem.* **2006**, *24*, 1421-1426.
- Wang, Y.; Zhang, Y.; Yu, B. The cytotoxicity of saponins correlates with their cellular internalization. *ChemMedChem* **2007**, *2*, 288-291.
- Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M.; Coggon, P.; McPhail, A. T. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2325-2327.

- Wick, W.; Grimmel, C.; Wagenknecht, B.; Dichgans, J.; Weller, M. Betulinic acid-induced apoptosis in glioma cells: A sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *289*, 1306-1312.
- Winter, W. P. Mechanism of saponin induced red cell hemolysis: Evidence for the involvement of aquaporin CHIP28. *Blood* **1994**, *84*, suppl. 1 à 10, abstr. 445.
- Wojtkielewicz, A.; Dlugosz, M.; Maj, J.; Morzycki, J. W.; Nowakowski, M.; Renkiewicz, J.; Strnad, M.; Swaczynová, J.; Wilczewska, A.; Wójcik, J. New analogues of the potent cytotoxic saponin OSW-1. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3667-3673.
- Xue, J.; Liu, P.; Pan, Y.; Guo, Z.; A total synthesis of OSW-1. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 157-161.
- Yamada, H.; Nishizawa, M. Synthesis and structure revision of intensely sweet saponin osladin. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 386-397.
- Yamashita, K.; Lu, H.; Lu, J.; Chen, G.; Yokoyama, T.; Sagara, Y.; Manabe, M.; Kodama, H. Effect of triterpenoids, lupeol, betulin, and betulinic acid on the stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation of proteins in human neutrophils. *Clin. Chim. Acta* **2002**, *325*, 91-96.
- Yan, M.-C.; Liu, Y.; Chen, H.; Ke, Y.; Xu, Q.-C.; Cheng, M.-S. Synthesis and antitumor activity of two natural *N*-acetylglucosamine-bearing triterpenoid saponins: Lotoidoside D and E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4200-4204.
- Yan, M.-C.; Liu, Y.; Lu, W.-X.; Wang, H.; Sha, Y.; Cheng, M.-S. Facile synthesis and cytotoxicity of triterpenoid saponins bearing a unique disaccharide

moiety: hederacolchiside A₁ and its analogues. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 780-784.

Ye, W.-C.; Ji, N.-N.; Zhao, S.-X.; Liu, J.-H.; Ye, T.; McKervey, M. A.; Stevenson, P. Triterpenoids from *Pulsatilla chinensis*. *Phytochemistry* **1996**, *42*, 799-802.

Ye, W.; He, A.; Zhao, S.; Che, C.-T. Pulsatilloside C from the roots of *Pulsatilla chinensis*. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 658-659.

Ye, W. C.; Zhang, Q. W.; Liu, X.; Che, C. T.; Zhao, S. X. Oleanane saponins from *Gymnema sylvestre*. *Phytochemistry* **2000**, *53*, 893-8999.

Ye, W.; Zhang, Q.; Hsiao, W. W.; Zhao, S.; Che, C.-T. New lupane glycosides from *Pulsatilla chinensis*. *Planta Med.* **2002**, *68*, 183-186.

Yogeeswari, P.; Sriram, D. Betulinic acid and its derivatives: A review on their biological properties. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 657-666.

Yook, C.-S.; Kim, I.-H.; Hahn, D.-R.; Nohara, T.; Chang, S.-Y. A lupane-triterpene glycoside from leaves of two *Acanthopanax*. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 839-843.

Yook, C.-S.; Chang, S.-Y.; Lai, J. H.; Ko, S. K.; Jeong, J.-H.; Nohara, T. Lupane-glycoside of *Acanthopanax trifoliatum* forma *tristigmatis* leaves. *Arch. Pharm. Res.* **1999**, *22*, 629-632.

Yook, C.-S.; Liu, X.-Q.; Chang, S.-Y.; Park, S.-Y.; Nohara, T. Lupane-triterpene glycosides from the leaves of *Acanthopanax gracilistylus*. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 1383-1385.

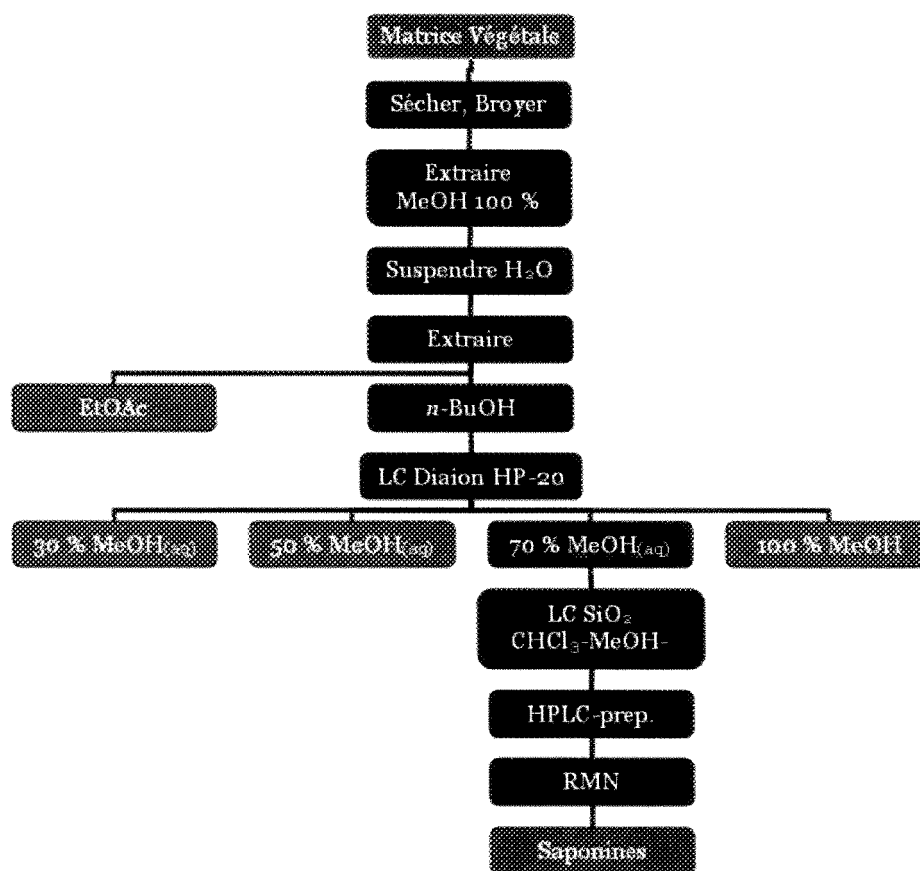
- Yoshizumi, K.; Hirano, K.; Ando, H.; Hirai, Y.; Ida, Y.; Tsuji, T.; Tanaka, T.; Satouchi, K.; Terao, J. Lupane-type saponins from leaves of *Acanthopanax sessiliflorus* and their inhibitory activity on pancreatic lipase. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 335-341.
- Yu, B.; Xie, J.; Deng, S.; Hui, Y. First synthesis of a bidesmosidic triterpene saponin by a highly efficient procedure. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 12916-12917.
- Yu, B.; Li, B.; Xing, G.; Hui, Y. A “double random” strategy for the preparation of saponin libraries. *J. Comb. Chem.* **2001a**, *3*, 404-406.
- Yu, B.; Tao, H. Glycosyl trifluoroacetimidates. Part 1: Preparation and application as new glycosyl donors. *Tetrahedron Lett.* **2001b**, *42*, 2405-2407.
- Yu, B.; Tao, H. Glycosyl trifluoroacetimidates. 2. Synthesis of dioscin and Xiebai saponin I. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 9099-9102.
- Yu, B.; Zhang, Y.; Tang, P. Carbohydrate chemistry in the total synthesis of saponins. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, *31*, 5145-5161.
- Yu, D.; Sakurai, Y.; Chen, C.-H.; Chang, F.-R.; Huang, L.; Kashiwada, Y.; Lee, K.-H. Anti-AIDS agents 69. Moronic acid and other triterpene derivatives as novel potent anti-HIV agents. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5462-5469.
- Yu, W.; Jin, Z. Total synthesis of the anticancer natural product OSW-1. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6576-6583.
- Zamir, L. O.; Nedeá, M. A.; Bélair, S.; Sauricol, F.; Mamer, O.; Jacqmain, E.; Jean, F.-I.; Garneau, F.-X. Taxanes isolated from *Taxus canadensis*. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 5173-5176.

- Zhang, Y.-H.; Yu, T.; Wang, Y. Extraction of betulin from bark of *Betula platyphylla* by supercritical carbon dioxide extraction. *J. Forest. Res.* **2003**, *14*, 202-204.
- Zhao, G.; Yan, W.; Cao, D. Simultaneous determination of betulin and betulinic acid in white birch bark using RP-HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *43*, 959-962.
- Zhu, X.; Yu, B.; Hui, Y.; Schmidt, R. R. Synthesis of the trisaccharide and tetrasaccharide moieties of the potent immunoadjuvant QS-21. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 965-973.
- Zhu, J.; Xiong, L.; Yu, B.; Wu, J. Apoptosis induced by a new member of saponin family is mediated through caspase-8-dependent cleavage of Bcl-2. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *68*, 1831-1838.
- Zhu, C.; Tang, P.; Yu, B. Total synthesis of Lobatoside E, a potent antitumor cyclic triterpene saponin. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5872-5873.
- Zou, C.-C.; Hou, S.-J.; Shi, Y.; Lei, P.-S.; Liang, X.-T. The synthesis of gracillin and dioscin: two typical representatives of spirostanol glycosides. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 721-727.
- Zou, Z. R.; Yi, Y. H.; Wu, H. M.; Wu, J. H.; Liaw, C. C.; Lee, K. H. Intercedensides A-C, three new cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber *Mensamaria intercedens* Lampert. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1055-1060.
- Zuco, V.; Supino, R.; Righetti, S. C.; Cleris, L.; Marchesi, E.; Gambacorti-Passerini, C.; Formelli, F. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. *Cancer Lett.* **2002**, *175*, 17-25.

ANNEXE 1

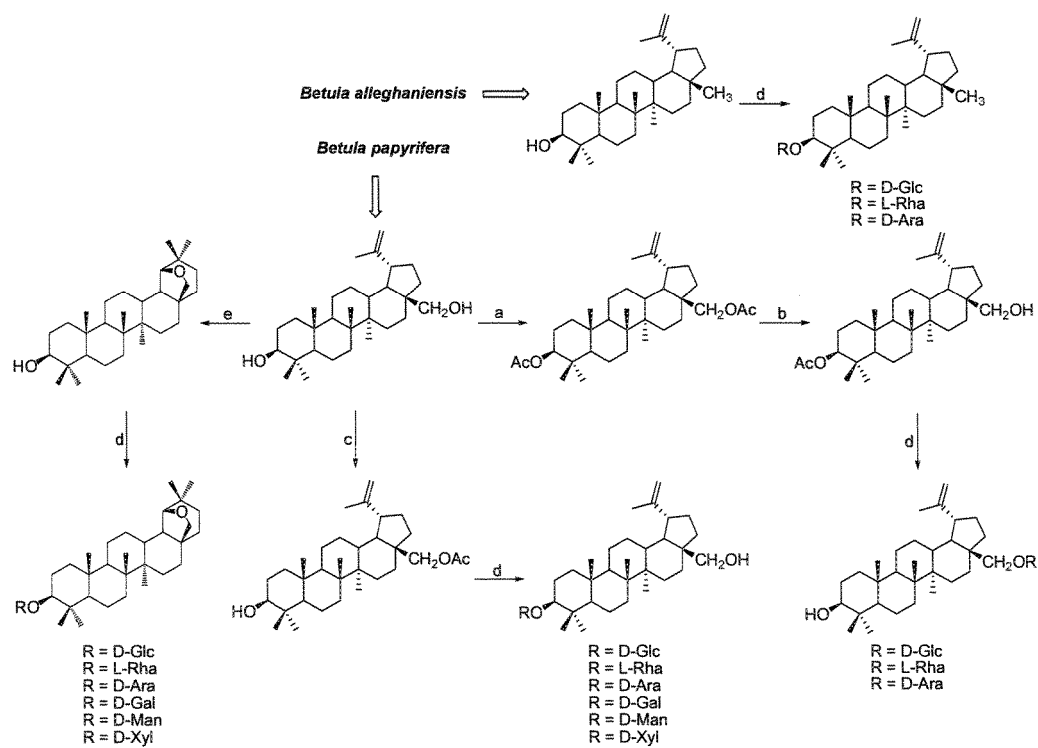
SCHÉMA D'EXTRACTION ET D'ISOLEMENT DE SAPONINES

NATURELLES

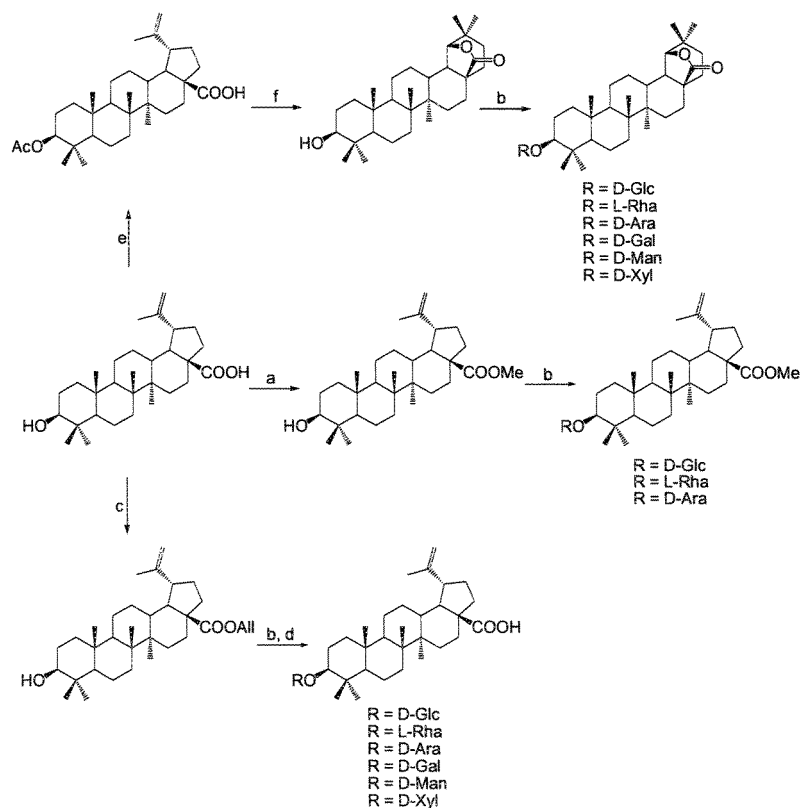


ANNEXE 2

SYNTHÈSE DE SAPONINES DE TYPE LUPANE ET GERMANICANE



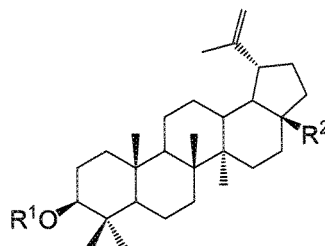
Conditions réactionnelles: (a) Ac_2O , Py, DMAP, 0 °C to rt, 5 h; (b) $\text{Mg}(\text{OCH}_3)_2$, MeOH/THF, rt, 4 h; (c) Ac_2O , CH_2Cl_2 , rt, 24 h; (d) i-TCA, TMSOTf, 4 Å MS, CH_2Cl_2 , rt, 30 min; ii-NaOH 0,25 N, MeOH/THF/ H_2O 1:2:1, rt, 3-24 h; (e) $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3/\text{SiO}_2$, CH_2Cl_2 , reflux, 45 min.



Conditions réactionnelles: (a) DBU, CH₃I, THF, 0 °C to rt, 24 h; (b) i-TCA, TMSOTf, 4 Å MS, CH₂Cl₂, rt, 30 min; ii-NaOH 0,25 N, MeOH/THF/H₂O 1:2:1, rt, 3 h; (c) AllBr, K₂CO₃, DMF, 55 °C, 7 h; (d) Pd⁰(PPh₃)₄, PPh₃, pyrrolidine, THF, 24 h; (e) Ac₂O, CH₂Cl₂, rt, 24 h; (f) i-FeCl₃/SiO₂, CH₂Cl₂, reflux, 3 h; ii-NaOH 0,25 N, MeOH/THF/H₂O 1:2:1, reflux, 16 h.

ANNEXE 3

CYTOTOXICITÉ DE SAPONINES TRITERPÉNIQUES DE TYPE LUPANE



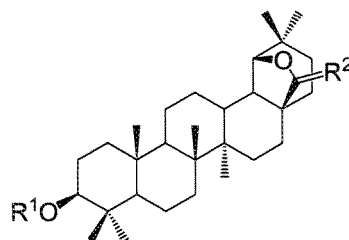
R ¹	R ²	Cell Line IC ₅₀ (μM ± SD) ^a			
		A549 ^b	DLD-1 ^c	B16-F1 ^d	WS1 ^e
H	CH ₃	165 ± 8	125 ± 6	104 ± 6	63 ± 3
H	CH ₂ OH	3,8 ± 0,1	6,6 ± 0,3	13,8 ± 0,5	3,6 ± 0,1
H	COOH	10,3 ± 0,4	15,0 ± 0,3	16,1 ± 0,5	12 ± 1
Ac	CH ₂ OAc	>95	>95	>95	>95
H	CH ₂ OAc	75 ± 7	56 ± 4	43 ± 2	44 ± 2
Ac	CH ₂ OH	>253	>253	>253	>253
Ac	COOH	18 ± 2	20 ± 2	nd	57 ± 6
H	COOCH ₃	19 ± 3	25 ± 4	26 ± 1	19 ± 2
H	COOAlI	>225	>225	>225	>225
Glc	CH ₃	14 ± 1	14 ± 1	15,0 ± 0,7	13,3 ± 0,5
Rha	CH ₃	>178	>178	>178	>178
Ara	CH ₃	28 ± 2	50 ± 6	27 ± 2	15,8 ± 0,8
Glc	CH ₂ OH	>200	>200	>200	>200
Rha	CH ₂ OH	22 ± 3	50 ± 10	18 ± 1	33 ± 5
Ara	CH ₂ OH	41 ± 3	63 ± 8	38 ± 3	59 ± 5
Gal	CH ₂ OH	>100	>100	nd	>100
Man	CH ₂ OH	7,5 ± 0,1	11,0 ± 0,5	nd	5,3 ± 0,5
Xyl	CH ₂ OH	90 ± 10	>100	nd	>100
H	CH ₂ O-Glc	>248	>248	>248	>248
H	CH ₂ O-Rha	>228	>228	>228	>228
H	CH ₂ O-Ara	>175	>175	>175	>175
Glc	COOCH ₃	8,4 ± 0,3	3,9 ± 0,1	7,1 ± 0,3	9,3 ± 0,2
Rha	COOCH ₃	59 ± 3	>183	55 ± 2	53 ± 2
Ara	COOCH ₃	13,5 ± 0,6	18 ± 1	13,3 ± 0,4	12,5 ± 0,4
Glc	COOH	>178	32 ± 9	49 ± 13	>178
Rha	COOH	2,6 ± 0,6	3,9 ± 0,4	3,9 ± 0,4	31 ± 3
Ara	COOH	10 ± 2	17 ± 3	11 ± 1	47 ± 5
Gal	COOH	>100	>100	nd	>100
Man	COOH	41 ± 4	14,9 ± 0,5	nd	16 ± 3
Xyl	COOH	14 ± 2	19,2 ± 0,8	nd	21 ± 1

^a Data represent mean values (±SD) for three independent experiments made in triplicate.

^b Human lung carcinoma.; ^c Human colorectal adenocarcinoma.; ^d Mouse melanoma.;

^e Human normal skin fibroblasts.

ANNEXE 4
CYTOTOXICITÉ DE SAPONINES TRITERPÉNIQUES DE TYPE
GERMANICANE



R ¹	R ²	Cell Line IC ₅₀ (μM ± SD) ^a			
		A549 ^b	DLD-1 ^c	B16-F1 ^d	WS1 ^e
H	H ₂	>100	>100	nd	>100
H	O	>100	>100	nd	70 ± 9
Glc	H ₂	31 ± 2	41,6 ± 0,9	nd	45 ± 3
Rha	H ₂	>100	>100	nd	75 ± 5
Ara	H ₂	>100	>100	nd	>100
Gal	H ₂	30 ± 10	42 ± 9	nd	30 ± 9
Man	H ₂	>100	>100	nd	>100
Xyl	H ₂	>100	>100	nd	>100
Glc	O	>100	>100	nd	>100
Rha	O	>100	>100	nd	>100
Ara	O	>100	>100	nd	>100
Gal	O	>100	>100	nd	>100
Man	O	>100	>100	nd	>100
Xyl	O	>100	>100	nd	>100

^a Data represent mean values (±SD) for three independent experiments made in triplicate.

^b Human lung carcinoma.

^c Human colorectal adenocarcinoma.

^d Mouse melanoma.

^e Human normal skin fibroblasts.

ANNEXE 5
ARTICLE SOUMIS À TETRAHEDRON LETTERS

Synthesis of Betulinic Acid Acyl Glucuronide for Application in Anticancer Prodrug Monotherapy

Charles Gauthier, Jean Legault, Simon Rondeau and André Pichette^{††}

Laboratoire LASEVE, Chaire de Recherche sur les Agents Anticancéreux d'Origine Naturelle, Université du

Québec à Chicoutimi, 555 boul. de l'Université, Chicoutimi (Québec), Canada, G7H 2B1

Abstract

The synthesis of 28-*O*- β -D-glucuronide betulinic acid, an acyl glucuronide derivative, was successfully carried out for the first time using commercially available peracetylated methyl glucuronate bromide under phase-transfer conditions. The target compound could be used in an anticancer prodrug monotherapy (PMT) strategy since it is non-cytotoxic, non-haemolytic, more water soluble than betulinic acid, possesses a good *in vitro* stability in phosphate buffer and can be hydrolyzed in the presence of β -D-glucuronidase releasing *in vitro* betulinic acid, a promising anticancer agent.

Keywords: Acyl glucuronide synthesis, betulinic acid, phase-transfert conditions, prodrug monotherapy.

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

Glucuronidation is one of the main phase 2 metabolic pathways by which the organism transforms a drug or a xenobiotic into a more water soluble substance allowing its detoxification and further excretion.¹ The glucuronidation reaction is catalyzed by enzymes of the family of uridine diphosphate glucuronosyltransferases (UDPGTs). Compounds featuring aliphatic alcohols and phenols are metabolized into *O*-glucuronide ethers, while those containing carboxylic acid functions are transformed into *O*-glucuronide esters, the so-called acyl glucuronides. Since most of the glucuronides exhibit a weaker biological activity than their corresponding aglycones, the glucuronidation is generally considered as an important detoxification metabolic process in mammals.² However, even if the glucuronide has no activity itself, it can undergo an enzymatic hydrolysis catalyzed by β -D-glucuronidase that subsequently releases the corresponding biologically active aglycone.¹ Furthermore, in some cases such as morphine-6-glucuronide, the glucuronidation can maintain or even increase the therapeutic effect of the drug.³

Several studies have revealed that acyl glucuronides are potentially active metabolites of carboxylic acid-containing drugs.⁴ In fact, these compounds may be considered responsible for adverse side effects and the toxicity of such drugs.⁵ Indeed, acyl glucuronides can undergo hydrolytic reactions, intramolecular rearrangements and intermolecular reactions with plasma proteins leading to covalent drug-protein adducts.^{4,6} Therefore, the determination and characterization of acyl glucuronide metabolites have important toxicological implications during the clinical development of carboxylic acid-containing drugs.

Bevirimat or PA-457 (**2**, Figure 1), namely betulinic acid 3 β -*O*-(3',3'-dimethylsuccinyl), is the first in the new class of HIV drugs called maturation inhibitors that specifically block a late step in processing of the HIV Gag protein.⁷ Structurally, bevirimat (**2**) is a C-3 esterified derivative of the anticancer agent betulinic acid (**1**) that features two carboxylic acid groups. Recent studies have shown that bevirimat (**2**) is metabolized to two acyl monoglucuronides and one acyl diglucuronide after oral administration to rats, the monoglucuronide **4** (Figure 1) being the major metabolite.^{8,9} The naturally occurring lupane-type triterpenoid betulinic acid (**1**) is a promising anticancer agent¹⁰ found in various fruits, vegetables and medicinal plants.¹¹ Betulinic acid (**1**) is currently undergoing phase II clinical trials for the treatment of melanoma.¹² Although metabolites of betulinic acid (**1**) have not yet been characterized, it may be hypothesized that acyl glucuronide **3** could be a major metabolic product. Therefore, it is of great importance to synthesize in adequate amounts the acyl glucuronide **3** in order to evaluate its biological activity and potential toxicity.

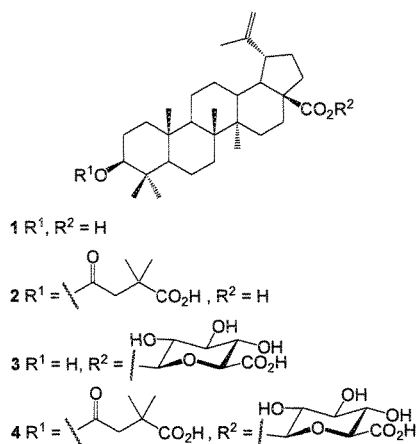
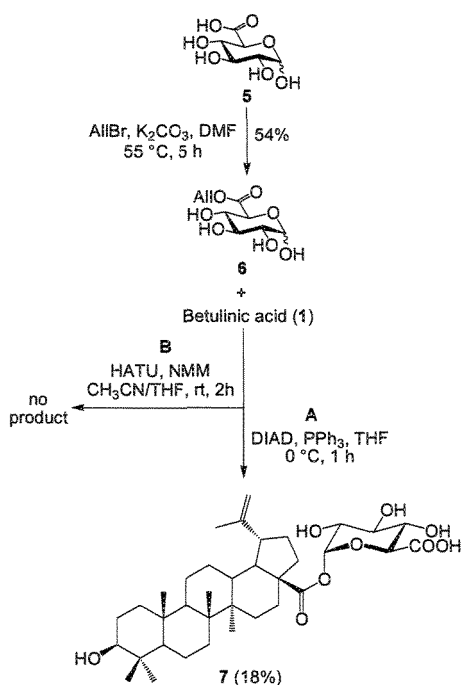


Figure 1. Structures of betulinic acid (**1**), bevirimat (**2**) and acyl glucuronides **3** and **4**.

Anticancer compounds bearing a glucuronide moiety can also be considered as prodrugs.^{1,13,14} Indeed, glucuronides can be selectively activated to the tumoral site since the enzyme β -D-glucuronidase is found at highly elevated concentrations in necrotic tumor tissue.^{15,16} Moreover, β -D-glucuronidase is more active in cytoplasmic acidic pH, which is usually found in cancer cells.¹⁷ The design of a

suitable glucuronide prodrug must be based upon four criteria: 1) improved water solubility, 2) stability in blood, 3) decreased cytotoxicity, and 4) susceptibility to enzymatic cleavage.¹⁴ Thus, in this paper, we report an efficient stereoselective synthetic strategy for the preparation of 28-*O*- β -D-glucuronide betulinic acid (**3**). *In vitro* stability in phosphate buffer, *in vitro* haemolytic and cytotoxic activities as well as enzymatic hydrolysis in the presence of β -D-glucuronidase were also investigated in order to determine if the acyl glucuronide **3** could be used in a prodrug monotherapy strategy (PMT).

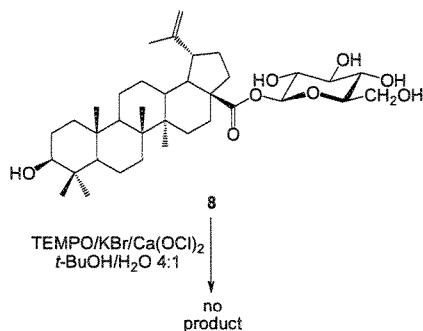
Although the synthesis of *O*-glucuronide ethers has been frequently reported in the literature,¹⁸⁻²⁰ few studies have been undertaken on the chemical synthesis of acyl glucuronide derivatives.^{5,21-23} A first approach developed by Juteau *et al.*²⁴ consists of coupling a carboxylic acid-containing compound with allyl glucuronate (**6**) via Mitsunobu conditions. The main advantage of this method is that the sugar is minimally protected, which considerably reduces the number of steps of the synthetic procedure. Thus, as depicted in Scheme 1, allyl glucuronate (**6**)²⁴ was obtained in 54% yield after treatment of D-glucuronic acid (**5**) with allyl bromide (AllBr) and potassium carbonate (K₂CO₃) in dimethylformamide (DMF). Compound **6** was then coupled with betulinic acid (**1**)²⁵ in the presence of triphenylphosphine (PPh₃) and diisopropylazodicarboxylate (DIAD) in anhydrous THF. Surprisingly, under these conditions, 28-*O*- α -D-glucuronide betulinic acid (**7**) was isolated in low yield (9%) as the major product instead of the allylated β -anomer. The configuration of the glycosidic linkage was confirmed by ¹H NMR (6.17 ppm, br s, H-1').



Scheme 1. Attempts to synthesize acyl glucuronide **3** via Mitsunobu (**A**) and selective acylation (**B**).

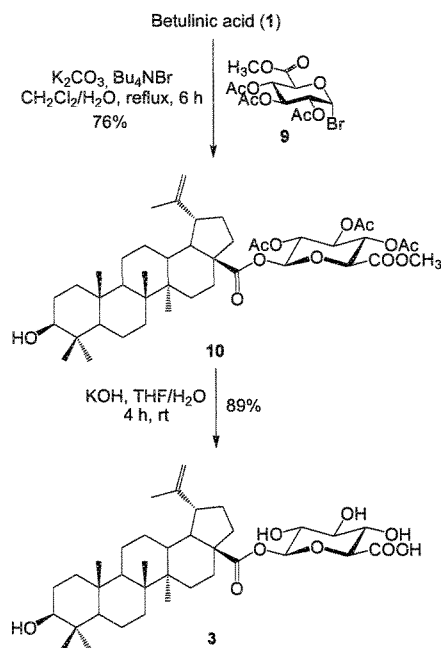
Therefore, we turned to another approach recently developed by Stachulski and co-workers^{26,27} allowing the stereoselective formation of β -glucuronides. As shown in Scheme 1, the selective acylation of allyl glucuronate (**6**) with betulinic acid (**1**) was tried using *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HATU) and *N*-methylmorpholine (NMM) in acetonitrile (CH₃CN). Unfortunately, as revealed by TLC and NMR analyses, no coupling product was formed during this reaction and triterpene **1** was almost completely recovered after silica gel column chromatography. Addition of THF in order to improve the solubility of both compounds **1** and **6** did not lead to better results.

We then chose to use the TEMPO-mediated selective oxidation²⁸ to achieve the preparation of acyl glucuronide **3**. As depicted in Scheme 2, this approach consists of selectively oxidizing the primary alcohol of the known 28-*O*- β -D-glucopyranoside betulinic acid (**8**)^{29,30} in the presence of TEMPO/KBr/Ca(OCl)₂ under aqueous conditions (*t*-BuOH/H₂O).³¹ Once again, using these conditions, no glucuronide was formed, probably due to a lack of solubility of glucoside **8** in the reaction medium.



Scheme 2. Attempt to synthesize acyl glucuronide **3** via TEMPO-mediated selective oxidation of glucoside **8**.

The successful synthesis of 28-*O*- β -D-glucuronide betulinic acid (**3**) was finally achieved under modified phase-transfer conditions.³² Thus, as shown in Scheme 3, betulinic acid (**1**) was coupled with the commercially available methyl 2,3,4-tri-*O*-acetyl-1-bromo-D-glucopyranuronate (**9**) in the presence of potassium carbonate (K₂CO₃) and tetrabutylammonium bromide (Bu₄NBr) in a heterogeneous solution of CH₂Cl₂/H₂O to provide 28-*O*-(methyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -D-glucuronate) betulinic acid (**10**)³³ in good yield (76%). Subsequent simultaneous deprotection of acetyl groups and saponification of methyl ester under basic conditions (KOH, THF/H₂O) allowed the formation of the target acyl glucuronide **3**³⁴ (89%) in a pure β -linkage (1,2-*trans*-glycoside) as proven by ¹H NMR (5.55 ppm, d, *J*_{1,2} = 8.1 Hz, H-1').



Scheme 3. Successful synthesis of acyl glucuronide **3** under phase-transfer conditions.

In order to determine if the acyl glucuronide **3** could be used as an anticancer prodrug in a PMT strategy, we investigated several parameters. Firstly, the *in vitro* cytotoxicity of glucuronide **3** was assessed against lung carcinoma (A549), colon adenocarcinoma (DLD-1) and normal skin fibroblasts (WS1) using both resazurin reduction test³⁵ and Hoechst assay.³⁶ As revealed in Table 1, the acyl glucuronide **3** did not exhibit any significant cytotoxic activity with an IC₅₀ greater than 100 μ M. The *in vitro* haemolytic activity of glucuronide **3** was also assessed against sheep erythrocytes. As for most of the lupane-type glycosides,³⁷ no haemolytic activity was measured for acyl glucuronide **3** (HD₅₀ >100 μ M). Another essential parameter to evaluate for an anticancer prodrug is its stability in solution. To this end, the *in vitro* stability was determined by analytical RP-HPLC³⁸ after incubation at 37 °C of acyl glucuronide **3** in phosphate buffer (0.02 M; pH 7.2). As measured by Wen and co-workers⁸ for the bevirimat glucuronide **4**, the acyl glucuronide **3** was quite stable and no decomposition products were observed even after a one-week incubation time (168 h) in phosphate buffer. It is noteworthy that acyl glucuronide **3** was significantly more water soluble than betulinic acid (**1**) since it was possible to dissolve it at low concentrations (\approx 150 μ M) in phosphate buffer. Finally, cleavage of acyl glucuronide **3** in the presence of *Escherichia coli* β -D-glucuronidase (4.3 U/mL) in phosphate buffer (0.02 M; pH 7.2) was measured by analytical RP-HPLC.³⁸ As shown in Figure 2, it is quite interesting that betulinic acid (**1**) was released at 75% in the solution after a 24 h incubation time at 37 °C. Increasing by 10 fold the concentration of β -D-glucuronidase (43 U/mL) led to the complete release of betulinic acid (**1**) after less than one hour. Therefore, these results showed that the acyl glucuronide **3** is a good substrate for the enzyme β -D-glucuronidase.

Table 1. Cytotoxic and haemolytic activities of 28-*O*- β -D-glucuronide betulinic acid (**3**).

	Cytotoxicity ^a (IC ₅₀ , μ M)			Haemolysis ^b (HD ₅₀ , μ M)
	A549 ^c	DLD-1 ^d	WS1 ^e	
	>100	>100	>100	>100

^a Resazuring reduction test³⁵ and Hoechst assay.³⁶

^b Sheep erythrocytes.

^c Human lung carcinoma.

^d Human colon adenocarcinoma.

^e Human normal skin fibroblasts.

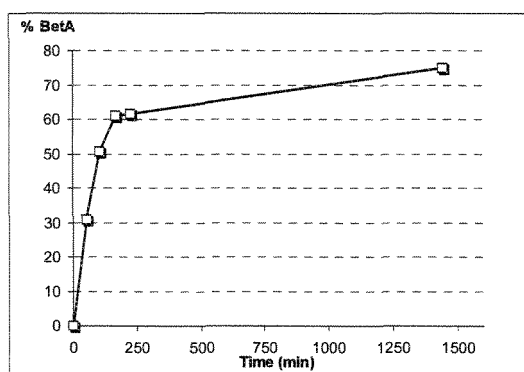


Figure 2. % of betulinic acid (**1**) released in solution after enzymatic hydrolysis of acyl glucuronide **3** under the action of β -D-glucuronidase (4.3 U/mL) as measured by HPLC.³⁸

In summary, for the first time, the chemical synthesis of 28-*O*- β -D-glucuronide betulinic acid (**3**) was carried out with success in a stereoselective and efficient manner under phase-transfer conditions. This novel methodology could be applied for the preparation of the major acyl glucuronide metabolite of bevirimat (**4**) or other carboxylic acid-containing drug metabolites. In view of the results, acyl

glucuronide **3** could be used as an anticancer prodrug in a PMT strategy since it is non-cytotoxic, non-haemolytic, more water soluble than betulinic acid (**1**), quite stable in phosphate buffer and can be hydrolyzed in the presence of β -D-glucuronidase releasing betulinic acid (**1**), a promising anticancer agent. Further studies will be undertaken in order to assess the *in vivo* antitumor potential of the acyl glucuronide **3** and results will be reported in due course.

Acknowledgements

We thank Karl Girard-Lalancette and Catherine Dussault for the biological assays, and Professor François-Xavier Garneau for reviewing this manuscript. The financial support of Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT, fonds forestier 02) is gratefully acknowledged. Charles Gauthier thanks Programme d'Aide Institutionnel à la Recherche de l'Université du Québec à Chicoutimi (PAIR-UQAC), Fondation de l'UQAC, Association Francophone pour le Savoir (ACFAS) and FQRNT for graduate scholarships.

References and notes

- Shipkova, M.; Wieland, E. *Clin. Chim. Acta* **2005**, *358*, 2-23.
- Shipkova, M.; Armstrong, V. W.; Oellerich, M.; Wieland, E. *Ther. Drug Monit.* **2003**, *25*, 1-16.
- van Dorp, E. L.; Morariu, A.; Dahan, A. *Expert Opin. Pharmacother.* **2008**, *9*, 1955-1961.
- Bailey, M. J.; Dickinson, R. G. *Chem.-Biol. Inter.* **2003**, *145*, 117-137.
- Stachulski, A. V.; Harding, J. R.; Lindon, J. C.; Maggs, J. L.; Park, B. K.; Wilson, I. D. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6931-6945.
- Yang, X.-X.; Hu, Z.-P.; Boelsterli, U. A.; Zhou, S.-F. *Curr. Pharm. Anal.* **2006**, *2*, 259-277.
- Salzwedel, K.; Martin, D. E.; Sakalian, M. *AIDS Rev.* **2007**, *9*, 162-172.
- Wen, Z.; Stern, S. T.; Martin, D. E.; Lee, K.-H.; Smith, P. C. *Drug Metab. Dispos.* **2006**, *34*, 1436-1442.
- Wen, Z.; Martin, D. E.; Bullock, P.; Lee, K.-H.; Smith, P. C. *Drug Metab. Dispos.* **2007**, *35*, 440-448.
- Cichewicz, R. H.; Kouzi, S. A. *Med. Res. Rev.* **2004**, *24*, 90-114.
- Eiznhamer, D. A.; Xu, Z.-Q. *IDrugs* **2004**, *7*, 359-373.
- <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00346502?term=betulinic+acid&rank=1>
- de Graaf, M.; Boven, E.; Scheeren, H. W.; Haisma, H. J.; Pinedo, H. M. *Curr. Pharm. Design* **2002**, *8*, 1391-1403.
- Chen, X.; Wu, B.; Wang, P. G. *Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents* **2003**, *3*, 139-150.
- Bosslet, K.; Straub, R.; Blumrich, M.; Czech, J.; Gerken, M.; Sperker, B.; Kroemer, H. K.; Gesson, J.-P.; Koch, M.; Monneret, C. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 1195-1201.
- Kratz, F.; Müller, I. A.; Ryppa, C.; Wamecke, A. *Chem. Med. Chem.* **2008**, *3*, 20-53.
- Sperker, B.; Backman, J. T.; Kroemer, H. K. *Clin. Pharmacokinet.* **1997**, *33*, 18-31.
- Stachulski, A. V.; Jenkins, G. N. *Nat. Prod. Rep.* **1998**, *15*, 173-186.
- Ferguson, J. R.; Harding, J. R.; Killick, D. A.; Lumbard, K. W.; Scheinmann, F.; Stachulski, A. V. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **2001**, 3037-3041.
- Harding, J. R.; King, C. D.; Perrie, J. A.; Sinnott, D.; Stachulski, A. V. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1501-1507.
- Baba, A.; Yoshioka, T. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3303-3310.
- Baba, A.; Yoshioka, T. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 9541-9549.
- Stachulski, A. V. *Curr. Opin. Drug Disc.* **2007**, *10*, 58-66.
- Juteau, H.; Gareau, Y.; Labelle, M. A. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1481-1484.
- Thibeault, D.; Gauthier, C.; Legault, J.; Bouchard, J.; Dufour, P.; Pichette, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6144-6157.
- Perrie, J. A.; Harding, J. R.; Holt, D. W.; Johnston, A.; Meath, P.; Stachulski, A. V. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2591-2594.
- Bowkett, E. R.; Harding, J. R.; Maggs, J. L.; Park, B. K.; Perrie, J. A.; Stachulski, A. V. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 7596-7605.
- De Souza, M. V. N. *Mini-Rev. Org. Chem.* **2006**, *3*, 155-165.
- Baglin, I.; Poumaroux, A.; Nour, M.; Tan, K.; Mitaine-Offer, A. C.; Lacaille-Dubois, M. A.; Chauffert, B.; Cavé, C. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2003**, *18*, 111-117.

30. Gauthier, C.; Legault, J.; Lavoie, S.; Rondeau, S.; Tremblay, S.; Pichette, A. (accepted in *J. Nat. Prod.* #2008-00579x)
31. Lin, F.; Peng, W.; Xu, W.; Han, X.; Yu, B. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 1219-1223.
32. Bliard, C.; Massiot, G.; Nazabadioko, S. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 6107-6108.
33. Typical procedure for the synthesis of 28-*O*-(methyl-2,3,4-tri-*O*-acetyl- β -D-glucuronate) betulinic acid (**10**): To a solution of **1** (1.0 equiv) and **9** (1.5 equiv) in CH₂Cl₂ (11.6 mL/mmol) was added K₂CO₃ (2.5 equiv) and Bu₄NBr (0.4 equiv). The mixture was stirred and refluxed for 6 h, then diluted with CH₂Cl₂ and the organic phase was washed with H₂O (2 \times) and brine (1 \times). The solvents of the dried solution (MgSO₄) were evaporated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel flash chromatography (hexanes/EtOAc 9:1 to 13:7) to afford **10** (76%) as a white crystalline powder. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ : 5.74 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-1'), 5.35 (m, 1H, H-3'), 5.25 (m, 2H, H-2', H-4'), 4.73 (br s, 1H, H-29a), 4.60 (br s, 1H, H-29b), 4.16 (d, J = 10.0 Hz, 1H, H-5'), 3.73 (s, 3H, CO₂CH₃), 3.18 (dd, J = 11.4 Hz, J = 5.1 Hz, 1H, H-3), 2.94 (td, J = 11.1 Hz, J = 5.1 Hz, 1H, H-19), 2.05, 2.05, 2.02 (all s, 3 \times 3H, O(CO)CH₃), 1.67 (s, 3H, H-30), 0.96, 0.96, 0.89, 0.82, 0.75 (all s, 5 \times 3H, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ : 173.9, 170.0, 169.4, 168.9, 166.7, 150.1, 109.8, 90.8, 78.9, 74.0, 72.0, 69.7, 69.2, 56.8, 55.3, 50.5, 49.1, 46.7, 42.4, 40.6, 38.8, 38.7, 38.1, 37.2, 36.3, 34.4, 31.6, 30.2, 29.7, 28.0, 27.4, 25.4, 20.8, 20.6, 20.6, 20.5, 19.4, 18.3, 16.1, 16.0, 15.4, 14.7. HR-ESI-MS m/z 795.4280 [M+Na]⁺ (calculated for C₄₃H₆₄O₁₂Na: 795.4290).
34. Typical procedure for the synthesis of 28-*O*- β -D-glucuronide betulinic acid (**3**): To a solution of **10** (1.0 equiv) in THF (148 mL/mmol) and H₂O (37 mL/mmol) was added KOH (6.0 equiv). The mixture was stirred at room temperature for 4.5 h, then the solution was acidified to pH 3-4 with 10% HCl. The solvents were evaporated under reduced pressure and the residue was purified by silica gel flash chromatography (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 to 2:3) to give **3** (76%) as a white amorphous powder. R_f 0.16 (CH₂Cl₂/MeOH 3:1); [α]_D²⁵ -28.0° (c 0.2, MeOH); ¹H NMR (CDCl₃/MeOD 1:1, 400 MHz) δ : 5.55 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-1'), 4.72 (br s, 1H, H-29a), 4.60 (br s, 1H, H-29b), 3.79 (m, 1H, H-5'), 3.53 (m, 2H, H-3', H-4'), 3.42 (m, 1H, H-2'), 3.15 (dd, J = 6.0 Hz, J = 10.0 Hz, 1H, H-3), 3.00 (td, J = 11.0 Hz, J = 4.5 Hz, 1H, H-19), 1.69 (s, 1H, H-30), 0.98, 0.95, 0.94, 0.83, 0.75 (all s, 5 \times 3H, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27). NMR ¹³C (CDCl₃/MeOD 1:1, 100 MHz) δ : 175.7, 175.6, 151.1, 110.0, 94.2, 77.3, 75.8, 73.1, 72.4, 79.2, 57.3, 56.0, 51.2, 50.1, 47.5, 43.0, 41.3, 39.4, 39.4, 38.6, 37.7, 36.8, 34.8, 32.3, 30.8, 30.1, 28.3, 27.4, 26.1, 21.4, 19.5, 18.8, 16.5, 16.2, 15.8, 15.1. HR-ESI-MS m/z 655.3804 [M+Na]⁺ (calculated for C₃₆H₅₆O₉Na: 655.3817).
35. O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5421-5426.
36. Rago, R.; Mitchen, J.; Wilding, G. *Anal Biochem.* **1990**, *191*, 31-34.
37. Unpublished results.
38. RP-HPLC analyses were performed using Zorbax C18 column at a flow rate of 1 mL/min with a column temperature of 30 °C. Compounds were detected by UV absorption at 210 nm following this elution gradient: 30%-100% B where B = CH₃CN + 0.1% HCOOH and A = H₂O + 0.1% HCOOH in 50 min.

ANNEXE 6
SPECTRES RMN ^1H ET ^{13}C

