

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI

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

PAR
SERGE LAVOIE
B. Sc. (CHIMIE)

CONTRIBUTION À LA SYNTHÈSE DE DÉRIVÉS DE L'ACIDE BÉTULINIQUE À
PARTIR DU BÉTULINOL EXTRAIT DE L'ÉCORCE DU BOULEAU BLANC
(*BETULA PAPYRIFERA*)

MAI 2001



Mise en garde/Advice

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

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

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

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

à Guillaume

RÉSUMÉ

L'acide bétulinique (3), un composé triterpénique, présente de nombreuses activités thérapeutiques, notamment une activité antitumorale sur les mélanomes humains. De plus, des tests *in vivo* chez la souris ont démontré que l'acide bétulinique (3) est très peu toxique pour l'organisme faisant de cette molécule un traitement potentiel très prometteur. Il a déjà été montré que l'acide bétulinique (3) peut être préparé à partir du bétulinol (2), un composé présent en très forte concentration dans l'écorce du bouleau blanc (*Betula papyrifera*).

Le premier objectif de cette recherche est donc de développer une méthode de synthèse efficace de l'acide bétulinique (3) à partir du bétulinol (2). La stratégie choisie consiste à oxyder sélectivement l'alcool primaire en aldéhyde pour former le bétulinol (14), puis à oxyder ce dernier en fonction acide sans toucher à la fonction alcool secondaire. La première partie de la synthèse a été réalisée avec un rendement isolé de 35% en utilisant l'oxyde de chrome adsorbé sur silice. L'autre partie de la synthèse, l'oxydation du bétulinol (14) en acide bétulinique (3), est réalisée avec un rendement isolé de 67% en utilisant le permanganate de potassium dans l'acétone à reflux.

Le second objectif du travail est de développer une méthode efficace d'estérification entre un alcool triterpénique et un fragment constitué d'une fonction acide carboxylique. Différents agents activants ont été testés pour condenser l'allobétulinol (18) et l'adipate de monométhyle (17). Le dicyclohexylcarbodiimide (29) et le

diméthylaminopyridine (**31**) ont été utilisés dans le dichlorométhane pour préparer le produit de couplage avec un rendement isolé de 35%.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier un ami, mon directeur de maîtrise M. André Pichette, qui a su m'enseigner les bases de la chimie organique de synthèse. Sans ses encouragements soutenus et ses conseils judicieux, il m'aurait été difficile de mettre un terme à ce travail. M. Pichette s'est même permis d'être un ami précieux dans les moments heureux comme dans les moments plus difficiles.

Dans l'entreprise, d'autres professeurs ont su m'insuffler un grand intérêt pour les produits naturels et tout ce qui s'y rattache. D'abord, M. François-Xavier Garneau, avec son intérêt marqué pour la chimie des produits naturels, puis, M. Michel Girard, avec sa maîtrise parfaite du vaste domaine de la chimie analytique organique. Ces professeurs ont tous les deux contribué grandement à élargir mes horizons, me donnant ainsi les moyens de situer mon projet de recherche dans un contexte global.

Le travail effectué n'aurait pu être complet sans l'utilisation d'appareils sophistiqués comme le GC-MS et le spectrophotomètre à RMN. Le LASEVE, avec l'aide précieuse de ses assistantes de recherche, Mme France-Ida Jean et Mme Hélène Gagnon, m'ont enseigné et donné libre accès au premier appareil. Quant aux analyses RMN, elles ont été gracieusement effectuées par M. Pierre Audet de l'Université Laval et M. Michel Girard de Santé Canada.

Certains étudiants de 1^{er} cycle ont grandement contribué aux travaux de laboratoire nécessaires à la réussite de ce projet. Ainsi, Mme Joëlle Veilleux, Mme Véronique

Marceau et M. Steve Tanguay, en plus d'effectuer un travail de laboratoire considérable, m'ont permis de perfectionner mes qualités d'enseignant et de leadership.

Le prix déjà élevé de ce type de recherche aurait atteint des sommets sans précédent si M. André Barette n'avait pas exercé ses talents de souffleur de verre. En effet, plusieurs morceaux dispendieux auraient eu une fin tragique sans son travail.

Le financement de cette recherche n'aurait pas été possible sans le rayonnement national du médecin chercheur Daniel Gaudet. L'imposante équipe de recherche qu'il dirige attire nécessairement une quantité importante de subventions de tout azimut. Ainsi, la majeure partie de mon financement m'a été fourni via le GRID, le complexe hospitalier de la Sagamie et Boréal Pharma Inc., tous des organismes dans lesquels M. Gaudet est impliqué. L'autre partie du financement provient de bourses décernées par les organismes suivants : Programme d'aide institutionnelle à la recherche (PAIR), Association des Diplômé(e)s et Ami(e)s de l'UQAC (ADAUQAC) et Association des Cadres de l'UQAC.

Finalement, j'aimerais remercier des amis sans lesquels ma santé mentale eu été gravement compromise : Jimmy, qui m'a écouté et compris en lui parlant de mon projet, et Wivecke, qui m'a écouté et compris en lui parlant du reste.

Merci à tous !

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
REMERCIEMENTS	v
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES TABLEAUX.....	xii
LISTE DES ANNEXES.....	xiii
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURES	5
2.1. <i>Betula papyrifera</i>	6
2.2. Les lupanes	8
2.3. Activités thérapeutiques.....	13
2.3.1. Activités antitumorales.....	13
2.3.2. Activité anti-VIH.....	19
2.3.3. Autres activités thérapeutiques.....	22
2.4. Extraction et purification	25
2.5. Stratégie de synthèse.....	26
2.6. Dérivés de réarrangements	29

2.7. Réactifs oxydants.....	30
2.8. Réaction d'estérification.....	32
CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE	35
3.1. Considération générale	36
3.2. Extraction du bétulinol (2).....	38
3.3. Purification du bétulinol (2) par recristallisation.....	38
3.4. Oxydation du bétulinol (2).....	39
3.4.1. Perruthenate de tétrapropylammonium avec le N-méthylmorpholine-N-oxide (TPAP/NMO)	39
3.4.2. Dichromate de pyridinium adsorbé sur silice (PDC/SiO ₂).....	39
3.4.3. Oxyde de chrome adsorbé sur silice (CrO ₃ /SiO ₂)	40
3.4.4. Chlorure ou nitrate de fer adsorbé sur silice (FeCl ₃ /SiO ₂ ou Fe(NO ₃) ₃ /SiO ₂).....	41
3.5. Oxydation du bétulinol (14).....	42
3.6. Réaction d'estérification.....	42
3.6.1. BOP (27)	42
3.6.2. SOCl ₂	43
3.6.3. DCC (29)/DMAP (31).....	43
3.7. Chromatographie et spectroscopie.....	44
3.7.1. GC-MS	44
3.7.2. Diazométhane (33)	44
3.7.3. RMN.....	46

CHAPITRE 4 RÉSULTATS ET DISCUSSION	47
4.1. Extraction du bétulinol (2).....	48
4.2. Purification du bétulinol (2).....	48
4.3. Oxydation du bétulinol (2).....	49
4.3.1. Perruthenate de tétrapropylammonium avec le N-méthylmorpholine-N- oxide (TPAP/NMO)	49
4.3.2. Dichromate de pyridinium dichromate adsorbé sur silice (PDC/SiO ₂)...	49
4.3.3. Oxyde de chrome adsorbé sur silice (CrO ₃ /SiO ₂)	50
4.3.4. Chlorure ou nitrate de fer adsorbé sur silice (FeCl ₃ /SiO ₂ ou Fe(NO ₃) ₃ /SiO ₂).....	53
4.4. Oxydation du bétulinol (14).....	57
4.5. Réaction d'estérification	58
4.6. Données chromatographiques et spectrales des dérivés	59
4.6.1. Bétulinol (2)	60
4.6.2. Dérivés d'oxydation	60
4.6.3. Dérivés de réarrangement.....	65
4.6.4. Dérivés de couplage	69
CHAPITRE 5 CONCLUSION	70
5.1. Conclusions générales	71
5.2. Perspectives futures	73
BIBLIOGRAPHIE	75

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : TRONC ET FEUILLES DU BOULEAU BLANC.....	7
FIGURE 2: LUPÉOL (1), BÉTULINOL (2) ET ACIDE BÉTULINIQUE (3).....	9
FIGURE 3: STRUCTURE 3D DU BÉTULINATE DE BENZYLE (4).....	9
FIGURE 4: BIOSYNTÈSE DES LUPANES	11
FIGURE 5: MÉCANISME BIOCHIMIQUE DE L' APOPTOSE [HENGARTNER, M. O.; 2000]	17
FIGURE 6: CYCLE VITAL DU VIH [WWW.NIAID.NIH.GOV/FACTSHEETS/HOWHIV.HTM]	21
FIGURE 7: VIH [WWW.NIAID.NIH.GOV/FACTSHEETS/HOWHIV.HTM].....	22
FIGURE 8: ACIDE 7 β -(4-HYDROXYBENZOYLOXY)-BÉTULINIQUE (8), UN ANTI-BACTÉRIEN...	23
FIGURE 9: SYNTHÈSE DE L' ACIDE BÉTULINIQUE (3) À PARTIR DU BÉTULINOL (2) PAR OXYDATION NON SÉLECTIVE [KIM, D. S. H. L. <i>ET AL.</i> , 1997]	27
FIGURE 10: SYNTHÈSE DE L' ACIDE BÉTULINIQUE (3) À PARTIR DU BÉTULINOL (2) PAR PROTECTION SÉLECTIVE [KIM, D. S. H. L. <i>ET AL.</i> , 1997]	28
FIGURE 11: SYNTHÈSE DE L' ACIDE BÉTULINIQUE (3) VIA LE BÉTULINAL (14)	29
FIGURE 12 : SOUS-PRODUITS POSSIBLE DE L' OXYDATION DU BÉTULINOL (2).....	29
FIGURE 13: FORMATION D'UN ESTER VIA LE COUPLAGE ACIDE CARBOXYLIQUE / ALCOOL ...	32
FIGURE 14: ESTÉRÉFICATION AVEC BOP (27)	33
FIGURE 15: ESTÉRIFICATION VIA LE CHLORURE D' ACIDE.....	33
FIGURE 16: ESTÉRÉFICATION AVEC DCC (29) ET DMAP (31)	34
FIGURE 17 : MONTAGE POUR LA SYNTHÈSE DU DIAZOMÉTHANE (33)	45
FIGURE 18 : DÉRIVÉ DE RÉARRANGEMENT DE L' ALLOBÉTULINOL (18).....	56
FIGURE 19 : FRAGMENT DE MASSE 205 OU 207 (22)[BUDZIKIEWICZ, H. <i>ET AL.</i> ; 1963].	62

FIGURE 20 : FORMATION DE L'ION $M^+ - 71$ (24) POUR LES ALLOBÉTULANES..... 66

FIGURE 21 : FORMATION DE L'ION $M^+ - 43$ (25) POUR LES α -ALLOBÉTULIN I ET II (20 ET 21) 66

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : ACTIVITÉ ANTITUMORALE <i>IN VITRO</i> DE L'ACIDE BÉTULINIQUE (3)	15
TABLEAU 2: COMPOSÉS ANTI-VIH	20
TABLEAU 3 : PROVENANCE ET GRADE DES RÉACTIFS ET SOLVANTS	37
TABLEAU 4 : PARAMÈTRE D'OPÉRATION DU GC-MS.....	44
TABLEAU 5: RÉSULTATS DES ESSAIS D'OXYDATION AVEC PDC	50
TABLEAU 6 : ESSAIS D'OXYDATION DU BÉTULINOL (2) AVEC CrO ₃ /SiO ₂	51
TABLEAU 7 : RENDEMENTS ISOLÉS POUR LES PRODUITS D'OXYDATION AVEC CrO ₃ /SiO ₂	52
TABLEAU 8 : RÉSULTATS DES RÉACTIONS AVEC ACIDES DE LEWIS ADSORBÉ SUR SILICE	54
TABLEAU 9 : RENDEMENTS ISOLÉS POUR LES DÉRIVÉS DE RÉARRANGEMENT	57
TABLEAU 10 : RÉSULTATS DES RÉACTIONS DE COUPLAGE ENTRE L'ALLOBÉTULINOL (18) ET L'ADIPATE DE MONOMÉTHYLE (17).	59
TABLEAU 11 : DONNÉES MS DU BÉTULINOL (2).....	60
TABLEAU 12: DONNÉES CHROMATOGRAPHIQUES ET MS DES DÉRIVÉS D'OXYDATION	61
TABLEAU 13 : PRINCIPAUX SIGNAUX RMN ¹ H DES DÉRIVÉS D'OXYDATION	63
TABLEAU 14 : PRINCIPAUX SIGNAUX RMN ¹³ C DES DÉRIVÉS D'OXYDATION	63
TABLEAU 15: DONNÉES CHROMATOGRAPHIQUES ET MS DES DÉRIVÉS DE RÉARRANGEMENT	65
TABLEAU 16 : PRINCIPAUX SIGNAUX RMN ¹ H DES DÉRIVÉS DE RÉARRANGEMENT.....	67
TABLEAU 17 : PRINCIPAUX SIGNAUX RMN ¹³ C DES DÉRIVÉS DE RÉARRANGEMENT.....	67

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 Liste des abréviations	88
ANNEXE 2 Article publié dans “Synthetic Communications”	92
ANNEXE 3 Mécanismes réactionnels	102
ANNEXE 4 Spectres RMN des dérivés	111
ANNEXE 5 Spectres de masse des dérivés	123

CHAPITRE 1
INTRODUCTION

L'une des plus grandes richesses du Canada est sans aucun doute la forêt boréale, qui couvre une bonne partie de son territoire. L'homme occidental commence à peine à s'intéresser à une ressource déjà bien connue par les autochtones d'Amérique pour ses vertus thérapeutiques [Marie-Victorin, 1995]. Par exemple, l'aspirine, un dérivé de la salicine tirée du saule (*Salix spp.*), est un analgésique très efficace. Pour preuve, ce médicament est encore aujourd'hui l'un des plus vendus au monde [Ege, S.; 1994]. Récemment, une autre molécule, celle-là extraite de l'écorce du bouleau blanc (*Betula papyrifera*), a suscité l'intérêt des chercheurs. En effet, une activité antitumorale sur des mélanomes humains a été démontrée pour l'acide bétulinique (3), un triterpène de la famille du lupane [Pisha, E. *et al.*; 1995]. Malheureusement, comme pour le taxol dans l'if du Pacifique (*Taxus brevifolia*), l'acide bétulinique (3) est présent dans l'écorce du bouleau en très faible concentration [Sechadri, T. R. et Vedantham, T. N. C.; 1971]. Tout espoir n'est pas perdu puisqu'une molécule de la même famille, le bétulinol (2), peut être transformée relativement facilement en acide bétulinique (3). Contrairement à ce dernier, le bétulinol (2) est présent dans l'écorce du bouleau en très grande concentration [Saleh, N. A. M. et Towers, G. H. N.; 1971].

Des chercheurs ont mis au point deux méthodes de synthèse de l'acide bétulinique (3) à partir du bétulinol (2) [Kim, D. S. H. L. *et al.*; 1997]. Malheureusement, chacune des deux synthèses comportent des lacunes. La première génère un mélange d'épimères difficile à séparer alors que l'autre nécessite cinq étapes de synthèse. Une nouvelle stratégie de synthèse a ainsi été envisagée afin d'éviter ces problèmes. Elle consiste, dans un premier temps, à oxyder sélectivement l'alcool primaire en aldéhyde avec

un oxydant doux. Par la suite, le bétulinal (14) obtenu est oxydé en acide bétulinique (3) en utilisant des conditions d'oxydations sélectives pour les aldéhydes.

D'après une revue de littérature approfondie sur le mécanisme d'action de l'acide bétulinique (3), la faible biodisponibilité du composé représente sa seule limitation [Udeani, G. O. *et al.*; 1999]. En effet, l'acide bétulinique (3) n'est pas soluble dans l'eau, de sorte qu'il s'accumule dans les organes riches en gras. Les mélanomes qui sont présents dans la peau sont donc très peu exposés à l'acide bétulinique (3). L'une des solutions envisagées est de greffer sur l'acide bétulinique (3) des substituants hydrophiles par réaction d'estérification afin d'augmenter son hydrosolubilité [Jeong, H.-J. *et al.*; 1999]. Avant de préparer ces dérivés, il faut tester une méthode d'estérification efficace entre des dérivés du bétulinol (2) et des molécules de faibles masses. Pour ce faire, l'allobétulinol (18) et l'adipate de monométhyle (17) seront mis en présence de différents réactifs afin de former un ester.

L'objectif général de ce travail est donc d'élaborer des approches de synthèses pour préparer des dérivés d'acide bétulinique (3). Les objectifs spécifiques sont :

- Extraire et purifier efficacement le bétulinol (2) à partir d'écorce de bouleau blanc.
- En testant plusieurs réactifs, mettre en œuvre la stratégie de synthèse de l'acide bétulinique (3) à partir du bétulinol (2).

- Élaborer une méthode de synthèse pour préparer des esters triterpéniques à partir de fragments constitués d'une fonction acide.

Pour bien situer le contexte de la recherche, une revue de littérature sera effectuée sur les activités thérapeutiques des lupanes, notamment de l'acide bétulinique (3). Les activités antitumorales et anti-VIH sont les mieux documentées. L'ampleur de leurs activités ainsi que leurs modes d'action seront résumés. Suivra un survol des autres activités thérapeutiques démontrées pour les lupanes : inhibition de la β -polymérase, toxicité contre certaines bactéries et virus, protection contre l'intoxication au cadmium, prévention de l'accumulation d'oxalate de calcium et stimulation de la synthèse de collagène. Pour être complète, la revue de littérature couvrira tous les aspects de la chimie organique qui touchent de près au bétulinol (2) : extraction, purification et transformations. Finalement, une brève description du type de réactifs utilisés sera présentée.

Le chapitre trois consiste en une description de la méthodologie employée. À ce titre, tous les détails concernant les réactifs et les protocoles y seront inclus. Les résultats de la recherche seront ensuite présentés et discutés en détail. Une partie de ces résultats (réaction avec $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3/\text{SiO}_2$) a fait l'objet d'un article qui sera publié dans le journal « Synthetic Communications ». Une copie de l'article est placée à l'annexe 2.

La dernière partie, la conclusion générale, situera les stratégies de synthèse dans un contexte global. Les stratégies de synthèse les plus efficaces y seront résumées. Finalement, une suite de travaux sera proposé pour le développement d'un agent antitumoral efficace à partir d'une biomasse facilement exploitable.

CHAPITRE 2
REVUE DE LITTÉRATURES

2.1. *BETULA PAPYRIFERA*

Le bouleau blanc (*Betula papyrifera* Marsh) est un arbre dominant dans la forêt boréale commerciale. Depuis le début de l'exploitation de cette forêt, il est la seule espèce ayant su augmenter sa population. En effet, le bouleau nécessite beaucoup de lumière pour une pleine croissance. Il retrouve ces conditions après que les conifères aient subi une perturbation telle qu'un feu, une épidémie de la tordeuse du bourgeon de l'épinette ou une coupe massive [Marie-Victorin, 1995].

Le bouleau est un représentant des Betuloideae, une sous-famille des Betulaceae. Celle-ci inclut notamment les aulnes (*Alnus sp.*), les ostryers (*Ostrya sp.*) et les noisetiers (*Corylus sp.*). Cette famille occupe généralement des habitats froids et humides. L'arbre, mesurant en moyenne 20 m de hauteur, grandit généralement seul, mais peut parfois faire partie d'un groupe de deux ou plus (Figure 1). Les jeunes troncs et les branches sont de couleur brun-rouge alors que les troncs matures sont blancs [FNAEC, 1997]. Cette couleur est due à la très forte concentration de bétulinol (2) présent dans la partie externe de l'écorce [Jääskeläinen, P.; 1981]. Les feuilles, de formes ovoïdes à la base et se terminant en pointe, ont une taille de 5-9 × 4-7 cm. La surface, légèrement pubescente, présente environ 9 paires de folioles. L'arbre fleurit tard au printemps et les chatons sont cylindriques et mesurent 2.5-5 × 0.6-1.2 cm [FNAEC, 1997].



Gauche : <http://www.canr.uconn.edu/plsci/mbrand/campus/uconn/dec/walk3/one/betpap.html>
 Droite : <http://osu.orst.edu/dept/ldplants/index.htm>

Figure 1 : Tronc et feuilles du bouleau blanc

Le bouleau est bien connu des autochtones d'Amérique. En effet, son écorce contient une grande quantité d'huile faisant de lui un matériau imperméable. Les Amérindiens utilisaient donc cette écorce pour fabriquer des habitations, des vêtements et des canots. Les premiers habitants l'utilisaient aussi comme tonique, ocytocique, purgatif, antispasmodique et antalgique [FNAEC; 1997].

Aujourd'hui, le bois tendre du bouleau est utilisé comme bois de chauffage et pour fabriquer des épingles à linge, des bâtons de crème glacée, des cure-dents, du bois d'œuvre et du papier [FNAEC, 1997]. Dans l'industries, l'écorce est considérée comme un déchet. Par exemple, la scierie Thomas-Louis Tremblay située à Ste-Monique, au Lac-St-Jean, génère de grandes quantités d'écorce. Cette entreprise pourrait donc devenir une source d'approvisionnement très abondante et représenter un bon moyen de valoriser une matière première qui serait autrement brûlée ou enfouie.

2.2. LES LUPANES

Les lupanes sont une famille de triterpènes pentacycliques dont font partie le bétulinol (2), l'acide bétulinique (3) et le lupéol (1) (Figure 2). Ces molécules ont comme particularité un cycle E à cinq membres, un groupe isopropylène en position 19 et une fonction alcool en position 3 [Connolly, J. D. et Hill, R. A.; 1991]. La configuration tridimensionnelle de l'acide bétulinique (3), sous la forme d'un ester de benzyle (Figure 3), montre une série de cycles orientées dans un même plan avec 4 groupements méthyles et une fonction acide carboxylique en position axiale, tandis que le groupement isopropylène, la fonction alcool en position 3 et la fonction méthyle en position 4 sont en position équatoriale [Bringmann, G. *et al.*; 1997].

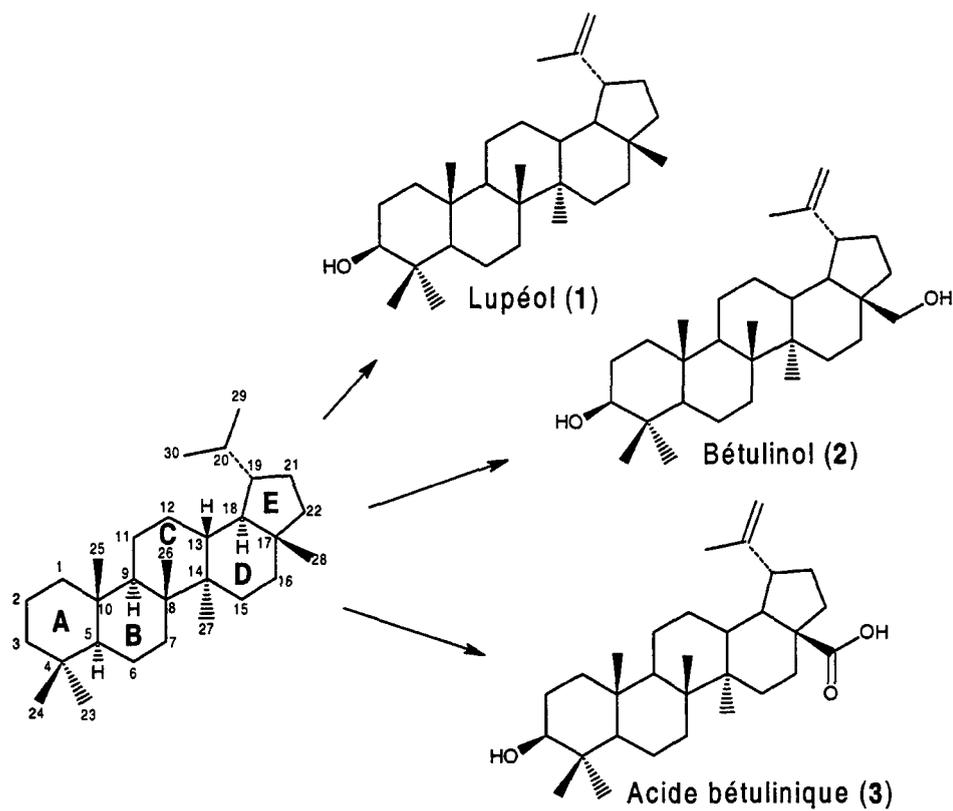


Figure 2: Lupéol (1), bétulinol (2) et acide bétulinique (3)

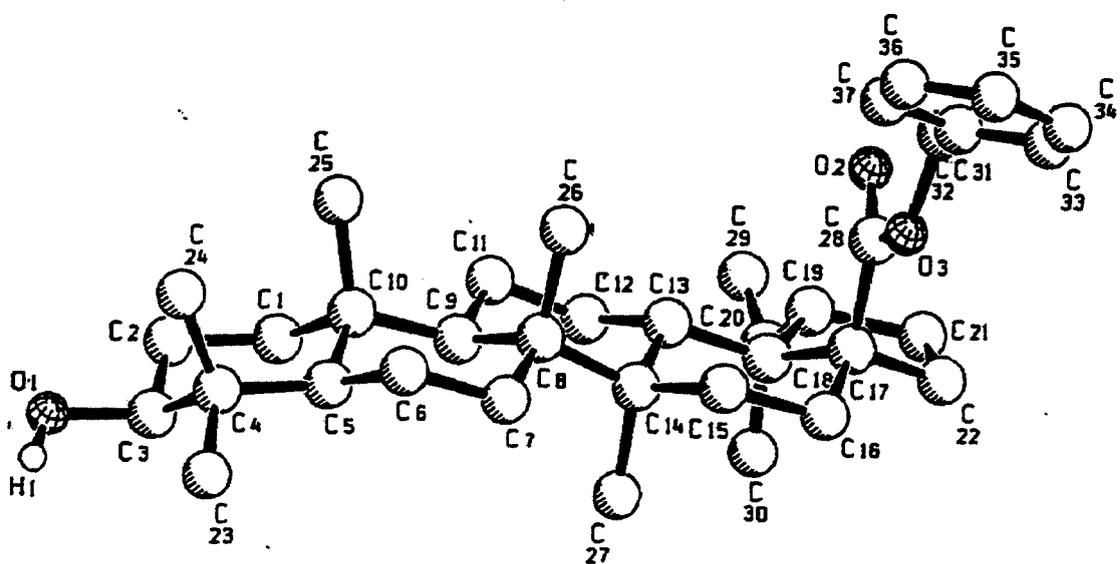


Figure 3: Structure 3D du bétulinate de benzyle (4)

Ces caractéristiques structurales sont issues du mécanisme biosynthétique de cette famille (Figure 4). Le 2,3-époxy-squalène (5), lui-même biosynthétisé à partir de l'acide mévalonique, se replie pour subir quatre cyclisations. Le carbocation ainsi formé subit des réarrangements de Wagner-Meerwein [March, J.; 1992] jusqu'à l'obtention du squelette du lupane. Cet intermédiaire peut encore subir des réarrangements pour former d'autres familles comme les oléanes ou les ursanes. La terminaison de la réaction s'effectue grâce au départ d'un proton, créant ainsi la double liaison du groupe isopropylène. C'est ainsi que le lupéol (1) est biosynthétisé. Des oxydations successives en position 28 conduisent d'abord au bétulinol (2), puis au bétulinal (14) et à l'acide bétulinique (3) [Torssell, K. B. G.; 1983].

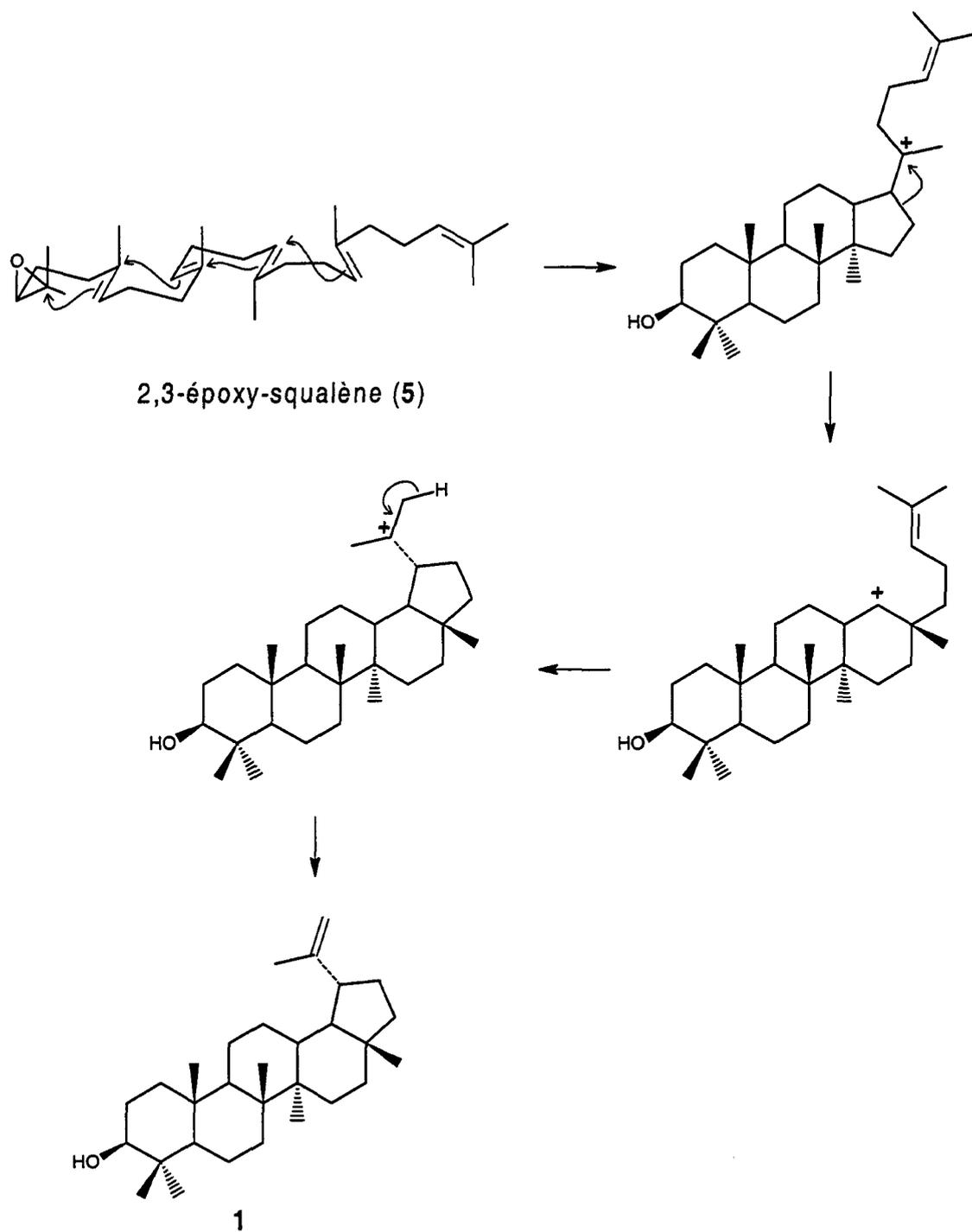


Figure 4: Biosynthèse des lupanes

La synthèse totale de ces molécules est un projet ambitieux mais réalisable. En effet, plusieurs triterpènes ont déjà été synthétisés par de grands chimistes : le lupéol (1) [Stork, G. *et al.*; 1971], l'acide oléanolique [Corey, E. J. et Lee, J.; 1993] et le sophoradiol [Fish, P. V. et Johnson, W. S.; 1994]. L'approche la plus spectaculaire consiste à préparer un homologue fluoré du squalène pour ensuite lui faire subir une pentacyclisation [Johnson, W. S. *et al.*; 1993]. Dans le cadre du cours de 2^e cycle « Sujet Spéciaux », une synthèse totale du lupéol (1) inspirée de la méthode de W. S. Johnson a été proposée [Lavoie, S.; 2000]. Cependant, toutes ces synthèses nécessitent un trop grand nombre d'étapes pour devenir rentables.

Le bouleau constitue une source beaucoup plus profitable pour s'approvisionner en lupanes [O'Connell, M. M. *et al.*; 1988]. En effet, avec 1 kg d'écorce de bouleau blanc, 160 g de bétulinol (2) pur à 95% peuvent être obtenus. Cependant, les bouleaux ne constituent pas la seule source de bétulinol (2). En effet, en 1989, le bétulinol (2) avait été rapporté dans 286 espèces d'angiosperme [Hayek, E. W. H. *et al.*; 1989]. Pour ce qui est des gymnospermes, seul le sapin baumier (*Abies balsamea*) contiendrait du bétulinol (2, < 5%) [Hooper, S. N. et Chandler, R. F.; 1984]. Le lupéol (1) et l'acide bétulinique (3) sont très souvent identifiés dans les mêmes extraits que le bétulinol (2) [Hua, Y. *et al.*; 1991; Fuchino, H. *et al.*; 1996 et Chang, C.-W. *et al.*; 1999].

Lors du recyclage de la liqueur noire, utilisée dans la fabrication du papier via le procédé Kraft, une mousse épaisse se forme au-dessus des concentrateurs [Casey, J. P.; 1980]. De cette mousse est tirée une huile, l'huile de talle, formée principalement de

composés diterpéniques [Kirk, R. E. et al.; 1992]. Si le bouleau est utilisé comme matière première, l'huile de Talle qui en résulte contiendra aussi du bétulinol (2) [Holmbom, B. et Avela, E.; 1971] qui pourrait être exploité facilement [Hayek, E. W. H. *et al.*; 1989].

2.3. ACTIVITÉS THÉRAPEUTIQUES

Les activités biologiques des triterpènes ont été résumées dans plusieurs articles [Mahato, S. et al.; 1992; Mahato, S. et Sucharita, S.; 1997]. Les familles les plus intéressantes du point de vue de l'activité biologique sont celles des oléanes, des ursanes et des lupanes. Généralement, l'intensité de l'activité biologique ne dépasse pas celle de composés commerciaux déjà en cours d'utilisation pour les pathologies étudiées. Cependant, comme ceux-ci sont généralement très peu toxiques pour les animaux, de grandes quantités peuvent être absorbées sans danger. C'est pourquoi une utilisation comme produits nutraceutiques peut être envisagée. Dans ce cas, les composés agissent comme agents chémopréventifs [Pezzuto, J. M.; 1995].

2.3.1. Activités antitumorales

L'intérêt pour les dérivés du lupane est principalement dû à leurs activités antitumorales. L'un des composés les plus spectaculaires est sans doute l'acide bétulinique (3). En effet, son activité antitumorale (IC_{50} : 1.1-4.8 $\mu\text{g/mL}$) a d'abord été démontrée sur des mélanomes humains, un type de cancer de la peau [Pisha, E. *et al.*; 1995; Das Gupta, T. K. et Pezzuto, J. M.; 1997]. Dans cette étude, l'acide bétulinique (3) montre une sélectivité très forte envers les mélanomes, par rapport à d'autres lignées de cellules

cancéreuses. De plus, un test préliminaire *in vivo* a été effectué sur des souris athymiques infectées par des mélanomes humains. Tous les animaux survivent avec un traitement à l'acide bétulinique (3), même ceux chez qui le cancer avait déjà progressé [Pisha, E. *et al.*; 1995]. Il est intéressant de noter que des souris saines ont été traitées avec de très fortes doses d'acide bétulinique (3) sans observer une quelconque toxicité. La forte activité antitumorale de l'acide bétulinique (3) a motivé l'équipe de chercheurs de l'Université de l'Illinois à protéger l'utilisation de ce composé et de certains de ses dérivés [Das Gupta, T. K. et Pezzuto, J. M.; 1997; Pezzuto, J. M. *et al.*; 1999a et Pezzuto, J. M. *et al.*; 1999b].

Une activité antitumorale a été démontrée sur d'autres cellules que les mélanomes (Tableau 1), contredisant ainsi les travaux de Pisha, E. *et al* [Fulda, S. *et al.*; 1999a; Wick, W. *et al.*; 1999; Kim, Y.-K.; 2000; Setzer, W. N. *et al.*; 2000]. D'ailleurs, les traitements de la leucémie, des lymphomes, des cancers de la prostate, du poumon et des ovaires par l'acide bétulinique (3) et ses dérivés sont protégés par un brevet [Ramadoss, S. *et al.*; 2000]. Finalement, l'activité *ex vivo*^a de l'acide bétulinique (3) a été démontrée sur des neuroblastomes (IC₅₀ : 1-5 µg/mL), des medulloblastomes (IC₅₀ : 3-13.5 µg/mL), des glioblastomes (IC₅₀ : 2-17 µg/mL) [Fulda, S. *et al.*; 1999a], une tumeur du sein et une tumeur de l'estomac [Nagourney, R. A. *et al.*; 1996].

^a Sur des organes d'individus morts

Tableau 1 : Activité antitumorale *in vitro* de l'acide bétulinique (3)

Tissu	Lignée cellulaire	IC ₅₀ (µg/ml)	Référence
Cerveau	XF498	3.8	Kim, Y.-K. <i>et al.</i> ; 2000
Colon	COL-2	> 20	Pisha, E. <i>et al.</i> ; 1995
	HT-29	> 100	Fulda, S. <i>et al.</i> ; 1999a
	HCT15	3.7	Kim, Y.-K. <i>et al.</i> ; 2000
Épithélium	KB	> 20	Miles, D. H. <i>et al.</i> ; 1974 Pisha, E. <i>et al.</i> ; 1995 Jeong, H.-J. <i>et al.</i> ; 1999
Fibrosarcome	HT-80	> 20	Pisha, E. <i>et al.</i> ; 1995
Foie	Hep-G2	15.5	Setzer, W. N. <i>et al.</i> ; 2000
Glioblastomes	U373	> 20	Pisha, E. <i>et al.</i> ; 1995
	A172, U118MG, U138MG, U251MG, U343, U373, SK14, SK17, SK19, SK22, SK37, SK49, SK51, SK55, SK60	5-16	Fulda, S. <i>et al.</i> ; 1999a
	T98G	11.4	Wick, W. <i>et al.</i> ; 1999
	Daoy, D283 Med, D341 Med, MHH1, MHH3, MHH4, MEB1	3-15	Fulda, S. <i>et al.</i> ; 1999a
Neuroblastomes	SHEP, IMR-32, Kelly, LAN 5	3-10	Fulda, S. <i>et al.</i> ; 1999a
Ovaire	SK-OV-3	3.8	Kim, Y.-K. <i>et al.</i> ; 2000
Peau	MEL1, MEL2, MEL3, MEL4	1.1-4.8	Pisha, E. <i>et al.</i> ; 1995
	SK-MEL-3	2.5	Kim, Y.-K. <i>et al.</i> ; 2000
	A431	> 20	Pisha, E. <i>et al.</i> ; 1995
Poumon	LU-1	> 20	Pisha, E. <i>et al.</i> ; 1995
	H-146	> 100	Fulda, S. <i>et al.</i> ; 1999a
	A549	2.0	Kim, Y.-K. <i>et al.</i> ; 2000
Prostate	LNCaP	> 20	Pisha, E. <i>et al.</i> ; 1995
Sarcomes d'Ewing	A17/95, TC83	2-7	Fulda, S. <i>et al.</i> ; 1999a
Sein	BC-1	> 20	Pisha, E. <i>et al.</i> ; 1995
	MCF-7	> 100	Fulda, S. <i>et al.</i> ; 1999a
	MDA-MB-231	4.4	Setzer, W. N. <i>et al.</i> ; 2000

Le mécanisme d'action de l'acide bétulinique (3) est bien documenté, quoique de nombreuses questions restent encore à élucider. Une première étude [Swanson, S. M. *et al.* ; 1999] montre que l'acide bétulinique (3) agit à l'intérieur de la cellule sans nécessiter une quelconque transformation. En observant au microscope les cellules affectées par

l'acide bétulinique (3) [Pisha, E. *et al.*; 1995], on remarque qu'elles meurent toutes par apoptose, un mécanisme complexe de mort cellulaire programmée (Figure 5).

Les caractéristiques morphologiques d'une cellule mourant par apoptose [Thornberry, N. A. et Lazebnik, Y.; 1998] sont la fragmentation de l'ADN, la condensation de la chromatine, la formation de protubérances membranaires, une contraction cellulaire et le désassemblage de la cellule en multiples vésicules (corps apoptotiques). Ces événements sont causés par le travail de protéases spécifiques, les caspases. Celles-ci sont présentes dans la cellule sous forme inactive et ne demandent qu'un signal pour agir. Les deux principaux signaux sont générés par les protéines du gène p53, apparaissant suite à des dommages sur l'ADN, et les récepteurs-ligands « death » de type CD95/CD95L ou TNF [Hengartner, M. O.; 2000]. Dans les deux cas, la mitochondrie est impliquée puisqu'elle libère des agents (cytochrome c, Smac/DIABLO, AIF) nécessaires pour la poursuite de la cascade apoptotique [Green, D. R. et Reed, J. C.; 1998].

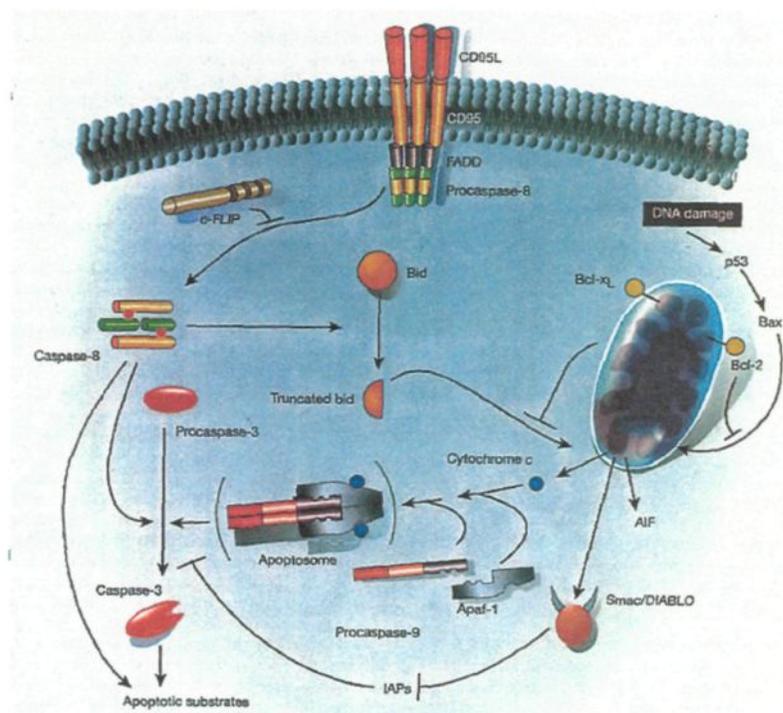


Figure 5: Mécanisme biochimique de l'apoptose [Hengartner, M. O.; 2000]

Il a été démontré que le gène p53 et le complexe récepteur-ligand CD95/CD95L ne sont pas impliqués dans le mécanisme d'action de l'acide bétulinique (3) [Fulda, S. *et al.*; 1997], bien que ces résultats aient été contredits dans une autre étude [Rieber, M. et Strasberg-Rieber, M.; 1998]. L'acide bétulinique (3) provoquerait la libération du matériel mitochondrial dans le cytoplasme provoquant ainsi la cascade apoptotique [Fulda, S. *et al.*; 1998]. De plus, il a été démontré que certaines procaspases sont activées lors du traitement, comme les caspases 3, 8 et PARP [Fulda, S. *et al.*; 1999b]. Des cellules mutantes qui synthétisent de grandes quantités de Bcl-2, des protéines anti-apoptotiques, sont insensibles aux traitements avec l'acide bétulinique (3) [Fulda, S. *et al.*; 1999a], ce qui appuie l'hypothèse que la mitochondrie est le site d'action du composé. Évidemment, pour

que l'apoptose ait lieu, la synthèse de protéine est nécessaire. Un inhibiteur de la synthèse de protéines, la cycloheximide, inhibe aussi l'action de l'acide bétulinique (3) [Wick, W. *et al.*; 1999].

Dans l'étude d'un nouvel agent thérapeutique, il est commun de synthétiser des analogues dans le but de trouver des formes plus actives. Une première étude indique que de légères modifications aux fonctions alcool en position 3 et acide carboxylique en position 28 diminuent l'activité biologique [Kim, D. S. H. L. *et al.*; 1998]. Après l'injection d'une dose d'acide bétulinique (3), le gras périnéal, la vessie, les nœuds lymphatiques, les ovaires et les glandes mammaires sont les organes qui contiennent le plus d'acide bétulinique (3) alors que la peau en reçoit très peu [Udeani, G. O. *et al.*; 1999]. Cette faible biodisponibilité s'explique par la faible hydrosolubilité de l'acide bétulinique (3). Pour contourner cet obstacle, des segments d'acides aminés ont été greffés à l'acide bétulinique (3) en position 28 [Jeong, H. J. *et al.*; 1999]. Ainsi, avec l'alanine, l'hydrosolubilité de l'acide bétulinique (3) se trouve augmenté d'un facteur de 30 à 50, et l'activité anti-tumorale d'un facteur 1.5 à 3.

Le 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) est un agent chimique très utilisé pour l'étude rapide de l'activité anti-inflammatoire. Ce composé, lorsqu'appliqué sur la peau, provoque la formation d'un œdème [Yasukawa, K. *et al.*; 1991] et active les carcinomes initiés par le 7,12-diméthylbenz[a]anthracène (DMBA) [Yasukawa, K. *et al.*; 2000]. Ainsi, l'acide bétulinique (3), le bétulinol (2) et le lupéol (1) protègent les oreilles de souris contre la formation d'œdème provoqué par le TPA [Yasukawa, K. *et al.*; 1991].

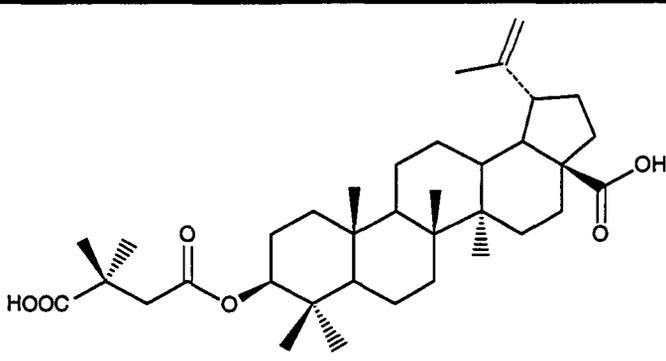
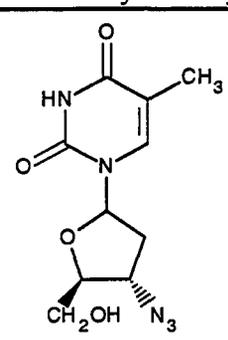
Dans la même étude, il est démontré que l'ornithine décarboxylase (ODC) s'accumule dans les tissus affectés par le TPA, mais pas dans ceux protégés par les lupanes. Les glucocorticoïdes sont impliqués dans le mécanisme d'action de la protection des lupanes [Recio, M. D. C. *et al.*; 1994]. Finalement, plusieurs autres études démontrent de différentes façons l'activité anti-inflammatoire des lupanes [Máñez, S. *et al.*; 1997; Kinoshita, K. *et al.*; 1999 et Yasukawa, k. *et al.*; 2000].

L'activité antitumorale de l'acide bétulinique (3) a été clairement démontrée. Cependant, d'autres molécules de la famille du lupane sont actives sur les cellules tumorales. C'est le cas du lupéol (1) et du bétulinol (2) qui démontrent une activité envers les cellules cancéreuses SWA16 (cellules intramusculaires) [Sheth, K. *et al.*; 1973].

2.3.2. Activité anti-VIH

Dans le cadre d'un programme de recherche systématique d'agents naturels antiviraux, il a été démontré que les feuilles de *Syzygium claviflorum* possédaient un composé actif contre le VIH [Fujioka, T. *et al.*; 1994]. Suite à une étude plus approfondie, l'acide bétulinique (3) a été identifié comme étant l'un des principes actifs de l'extrait. D'autres chercheurs, déjà au courant de cette activité, ont préparé des dérivés d'acide bétulinique (3) afin d'en bonifier l'activité [Mayaux, J.-F. *et al.*; 1994; Evers, M. *et al.*; 1996; Soler, F. *et al.*; 1996]. Cependant, cette équipe n'a jamais réussi à surpasser les résultats obtenus avec l'acide 3-O-(3',3'-dimethylsuccinyl)-bétulinique (6) [Kashiwada, Y. *et al.*; 1996]. En effet, l'activité des dérivés du même type est comparable à celle du 3'-azido-3'-deoxythimidine (7, AZT), un médicament couramment utilisé (Tableau 2).

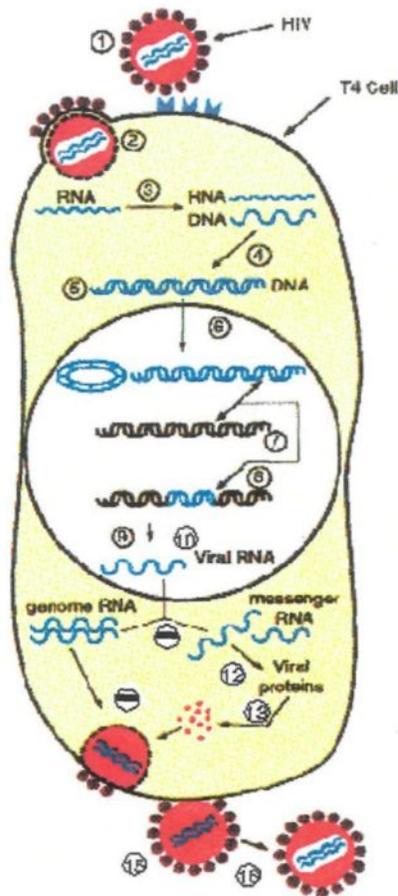
Tableau 2: Composés anti-VIH

Molécules	EC ₅₀ (μM) ^a	IC ₅₀ (μM) ^b	TI ^c
 <p>Acide 3-O-(3',3'-dimethylsuccinyl)-bétulinique (6)</p>	< 3.5×10 ⁻⁴	7	> 20000
 <p>AZT (3'-azido-3'-deoxythymidine) (7)</p>	0.15	1875	12500

^a Dose pour inhiber 50% de l'activité du virus. ^b Dose pour tuer 50% des cellules hôtes. ^c Indice thérapeutique. Indique la sélectivité du composé envers l'agent pathogène. Un indice élevé signifie que le composé est très toxique pour le virus mais peu toxique pour la cellule hôte.

L'activité du composé (6) devient presque nulle si le traitement est retardé de 60 minutes [Mayaux, J.-F. *et al.*; 1994]. Ce résultat suggère que la molécule agit dans les premiers stades du cycle viral (Figure 6), bien que la fusion entre le virus et la cellule ne soit pas impliquée (étape 2, Figure 6). L'activité anti-VIH du composé (6) est nulle sur des VIH ayant des protéines g41 mutantes [Labrosse, B. *et al.*; 1997], ce qui laisse croire que cette protéine est impliquée dans le mécanisme d'action (Figure 7). En plus, l'activité des

protéases, des enzymes qui permettent la maturation du VIH, est inhibée par d'autres dérivés d'acide bétulinique (3) [Ma, C. *et al.*; 1999]. Cependant, aucune corrélation entre l'activité anti-VIH et l'activité anti-protéase de ces dérivés n'a été démontrée.



Légende

1. Attachement du virus
2. Fusion
3. Transcription inverse
4. Dégradation de la RNaseH
5. Synthèse de la double hélice
6. Migration vers le noyau
7. Intégration
8. Latence
9. Première transcription
10. Deuxième transcription
11. Construction de l'ARN virale
12. Synthèse de protéines virales
13. Glycosylation des protéines virales
14. Assemblage du virus
15. Bourgeonnement du virus
16. Maturation du virus (protéase)

Figure 6: Cycle vital du VIH [www.niaid.nih.gov/factsheets/howhiv.htm]

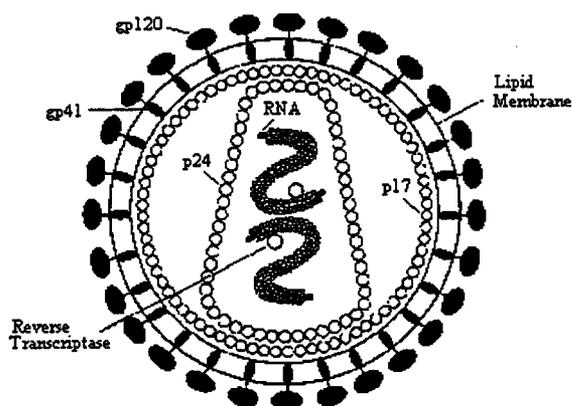


Figure 7: VIH [www.niaid.nih.gov/factsheets/howhiv.htm]

2.3.3. Autres activités thérapeutiques

En plus des activités antitumorales et anti-VIH, l'acide bétulinique (3) démontre plusieurs autres activités biologiques. D'abord, il a été démontré que l'activité de la β -polymérase, une enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN, est inhibée par l'acide bétulinique (3) [Ma, J. *et al.*; 1999]. Ainsi, l'activité de la bléomycine, un agent antitumoral qui agit en causant des dommages à l'ADN des cellules cancéreuses, est bonifiée par l'acide bétulinique (3). En effet, comme la β -polymérase est inhibée, les dommages causés par la bléomycine ne peuvent plus être réparés, provoquant ainsi la mort cellulaire.

Un dérivé de l'acide bétulinique (8) (Figure 8) démontre une activité antibactérienne très intéressante. En effet, sa toxicité envers *Staphylococcus epidermidis* (8 $\mu\text{g/mL}$) est comparable au chloramphenicol (4 $\mu\text{g/mL}$), un antibiotique courant [Schühly, W. *et al.*; 1999]. Dans cette étude, l'acide bétulinique (3) n'a pas démontré de

toxicité aux concentrations testées (jusqu'à 128 $\mu\text{g/mL}$). Cependant, pour d'autres souches bactériennes (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pneumoniae*), l'acide bétulinique (3) (5.25, 2.63 et 0.33 $\mu\text{g/mL}$) se compare au sulfate de gentamicin (2.14, 1.07 et 2.12 $\mu\text{g/mL}$) [Setzer, W. N. *et al.*; 2000].

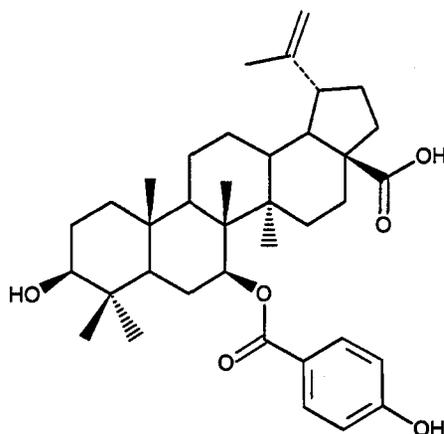


Figure 8: Acide 7 β -(4-hydroxybenzoyloxy)-bétulinique (8), un anti-bactérien

Le parasite *Plasmodium falciparum* est l'agent causant l'une des maladies les plus meurtrières au monde : la malaria. En 1993, de 300 à 500 millions de personnes ont été affectées par le parasite et de 1 à 2 millions de celles-ci en sont mortes [Steele, J. C. P. *et al.*; 1999]. Des tests *in vitro* démontrent une activité pour l'acide bétulinique (3) (IC_{50} = 10.46 $\mu\text{g/mL}$), mais très faible en comparaison avec la chloroquine (IC_{50} = 0.005 $\mu\text{g/mL}$) [Bringmann, G. *et al.*; 1997]. D'autres études démontrent que le mécanisme d'action de l'acide bétulinique (3) est différent de celui de la chloroquine puisque des parasites résistants à ce dernier sont tout de même sensibles à l'acide bétulinique (3). De plus, des tests *in vivo* décevants laissent croire que l'acide bétulinique (3) est rapidement métabolisé

ou que sa liposolubilité l'empêche d'atteindre son site d'action [Steele, J. C. P. *et al.*; 1999].

L'herpes est une maladie qui affecte plus d'un million de personnes par année aux États-Unis. Cette maladie est causée par une classe de virus de plusieurs types incluant le virus Epstein-Barr. Le médicament utilisé actuellement pour traiter cette maladie est l'acyclovir. Des tests biologiques ont démontré que le bétulinol (2) tue les virus de l'herpes, et ce, à plus faible dose que l'acyclovir [Carlson, R. M. *et al.*; 1998].

Lorsque le cadmium est administré aux animaux sous forme de CdCl_2 , celui-ci s'accumule principalement dans le foie, d'où son hépatotoxicité très élevée [Miura, N. *et al.*; 1999]. Les mêmes observations tiennent si la lignée cellulaire HepG2, issue d'un foie humain, est mis en contact avec le CdCl_2 . Cependant, si ces mêmes cellules sont préalablement traitées avec le bétulinol (2), leur sensibilité au cadmium diminue considérablement [Miura, N. *et al.*; 1999]. Pour ce faire, il faut que les cellules soient en présence de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ de bétulinol (2) pendant 2 h, et ce, 24 h avant l'exposition au cadmium. Ce traitement n'empêche pas le cadmium de s'accumuler à l'intérieur de la cellule. Le bétulinol (2) agit en activant la transcription d'un gène codant une protéine qui protège la cellule.

L'oxalate de calcium est responsable de la formation de calculs sur les reins et dans la vessie. Cette pathologie est intrinsèquement reliée à la formation de radicaux libres à l'intérieur des cellules [Malini, M. M. *et al.*; 2000]. Ainsi, lorsque la formation de pierres chez le rat est provoquée, le taux d'agents antioxydants (non enzymatiques et

enzymatiques) diminue. Si les rats sont nourris avec du lupéol (1) ou du bétulinol (2), le taux d'agents antioxydants se rapproche de la normale et l'accumulation d'oxalate de calcium diminue [Malini, M. M. *et al.*; 2000].

Le collagène est la protéine qui est responsable de l'élasticité de la peau. Cette protéine est détruite avec l'âge et l'exposition aux rayons UV. En stimulant la synthèse du collagène, il est possible de faire disparaître les rides et d'améliorer l'efficacité des traitements de la cellulite. Lorsqu'appliqué sur la peau sous forme d'onguent, l'acide bétulinique (3) augmente la synthèse de collagène d'un facteur six. Ainsi, il est possible de croire que l'utilisation d'une crème à base d'acide bétulinique (3) pourrait prévenir l'apparition des rides [Cho, S. H. *et al.*; 1996].

2.4. EXTRACTION ET PURIFICATION

Pour chaque composé naturel, plusieurs méthodes sont disponibles afin de les extraire et de les purifier. Le choix du solvant d'extraction est très important puisqu'il détermine la quantité et la composition de l'extrait brut. Il est important que le contenu en bétulinol (2) dans l'extrait brut soit le plus élevé possible afin de faciliter la purification. Les solvants chlorés semblent le meilleur choix en raison de leur rendement d'extraction élevé et de leur faible contenu en produits indésirables [Eckerman, C. *et Ekman, R.*; 1995]. Il est possible de purifier le bétulinol (2) par chromatographie sur silice. Cette méthode possède l'avantage que le bétulinol (2) qui est obtenu est d'une grande pureté. Cependant, cette technique est très coûteuse en silice, en solvant et en temps. De plus, la production de

bétulinol (2) à grande échelle (>5g) n'est pas possible par chromatographie avec l'équipement de laboratoire usuel. C'est pourquoi la recristallisation a été choisie comme méthode de purification. Avec un mélange azéotropique d'eau et de 2-butanol, le bétulinol (2) brut, dont la pureté est de 62%, est recristallisé avec un rendement de 83% pour obtenir du bétulinol (2) à 83% de pureté [Eckerman, C. et Ekman, R.; 1995].

2.5. STRATÉGIE DE SYNTHÈSE

Le composé possédant la plus grande activité biologique parmi les membres de la famille du lupane est l'acide bétulinique (3). Malheureusement, ce composé n'est que très peu concentré dans les extraits étudiés [Pavanasasivam, G. et Sultanbawa, M. U. S.; 1974]. L'arbre qui en contient le plus (3.3%), le platane (*Platanus acerifolia*), pousse en Europe et n'est donc pas rapidement accessible pour les besoins de la recherche [Galgon, T. *et al.*; 1999].

Cependant, une molécule très proche, le bétulinol (2), présente à très forte concentration dans l'écorce du bouleau blanc [O'Connell, M. M. *et al.*; 1988], peut être transformée en acide bétulinique (3) par une réaction d'oxydation. En effet, la seule différence structurale entre le bétulinol (2) et l'acide bétulinique (3) réside dans l'état d'oxydation du carbone 28 (alcool ou acide carboxylique). Malheureusement, les réactifs usuels d'oxydation d'alcool primaire en fonction acide carboxylique sont très peu sélectifs. Ils oxydent donc en parallèle la fonction alcool en position 3 pour obtenir l'acide bétulonique (9) [Kim, D. S. H. L. *et al.*; 1997]. Dans cette étude, l'acide bétulonique (9)

obtenue est réduite sélectivement avec le borohydrure de sodium (NaBH_4) en acide bétulinique (3) (Figure 9). Le désavantage de cette voie de synthèse est l'obtention d'une faible quantité de l'épimère α en position 3 nécessitant ainsi une étape supplémentaire de purification.

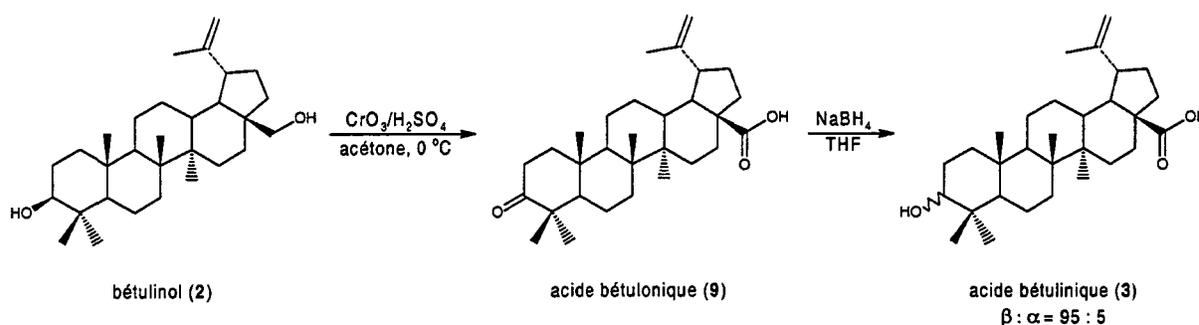


Figure 9: Synthèse de l'acide bétulinique (3) à partir du bétulinol (2) par oxydation non sélective [Kim, D. S. H. L. *et al.*, 1997]

Conscients de ce problème, les mêmes chercheurs ont proposé une autre voie synthétique (Figure 10). Elle consiste à protéger sélectivement la fonction alcool primaire (10) avec un groupement tétrahydropyranne (THP). L'autre fonction alcool est ensuite protégée avec un groupement acétate (11). Ce dernier résiste au milieu réactionnel utilisé pour enlever le groupement THP qui protège la fonction alcool primaire (12). Une oxydation avec le réactif de Jones suffit à transformer cette fonction alcool en acide carboxylique (13). Finalement, il suffit, pour obtenir l'acide bétulinique (3), d'enlever le groupement protecteur acétoxy sur la fonction alcool secondaire [Kim, D. S. H. L. *et al.*, 1997]. Les deux dernières méthodes (Figure 9 et Figure 10), bien que moyennement efficaces, ont fait l'objet d'un brevet [Pezzuto, J. M. et Kim, D. S. H. L.; 1998]

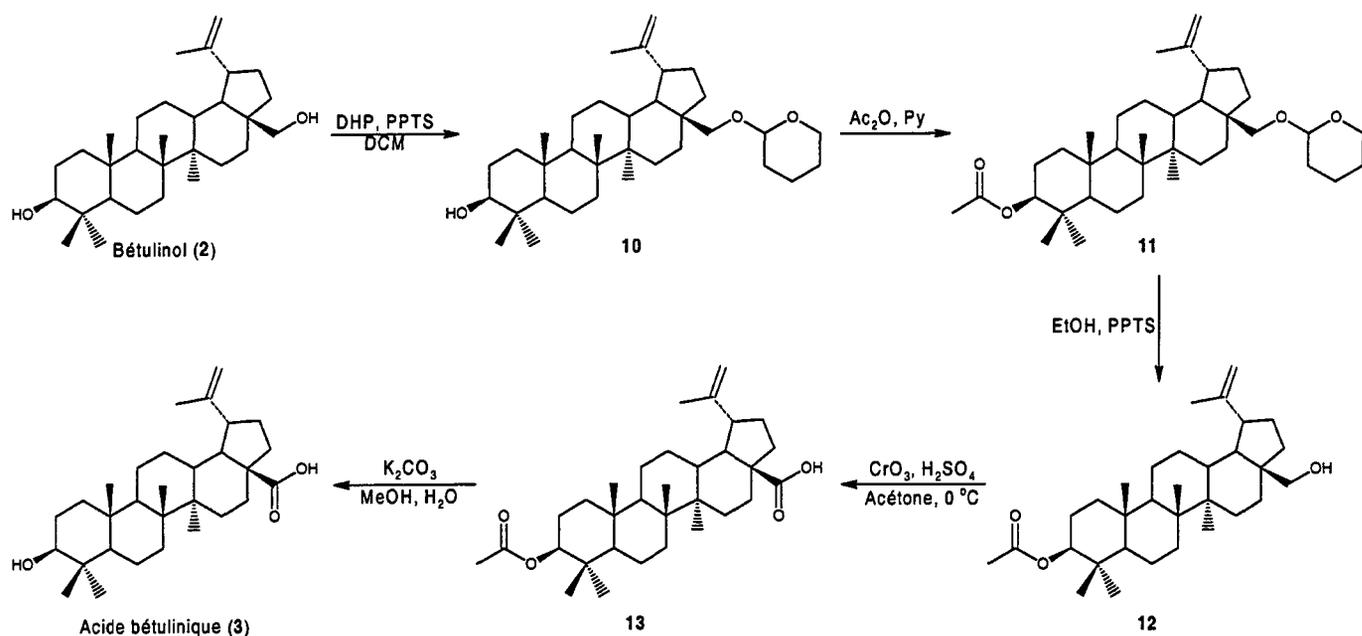


Figure 10: Synthèse de l'acide bétulinique (3) à partir du bétulinol (2) par protection sélective [Kim, D. S. H. L. *et al.*, 1997]

La synthèse envisagée par notre groupe de recherche consiste à oxyder la fonction alcool primaire en utilisant des conditions douces de réaction. Le but du projet est d'oxyder sélectivement l'alcool primaire sans affecter l'alcool secondaire pour obtenir le bétulinol (14). Cette molécule pourra par la suite être facilement transformée en acide bétulinique (3), puisqu'il existe des réactifs oxydants spécifiques aux aldéhydes (Figure 11).

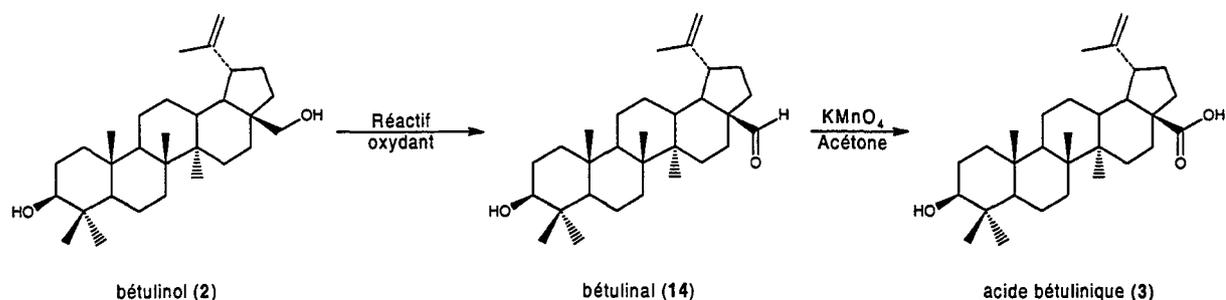


Figure 11: Synthèse de l'acide bétulinique (3) via le bétulinolal (14)

Durant les différents essais, d'autres dérivés d'oxydation du bétulinol (2) pourront être obtenus. Si l'alcool secondaire est oxydé sélectivement, la bétulone (15) est obtenue. Si les deux fonctions alcools sont oxydés sans sélectivité, c'est le bétulinolal (16) qui est obtenu (Figure 12). Ainsi, la sélectivité d'un réactif pourra être déterminée en comparant la quantité de chaque dérivé d'oxydation.

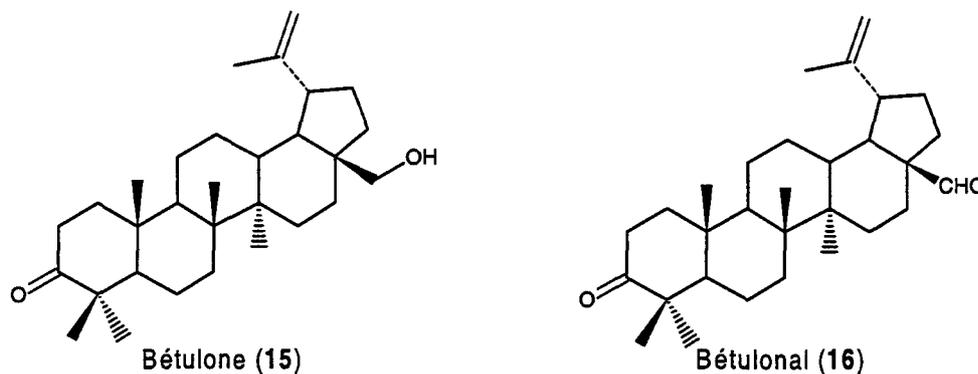


Figure 12 : Sous-produits possible de l'oxydation du bétulinol (2)

2.6. DÉRIVÉS DE RÉARRANGEMENTS

Avant de poursuivre, il est important de connaître le réarrangement bétulinol (2)/allobétulinol (18) (voir mécanisme à l'annexe 3). En effet, lorsque le

bétulinol (2) est mélangé avec certains acides (HCl, HBr, HCOOH, Fe(NO₃)₃, FeCl₃), il subit un réarrangement irréversible pour se transformer en allobétulinol (18) [Schulze, H. et Pieroh, K.; 1922; Dischendorfer, O.; 1923; Barton, D. H. R. *et al.*; 1952; Lawrie, W. *et al.*; 1960; Barton, D. H. R. *et al.*; 1967; Errington, S. G. *et al.*; 1976]. Ce réarrangement doit être gardé à l'esprit lors des réactions d'oxydations, souvent effectuées en milieu acide [Ikan, R.; 1969].

2.7. RÉACTIFS OXYDANTS

La première étape de la stratégie de synthèse choisie consiste à oxyder sélectivement une fonction alcool primaire en présence d'une fonction alcool secondaire. Pour effectuer cette transformation, il existe plusieurs réactifs très variés [March, J.; 1992]. Pour choisir le bon réactif, il faut d'abord s'assurer qu'il répond à certains critères. Le premier critère est que le réactif doit agir dans un solvant organique capable de dissoudre le bétulinol (2) : DMSO, DMF, THF, EtOAc, acétone, CHCl₃ et DCM. De plus, il faut qu'il ait une certaine sélectivité envers les fonctions alcools primaires par rapport aux alcools secondaires. Finalement, le réactif choisi doit être inerte vis-à-vis de la double liaison présente sur le bétulinol (2).

Le réactif utilisé par Kim *et al.*; 1997, le réactif de Jones, ne possède pas de sélectivité puisqu'il oxyde aussi bien la fonction alcool primaire que la fonction alcool secondaire. Il en est de même pour d'autres réactifs comme le réactif de Swern, le KMnO₄ et les réactifs à base de chrome (PDC, PCC et réactif de Collin) [March, J.; 1992].

D'autres réactifs sont rapportés dans la littérature comme des oxydants sélectifs. C'est le cas du réactif de Dess-Martin, du N-méthyl-morpholine-N-oxide qui régénère le catalyseur perruthénate de tétrapropylammonium (TPAP/NMO), du 2,2,6,6-tétraméthylpypéridyloxyde (TEMPO) et du dichlorotris(triphénylphosphine)ruthénium ($\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3$) [March, J.; 1992]. Cependant, comme ces réactifs sont coûteux et pas toujours facile à utiliser, d'autres types de réactifs ont été envisagés.

Les réactifs adsorbés sur support solide possèdent des caractéristiques très intéressantes. D'abord, comme le réactif est adsorbé sur la surface d'un matériau solide, il n'est pas nécessaire qu'il soit soluble dans les solvants organiques. La réaction peut alors être vue comme une réaction biphasée. Aussi, une sélectivité réactionnelle a déjà été démontrée pour certaines réactions sur des fonctions alcools. Par exemple, un alcool primaire est acétylé sélectivement avec $\text{NaHSO}_4/\text{EtOAc}/\text{SiO}_2$ dans l'hexane [Breton, G. W.; 1997]. Un autre exemple montre qu'un alcool peut être oxydé avec $\text{CrO}_3/\text{Al}_2\text{O}_3$ en fonction carbonyle (aldéhyde ou cétone) sans solvant et sans suroxydation jusqu'à l'acide carboxylique [Varma, R. S. et Saini, R. K.; 1998]. Un autre avantage très important est que le milieu réactionnel ne nécessite pas de traitement complexe à la fin de la réaction. Une simple filtration suffit pour enlever les réactifs et recueillir les produits de réaction [Laszlo, P.; 1990]. Pour ces raisons, plusieurs réactifs seront adsorbés sur la silice ou l'alumine afin de vérifier une possible sélectivité [Khadilkar, B. et Borkar, S.; 1985; Khadilkar, B. *et al.*; 1996].

Les mécanismes réactionnels des réactifs oxydants ne sont pas tous connus. Cependant, le mécanisme d'oxydation du réactif à base de chrome peut être raisonné en regardant le mécanisme d'oxydation de l'acide chromique (H_2CrO_4) présenté à l'annexe 2.

2.8. RÉACTION D'ESTÉRIFICATION

Dans les livres de chimie organique usuels, on apprend qu'une fonction alcool et qu'une fonction acide carboxylique réagissent ensemble pour former une fonction ester (Figure 13). Au cours de ce processus, une molécule d'eau est créée sous une forme quelconque. Comme la réaction atteint un équilibre avant qu'elle soit terminée, il est important d'ajuster les conditions réactionnelles afin de pousser l'équilibre vers la formation de produits. Si l'ester formé est une petite molécule, il est possible de le distiller aussitôt formé [Vogel, A. I. et Furniss, B. S. ; 1994]. Dans le cas de l'allobétulinol (**18**), cette solution n'est pas envisageable.

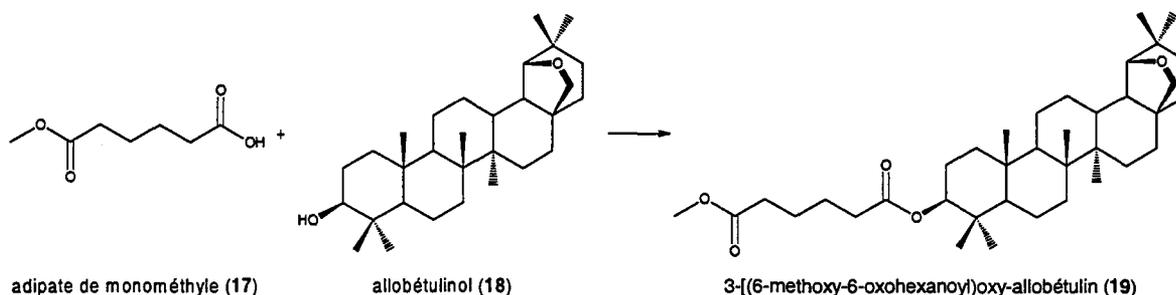


Figure 13: Formation d'un ester via le couplage acide carboxylique / alcool

Si la molécule d'eau formée durant le couplage est retirée du milieu réactionnel, l'équilibre sera déplacé vers la formation des produits. Il existe plusieurs stratégies pour

arriver à cette fin. La première consiste à utiliser l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl-N-oxytris(diméthylamino)phosphonium (27, BOP) dans l'acétonitrile, le dichlorométhane, l'acétone ou le diméthylformamide [Castro, B. *et al.*; 1975]. Dans ce cas, l'espèce qui réagit avec l'alcool n'est pas un anhydride mais un ester de benzotriazole, une molécule très réactive (voir mécanisme à l'annexe 2). Par la suite, l'alcool se substitue au benzotriazole pour former l'ester désiré (Figure 14).

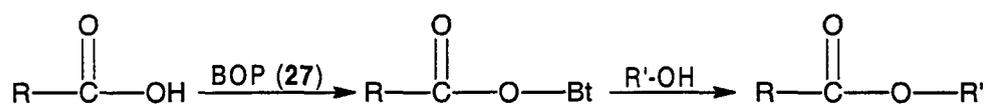


Figure 14: Estérification avec BOP (27)

La seconde stratégie consiste à préparer un chlorure d'acide, un dérivé très réactif envers les nucléophiles (Figure 15). Le chlorure de thionyle (SOCl_2) est utilisé pour préparer ce dérivé (voir mécanisme à l'annexe 2). Au cours de la réaction, du dioxyde de soufre (SO_2) est libéré ce qui force la réaction vers la formation de produits. L'alcool est ensuite ajouté au milieu réactionnel avec une base comme la triéthylamine (Et_3N).

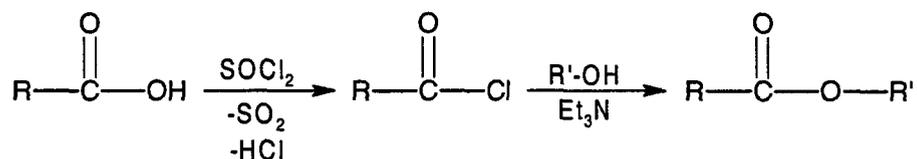


Figure 15: Estérification via le chlorure d'acide

La dernière stratégie consiste à utiliser le dicyclohexylcarbodiimide (29, DCC) avec le diméthylaminopyridine (31, DMAP) comme catalyseur [Hassner, A. et Alexanian, V.; 1978; Ziegler, F. E. et Berger, G. D.; 1979]. Dans ce cas, deux fonctions acide

carboxylique réagissent avec le DCC (**29**) pour former l'anhydride correspondant (voir mécanisme à l'annexe 2). Durant ce processus, une molécule de dicyclohexylurée (DCU (**30**) = DCC (**29**) + H₂O) précipite dans la solution, forçant ainsi la réaction vers la formation de produit (Figure 16). Le couplage alcool / anhydride s'effectue ensuite en présence de DMAP (**31**), un catalyseur très efficace pour les réactions d'acylation [Höfle, G. *et al.*; 1980].

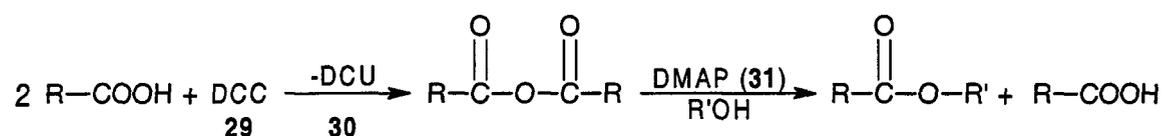


Figure 16: Estérification avec DCC (**29**) et DMAP (**31**)

CHAPITRE 3
MÉTHODOLOGIE

3.1. CONSIDÉRATION GÉNÉRALE

La provenance et le grade de tous les réactifs et solvants utilisés dans cette recherche sont détaillés au Tableau 3.

Les chromatographies sur couche mince, effectuées sur des plaques de verre recouvertes de $250\mu\text{m}$ de silice, ont été achetées chez Silicycle. Celles-ci sont imprégnées d'une substance fluorescente à l'UV (F-254) pour détecter les substances organiques. Malheureusement, les triterpènes ne peuvent être détectés par UV. L'acide molybdate d'ammonium cérique (CAM) est donc utilisé à cette fin en y plongeant les CCM puis en les chauffant sur une plaque chauffante. Le CAM est préparé en dissolvant 10 g de sulfate d'ammonium cérique $[\text{Ce}(\text{SO}_4)_4(\text{NH}_4)_4]$, 25 g de molybdate d'ammonium $[\text{MoO}_4(\text{NH}_4)_2]$ et 100 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) dans l'eau pour un volume total de 1L.

Tableau 3 : Provenance et grade des réactifs et solvants

Produit	Provenance	Grade
2-Butanol	Laboratoire MAT	99%
Acétone	Laboratoire MAT	Réactif A.C.S., 99.5%
AcOH, glacial	Fisher Scientific	Réactif A.C.S., 99.7%
Adipic acid, mono-méthyl ester (17)	Omega	99%
AgNO ₃	Anachemia	Réactif A.C.S., 99%
Al ₂ O ₃	Anachemia, 80-200 mesh	Chromatographique
BOP (27)	Provenance inconnue	Grade inconnu
CDCl ₃	Aldrich	99.8%
Ce(SO ₄) ₄ (NH ₄) ₄ · 2H ₂ O	J. T. Baker	102.4%
CrO ₃	Fisher Scientific	Réactif A.C.S.
DCC (29)	Omega	99%
DCM	Anachemia	Réactif A.C.S., 99.5%
Diazald (32)	Aldrich	99%
DMAP (31)	Aldrich	99%
DMF	Aldrich	Réactif A.C.S., 99.8%
DMSO	Omega	HPLC, 99.9%
Et ₃ N	Kodak, Eastman	Grade inconnu
EtOAc	Anachemia	Réactif A.C.S., 99.5%
Fe(NO ₃) ₃ · 9H ₂ O	BDH	99%
FeCl ₃ · 6H ₂ O	BDH	98%
H ₂ SO ₄	Anachemia	Réactif A.C.S., 95-98%
HCl	Anachemia	Réactif A.C.S., 36.5-38%
Hexane	Anachemia	HPLC, 99.9%
KMnO ₄	Fisher Scientific	Réactif A.C.S.
KOH	Fisher Scientific	86.5%
MeOH	Anachemia	Réactif A.C.S., 99.8%
MoO ₄ (NH ₄) ₂	J. T. Baker	85%
Na ₂ SO ₄	Provenance inconnue	Grade inconnu
NMO	Fluka	97%
PDC	Aldrich	98%
Pyridine	BDH	99%
SiO ₂	Silicycle, 230-400 mesh, 60 A	Ultrapure
SOCl ₂	Aldrich	99.5%
Tamis moléculaire	Fisher Scientific, 14-30 mesh, 4A	Grade 516
THF	Anachemia	HPLC, 99.9%
Toluène	Anachemia	HPLC, 99.9%
TPAP	Fluka	97%

3.2. EXTRACTION DU BÉTULINOL (2)

L'écorce externe du bouleau est réduite en fines particules à l'aide d'un broyeur mécanique industriel. L'écorce (100 g) est ensuite submergée dans le dichlorométhane (1 L) et macérée à reflux pendant 2h. Après une filtration sous pression réduite, l'écorce est rincée avec 1 L de dichlorométhane. Le bétulinol (2) brut est recueillie en séchant avec du Na₂SO₄, puis en évaporant le dichlorométhane.

3.3. PURIFICATION DU BÉTULINOL (2) PAR RECRISTALLISATION

Tout d'abord, le bétulinol (2) brut est broyé en fine poudre pour faciliter la dissolution. Ensuite, ce dernier (2, 20 g) est dissous dans une solution azéotrope bouillante d'eau et de 2-butanol (200 mL, 26.8% eau et 73.2% 2-butanol) [Eckerman, C. et Ekman, R.; 1985]. La solution est ensuite filtrée sous pression réduite avec un entonnoir chaud. La solution résiduelle est d'abord refroidie à température ambiante puis dans un bain froid d'eau, de glace et de sel. Les cristaux obtenus sont récupérés par filtration sous vide. Deux ou trois recristallisations successives sont nécessaires afin d'obtenir du bétulinol (2) à 90% pur. À la fin, le bétulinol (2) est séché à 70 °C.

3.4. OXYDATION DU BÉTULINOL (2)

3.4.1. Perruthenate de tétrapropylammonium avec le N-méthylmorpholine-N-oxide (TPAP/NMO)

50 mg de bétulinol (2) (0.11 mmol) sont dissous dans 5 mL de DCM. 4 mg de TPAP (0.01 mmol) et 17.6 mg de NMO (0.15 mmol) sont ajoutés. Afin de s'assurer que le milieu soit anhydre, 55 mg de tamis moléculaire (4 Å) sont ajoutés. Le milieu réactionnel est agité sous atmosphère d'azote à la température de la pièce pendant 30 minutes. Le déroulement de la réaction est suivie par CCM avec comme éluant une solution de 15% EtOAc/hexane. Lorsque la réaction est terminée, le mélange est filtré avec un lit de silice sur un verre fritté (environ 2 cm d'épaisseur de silice). La silice est rincée avec un peu d'EtOAc (10 ml) afin de récupérer le maximum de bétulonol (16).

3.4.2. Dichromate de pyridinium adsorbé sur silice (PDC/SiO₂)

50 mg de bétulinol (2) (0.11 mmol) sont dissous dans 10 mL de DCM. 64.5 mg de PDC (0.17 mmol) sont broyés dans un mortier avec 258 mg de SiO₂ ou de Al₂O₃. À la température ambiante, la solution hétérogène est agitée vigoureusement avec un agitateur magnétique. L'évolution de la réaction est suivie par CCM avec une solution de 15% EtOAc/hexane comme éluant. Lorsque les premières traces de bétulonol (16) apparaissent ($R_f = 0.50$), la solution est filtrée sur verre fritté. La silice est rincée avec 50 mL de DCM afin de récupérer tous les produits de réaction. Il est important de préciser que le PDC seul (sans support solide) a également été mis à l'essai.

3.4.3. Oxyde de chrome adsorbé sur silice (CrO₃/SiO₂)

56 mg de CrO₃ (0.56 mmol) sont dissous dans 10 mL d'acétone puis 226 mg SiO₂ y sont ajoutés (Attention! Lorsque l'acétone est ajoutée rapidement au CrO₃, le mélange s'enflamme. Il faut donc ajouter lentement le CrO₃ à l'acétone). L'acétone est évaporée et le réactif est immédiatement ajouté à une solution de 50 mg de bétulinol (**2**) dans 10 ml de DCM. Le milieu est brassé avec un agitateur magnétique pendant 45 minutes. Lorsque les premières traces de bétulonol (**16**, R_f = 0.50) apparaissent sur CCM (élution avec 15% EtOAc/hexane), le milieu réactionnel est filtré sur verre fritté.

D'autres solvants (acétone, toluène, DMSO) sont utilisés : les quantités sont ajustées de sorte que tout le bétulinol (**2**) soit dissout. Des essais sont réalisés avec des co-réactifs comme la Et₃N, le NMO, et l'acide acétique (AcOH). Dans le cas de la Et₃N et de l'AcOH, un volume de 0.1 mL est ajoutées au milieu réactionnel. Pour le NMO, 66 mg (0.56 mmol.) sont utilisés. Si le réactif CrO₃ est utilisé sans la silice, il n'est pas dissout dans l'acétone; il est broyé et ajouté tel quel à la solution.

Pour le dernier essai, la silice est rincée avec 20 mL d'EtOAc à la fin de la réaction. Afin de préparer l'échantillon pour la chromatographie, 100 mg de silice sont ajoutés à la solution. Les solvants organiques sont ensuite retirés par évaporation sous vide.

Les produits sont isolés par chromatographie éclair sur gel de silice en utilisant comme éluant des solutions de 4 à 15% d'EtOAc/hexane. Les traces de bétulonol (**16**) sont recueillies en premier suivies du bétulinol (**14**), de la bétulone (**15**) et du bétulinol (**2**).

3.4.4. Chlorure ou nitrate de fer adsorbé sur silice ($\text{FeCl}_3/\text{SiO}_2$ ou $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3/\text{SiO}_2$)

50 mg de bétulinol (**2**) (0.11 mmol) sont dissous dans 20 mL de DCM. 92 mg de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (0.23 mmol) et 368 mg de gel de silice sont broyés dans un mortier jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène. Ce réactif est ajouté à la solution de bétulinol (**2**) qui est agitée et chauffée à reflux pendant 20 minutes. Une fois la réaction terminée (CCM sur silice, élution avec 3% MeOH/DCM), la solution est filtrée sur un lit de gel de silice. Les résidus sont rincés abondamment avec DCM/MeOH 98:2 (50 ml). Les solvants sont retirés par évaporation sous vide pour recueillir 91 mg d'allobétulinol (**18**). Le produit obtenu est pur à 95% (déterminé par GC). Si la réaction est prolongée pendant 6h, l'allobétulinol (**18**) est oxydé jusqu'à l'allobétulone (**23**). Le même traitement (filtration sur silice, rinçage et évaporation) est alors effectué pour récupérer le produit.

Si le FeCl_3 est employé comme réactif, il est préparé de la même manière qu'avec le $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, c'est-à-dire broyé dans un mortier avec de la silice pour un ratio réactif/silice 1:4. Les essais avec l'alumine sont effectués avec les mêmes proportions que pour la silice.

La réaction dans la pyridine cause des problèmes d'analyse par CCM. En effet, une grande traînée apparaît sur la CCM après la révélation avec le CAM. Pour contourner ce problème, un aliquot de la réaction est prélevé dans une éprouvette, acidifié avec HCl 10%, et extrait avec DCM. Le surnageant est jeté (HCl + pyridine) et la solution de DCM est analysée directement par CCM.

La séparation des dérivés de réarrangement du cycle A de l'allobétulinol (**18**) est effectuée par chromatographie éclair avec $\text{AgNO}_3\text{-SiO}_2$ 10%. Celle-ci est préparée en

mélangeant dans un mortier 10.0 g de silice, 1.0 g de AgNO_3 et 6 mL d'eau. Cette silice est activée au four à 150 °C pendant 2h. Une fois refroidie, la silice est utilisée immédiatement. La colonne est montée dans l'éther de pétrole (PE., 35-60°C) puis les produits sont élués avec des solutions de 1, 2, 4, 8, 20 et 100% DCM/PE

3.5. OXYDATION DU BÉTULINAL (14)

Le bétulinal (14) (100 mg, 0.23 mmol) est dissout dans 25 mL d'acétone à 0 °C, puis 39.6 mg de KMnO_4 (0.25 mmol) sont ajoutés. La solution est agitée pendant 30 minutes, puis 75 mL de H_2SO_4 10% sont ajoutés. L'acide bétulinique (3) est extrait avec le DCM (3x50 mL). La phase organique est lavée avec H_2O jusqu'à neutralité, séchée avec Na_2SO_4 puis évaporée pour obtenir 67 mg d'acide bétulinique (3).

3.6. RÉACTION D'ESTÉRIFICATION

3.6.1. BOP (27)

59.8 mg de BOP (27, 0.14 mmol) et 13.4 μl d'adipate de monométhyle (17, 0.09 mmol) sont dissous dans un minimum de DCM avec 18.9 μl de Et_3N (0.14 mmol). Une solution contenant 20.0 mg d'allobétulinol (18, 0.06 mmol) dans un minimum de DCM est ajoutée au milieu réactionnel. Le mélange est agité à la température de la pièce. L'évolution de la réaction est suivie par CCM avec 15% EtOAc/hexane comme éluant.

3.6.2. SOCl₂

16.7 μ l (0.11 mmol) d'adipate de monométhyle (**17**) sont dissous dans 100 mL de DMF. 24.7 μ l de SOCl₂ (0.34 mmol) sont ajoutés. La solution est chauffée pendant 15 minutes à 80°C. Une solution contenant 25.3 mg d'allobétulinol (**18**, 0.06 mmol) dans un minimum de DCM est ajoutée au milieu réactionnel. Une deuxième solution contenant 32 μ l de Et₃N (0.23 mmol) dans 80 μ L de DCM est ajoutée. Le mélange est gardé à la même température est agité magnétiquement. L'évolution de la réaction est suivie par CCM avec 15% EtOAc/hexane comme éluant.

3.6.3. DCC (29)/DMAP (31)

17 μ l d'adipate de monométhyle (**17**, 0.11 mmol) sont dissous dans 5 ml de DCM. 44.7 mg de DCC (**29**, 0.22 mmol) et 1.7 mg de DMAP (**31**, 0.01 mmol) sont ajoutés à la solution. Après 15 minutes d'agitation à la température ambiante, 24.7 mg d'allobétulinol (**18**, 0.06 mmol) sont ajoutés. L'évolution de la réaction est suivie par CCM avec 15% EtOAc/hexane comme éluant. Après 24 h de réaction, la solution est filtrée sur verre frittée puis lavée avec 2 \times 5 ml de HCl 5%. La phase organique est ensuite séchée avec Na₂SO₄ anhydre puis filtrée par gravité. Le solvant est évaporée à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le produit de couplage est isolé par chromatographie éclairée sur silice avec DCM comme éluant.

3.7. CHROMATOGRAPHIE ET SPECTROSCOPIE

3.7.1. GC-MS

Le chromatographe en phase gazeuse utilisé est celui du laboratoire LASEVE. Il est muni d'un détecteur à spectrométrie de masse. Les informations concernant le type de colonne, les températures d'opération ainsi que les réglages du MS sont résumés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Paramètre d'opération du GC-MS

Chromatographe		Température	
Modèle	HP5890	Injecteur	280 °C
Gaz porteur	Hélium, 1ml/min	Détecteur	320 °C
Colonne		Colonne, initiale	100 °C (1 min)
Type	capillaire, DB-5	Colonne, gradient 1	25 °C/min
Dimension	30 m x 0.25mm x 0.25µm	Colonne, partiel	280 °C
Détecteur		Colonne, gradient 2	5 °C/min
Type	MS, quadrupole	Colonne, finale	325 °C (30 min)
Modèle	HP5972		
Ionisation	EI, 70 eV		

3.7.2. Diazométhane (33)

Les composés comme l'acide bétulinique (3) et l'acide bétulonique (9) ne peuvent être analysés directement par GC-MS. En effet, leur trop faible volatilité les empêche d'être élué de la colonne GC. Pour contourner cet obstacle, les composés acides sont méthylés avec le diazométhane (33, CH₂N₂). Ce réactif est synthétisé et utilisé sans délai (voir mécanisme à l'annexe 2). Pour ce faire, le montage illustré à la Figure 17 est utilisé.

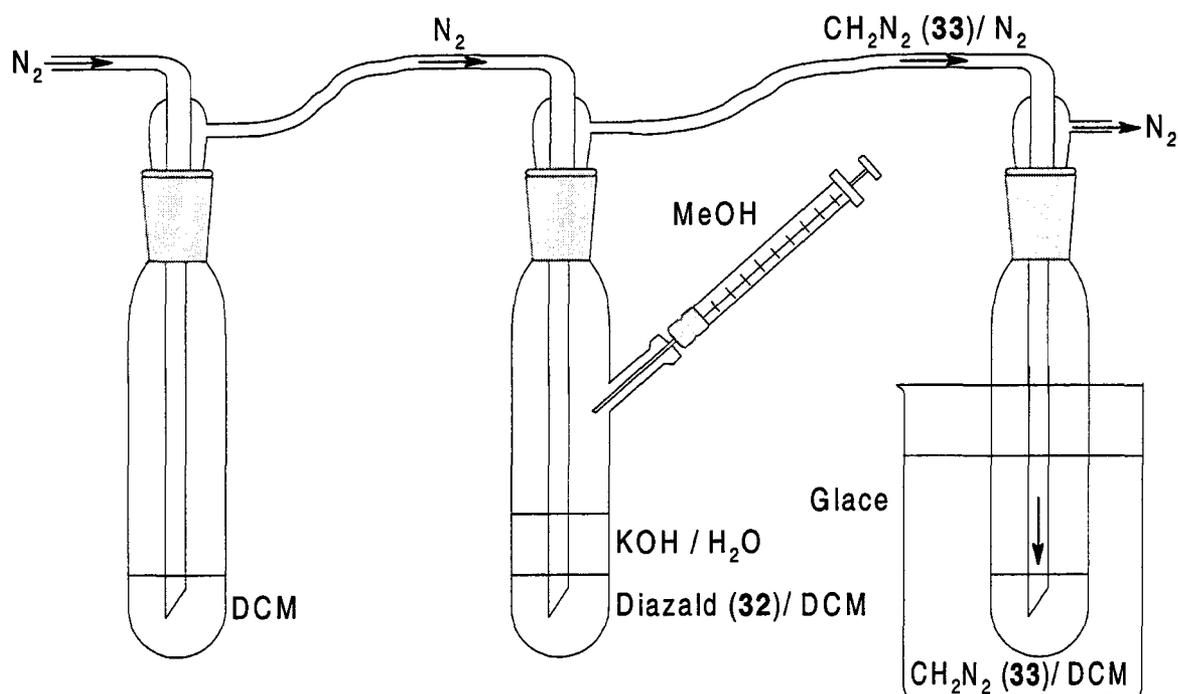


Figure 17 : Montage pour la synthèse du diazométhane (33)

Les tubes de gauche et de droite sont remplis avec 20 ml de DCM par tube. Une solution de 1.5 g de KOH dans 5 ml d'eau est ajoutée dans le tube centrale. Une deuxième solution de 0.5 g de diazald (32) dans 5 ml de DCM est ajoutée dans le tube centrale. Un courant d'azote est généré à partir du tube de gauche. Le débit est ajusté pour qu'il se forme 2 ou 3 bulles par seconde dans le premier tube. 10 ml de MeOH sont ajoutés petit à petit dans le tube centrale à l'aide d'une seringue. La réaction est terminée lorsque la couleur jaune de la solution du tube de droite est stable. Attention! Le diazométhane (33) est un gaz explosif. C'est pourquoi le kit pour fabriquer le diazométhane (33) ne contient aucun joint rodé. De plus, la pipette pasteur utilisée pour transférer le diazométhane (33) doit être sans cassure. L'échantillon (5-10 mg) est placé dans un vial et 5-10 ml de la

solution de diazométhane (**33**) y sont ajoutés. La réaction nécessite 5-10 minutes avant d'être injectée dans le GC-MS.

3.7.3. RMN

Les spectres RMN ont été réalisés sur le spectrophotomètre Bruker 300 de l'Université Laval et sur le Bruker 400 de Santé Canada (α -allobétulin I et II, **20** et **21**). Les échantillons (15-20 mg) sont dissous dans 1 ml de chloroforme deutéré (CDCl_3) avec 1% de tétraméthylsilane (TMS). Ce dernier est utilisé comme référence interne (0 ppm). La résolution des spectres RMN ^1H est de 400 MHz pour les α -allobétulin I et II (**20** et **21**) et de 300 MHz pour les autres molécules. Pour les RMN ^{13}C , la résolution est de 100 MHz pour les α -allobétulin I et II (**20** et **21**) et de 75 MHz pour les autres molécules.

CHAPITRE 4
RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.1. EXTRACTION DU BÉTULINOL (2)

La macération de 50 g d'écorce dans le dichlorométhane bouillant permet d'extraire 18.5 g de bétulinol (2) pour un rendement de 37%. Le point de fusion de l'extrait est de 246 °C, très proche de celui du bétulinol (2) [litt. 250-261°C, Hayek, E. W. H. *et al.*; 1989]. L'analyse GC-MS de l'extrait méthylé montre qu'il est composé de bétulinol (2) à 76%. L'analyse révèle également la présence d'acide bétulinique (3) [Sechadri, T. R. et Vedantham, T. N. C.; 1971], de lupéol (1), d'acide oléanolique, de 3,20-lupanediol et de bétulinal (14). L'identité de ces composés est confirmée en comparant leur spectre de masse et leur temps de rétention avec des standards. Ainsi, l'écorce contiendrait 28% de bétulinol (2), beaucoup plus que les 11.9% rapportés dans la littérature [O'Connel, M. M. *et al.*; 1988]. Cet écart peut s'expliquer par le fait que les quantités n'ont pas été évaluées avec l'aide d'un standard interne. Il existe d'autres facteurs qui peuvent expliquer l'écart observé comme des variations géographiques ou saisonnières ou même l'existence d'un nouveau chémotype.

4.2. PURIFICATION DU BÉTULINOL (2)

L'extrait brut (18.5 g) est purifié en le recristallisant 3 fois dans une solution de 2-butanol et d'eau (73:27). Le bétulinol (2) obtenu est sous forme de cristaux légèrement jaunâtres et possède un point de fusion de 251°C. Après une dérivatisation avec le diazométhane (33), le bétulinol (2) est analysé par GC-MS. Le chromatogramme présente seulement 2 pics, soit l'acide 28-O-méthylbétulinique (34, $t_R=18.03$ min, 3%) et le

bétulinol (2) ($t_R=19.90$ min, 97%). Leur identité est confirmée par l'analyse de leur spectre de masse (voir annexe 5).

4.3. OXYDATION DU BÉTULINOL (2)

4.3.1. Perruthenate de tétrapropylammonium avec le N-méthylmorpholine-N-oxide (TPAP/NMO)

Lorsque le bétulinol (2) est mis en présence de TPAP et de N-méthylmorpholine dans le dichlorométhane, on observe la formation rapide et quantitative de bétulonol (16). La réaction est complètement terminée après 30 minutes et ne génère aucun sous-produit. L'évolution de la réaction est suivie par CCM. Après 10 minutes, le milieu contient autant de bétulinol (14) (ou de bétulone, 15) que de bétulonol (16). Malheureusement, il n'est pas possible de conclure à une quelconque sélectivité. En effet, à l'époque où cette réaction a été effectuée, il n'était pas possible de distinguer la bétulone (15) et le bétulinol (14) par CCM.

4.3.2. Dichromate de pyridinium dichromate adsorbé sur silice (PDC/SiO₂)

Quelques essais d'oxydation ont été effectués avec le PDC seul ou adsorbé sur un support solide comme la silice ou l'alumine. Le Tableau 5 présente la composition des milieux réactionnels après 60 minutes. La proportion de chaque composante a été déterminée par GC-MS.

Tableau 5: Résultats des essais d'oxydation avec PDC

Réactif	Contenu du milieu réactionnel (GC-MS)					Sélectivité ^a
	Bétulinol (2)	Bétulone (15)	Bétulinal (14)	Bétulonal (16)	Impuretés	
PDC	-	-	26%	74%	trace	1.4 : 1
PDC/SiO ₂	20%	9%	67%	27%	trace	2.6 : 1
PDC/Al ₂ O ₃	22%	9%	51%	trace	18%	5.7 : 1

^a Le ratio (oxydation alcool primaire) : (oxydation alcool secondaire)
= (bétulinal (14)+bétulonal (16)) / (bétulone (15) + bétulonal (16))

Lorsque la réaction est effectuée avec le PDC seul, tout le bétulinol (2) réagit et se transforme en produit d'oxydation, soit le bétulinal (14) et le bétulonal (16). La sélectivité pour les alcools primaires dans ces conditions est presque nulle (1.4:1). Lorsque le réactif est adsorbé sur un support solide, une quantité de bétulinol (2) non négligeable (20-22%) n'est pas oxydée. Cependant, une sélectivité pour les alcools primaires est induite grâce à l'utilisation d'un support solide. Ainsi, la réaction avec la silice produit la plus grande quantité de bétulinal (14), et ce, même si elle présente une sélectivité moindre qu'avec l'alumine. Cela s'explique par le grand nombre de sous-produits obtenus avec l'alumine alors que de simples traces de sous-produits sont détectées dans les autres réactions.

4.3.3. Oxyde de chrome adsorbé sur silice (CrO₃/SiO₂)

Plusieurs essais ont été effectués avec le réactif CrO₃/SiO₂. Dans tous les cas, 5 équivalents de réactif (par rapport au bétulinol (2)) sont utilisés. Le ratio massique du réactif est de 1:4 (CrO₃/SiO₂) [Khadilkar, B. et Borkar, S.; 1998]. Les résultats sont présentés au Tableau 6.

Tableau 6 : Essais d'oxydation du bétulinol (2) avec CrO₃/SiO₂

Essai	Conditions réactionnelles	Temps	CCM* Élution →		Produits isolés
			●	●	
1	DCM	15 min	●	●	Bétulinal (14, 21%)
2	Toluène	20 min	●	●	nd ^b
3	Acétone	4 h	●	●	nd ^b
4	DMSO	3 h	●	●	nd ^b
5	DCM + Et ₃ N	5 h	●	●	nd ^b
6	DCM + Et ₃ N, sans SiO ₂	5 h	●	●	nd ^b
7	DCM + NMO	12 min	●	●	nd ^b
8	DCM + NMO, sans SiO ₂	5 h	●	●	nd ^b
9	DCM + AcOH	5 min	●	●	nd ^b
10	DCM + AcOH, sans SiO ₂	5 min	●	●	nd ^b

^a Les R_f des composés sont : bétulinol (2), 0.15, bétulone (15), 0.21, bétulinal (14), 0.30 et bétulonal (16), 0.50 (élution avec 15% EtOAc/hexane). ^b nd = les produits n'ont pas été isolés

Les réactions ont été effectuées dans différents solvants. L'acétone et le DMSO semblent être moins efficaces que le DCM ou le toluène (essais 1-4). Pour obtenir les mêmes proportions de produits, un temps beaucoup plus long est nécessaire : 3-4 h pour le DMSO et l'acétone et 15-20 min pour le toluène et le DCM. D'autres réactions ont été effectuées en ajoutant des co-réactifs. La triéthylamine (0.1 mL) bloque complètement l'activité du réactif (essais 5-6). Le NMO (5 eq.), le co-oxydant employé avec TPAP, n'a aucun effet sur la réactivité (essai 7). Un autre essai a été effectué avec le NMO (5 eq.) et du CrO₃ sans silice (essai 8). L'absence de réaction confirme l'importance de la silice pour activer le CrO₃. Si l'acide acétique est ajouté au milieu réactionnel (0.1 mL), l'oxydation est beaucoup plus rapide (essais 9-10). Le dernier essai montre que la silice peut être remplacée par de l'acide acétique sans diminuer l'efficacité de la réaction. Cela indique que l'acidité de la silice joue un rôle très important.

Les CCM des réactions démontrent clairement que le réactif est sélectif pour les alcools primaires. En effet, la quantité de bétulinal (14) formé est supérieure à celle de la bétulone (15).

Le rendement de bétulinal (14) isolé est très faible (21%). Cela s'explique par une mauvaise récupération des produits de réaction et par une chromatographie éclairée difficile. En effet, lorsque la réaction est terminée, une filtration doit être effectuée pour enlever le réactif adsorbé sur la silice. Il est très probable qu'une quantité appréciable de produits soit adsorbé par la silice. Lors d'un essai pour vérifier cette hypothèse, 80 mg de produits brut ont été récupérés alors que 200 mg de bétulinol (2) avait été pesé. De ces 80 mg, 36 mg de bétulinal (14) ont été isolés pour un rendement potentiel de 45%. C'est pourquoi un dernier essai a été effectué en prenant soin de bien rincer la silice à la fin de la réaction pour récupérer le maximum de produit. La quantité de chaque composé isolé à partir du milieu réactionnel est présentée au Tableau 7.

Tableau 7 : Rendements isolés pour les produits d'oxydation avec $\text{CrO}_3/\text{SiO}_2$.

Composé	Quantité (mg)	Rendements ^a
Bétulinol (2)	16.3	33% ^b
Bétulinal (14)	17.7	35%
Bétulone (15)	4.6	9%
Bétulonal (16)	3.8	8%

^a Rendement calculé pour 50 mg de bétulinol (2).

^b rendement de récupération

Le rendement de la réaction est donc de 35%. La pureté des produits isolés peut être constatée en regardant les spectres RMN présentés à l'annexe 4. Les caractéristiques

physiques des composés n'ont pu être évaluées en raison de la trop faible quantité de produits isolés. Une réaction à grande échelle devra être effectuée pour mesurer ces caractéristiques.

4.3.4. Chlorure ou nitrate de fer adsorbé sur silice ($\text{FeCl}_3/\text{SiO}_2$ ou $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3/\text{SiO}_2$)

Le réactif $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ adsorbé sur silice est rapporté dans la littérature comme un oxydant pour les fonctions alcools [Khadilkar, B. et Borkar, S.; 1985]. Lors du premier essai, un seul produit fut obtenu après 15 minutes. Croyant que le bétulinol (**14**) avait été obtenu quantitativement, une analyse par GC-MS fut effectuée. Celle-ci démontra que le produit n'était pas le bétulinol (**14**), mais un autre produit alors inconnu. L'identité du composé a été déterminée par RMN : celui-ci est l'allobétulinol (**18**). Ce dernier n'est pas un produit d'oxydation mais un produit de réarrangement du bétulinol (**2**) bien connu [Schulze, H. et Pieroh, K.; 1922]. Dans toutes les synthèses de l'allobétulinol (**18**) rapportées, un acide est utilisé comme réactif. Ainsi, c'est probablement le caractère acide de Lewis du fer qui provoque la réaction. Pour vérifier cette hypothèse, un essai avec le FeCl_3 , un autre acide de Lewis, a été effectué. Dans ces conditions, la réaction procède encore plus rapidement qu'avec le $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$. Une étude plus approfondie de ces réactifs a été réalisée. Les résultats de cette étude, montrés au Tableau 8, ont fait l'objet d'un article (voir annexe 2) dans le journal « Synthetic Communications ».

Tableau 8 : Résultats des réactions avec acides de Lewis adsorbé sur silice

Essai	Condition réactionnelles				CCM ^a Élution →					
	Réactif	Adsorbant	Solvant	Temps						
1	Fe(NO ₃) ₃	SiO ₂	DCM	20 min			●			
2	Fe(NO ₃) ₃	-	DCM	4 h			●			
3	-	SiO ₂	DCM	4 h			●			
4	Fe(NO ₃) ₃	SiO ₂	Pyridine	1 h			●			
5	Fe(NO ₃) ₃	SiO ₂	Toluène	1 h			●	●		
6	Fe(NO ₃) ₃	SiO ₂	THF	1 h			●			
7	Fe(NO ₃) ₃	Al ₂ O ₃	DCM	20 min			●			
8	Fe(NO ₃) ₃	SiO ₂	DCM	6 h					●	
9	Fe(NO ₃) ₃	Al ₂ O ₃	DCM	7 h			●			
10	FeCl ₃	SiO ₂	DCM	5 min			●			
11	FeCl ₃	SiO ₂	DCM	2 h						●
12	FeCl ₃	SiO ₂	toluène	30 min			●			
13	FeCl ₃	SiO ₂	THF	5 min			●			
14	FeCl ₃	Al ₂ O ₃	DCM	5 min			●			
15	FeCl ₃	Al ₂ O ₃	DCM	2 h						●

^a Les R_f des produits sont : bétulinol (2), 0.33, allobétulinol (18), 0.41, allobétulone (23), 0.65, α-allobétulin I et II (20 et 21), 0.80 (élution avec 3% méthanol-dichlorométhane)

La réaction est complètement terminée après 20 minutes si le Fe(NO₃)₃/SiO₂ est utilisé (essai 1). Lorsque le Fe(NO₃)₃ est utilisé en absence de silice, la progression de la réaction est beaucoup plus lente et elle nécessite 4h pour être complétée (essai 2). Par contre, un essai avec la silice ne provoque pas de réarrangement (essai 3). Ces résultats démontrent que l'adsorbant active le réactif et facilite grandement la réaction. L'hypothèse avancée pour cette synergie est que la silice augmente la surface de contact entre le bétulinol (2) et le réactif, insoluble dans les solvants utilisés.

Le solvant choisi est très important. En effet, si la pyridine ou le THF sont utilisés, la réaction ne fonctionne pas (essai 4 et 6). Avec le toluène, la réaction fonctionne mais à une vitesse moindre (essai 5). D'après ces résultats, il semble qu'un solvant de forte polarité comme la pyridine ou le THF bloque la réaction. L'hypothèse qu'un solvant de faible polarité augmente la vitesse de réaction n'est pas valide puisque la réaction est moins rapide dans le toluène que dans le DCM, et ce, même si le toluène est moins polaire. Une autre hypothèse peut être avancée : la pyridine et le THF, avec leur hétéroatome, peuvent chélater l'ion Fe^{3+} et l'empêcher d'atteindre efficacement le site réactionnel sur le bétulinol (**2**). Cependant, cette hypothèse reste à confirmer avec d'autres solvants polaires et non-polaires.

Lorsque la réaction avec $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3/\text{SiO}_2$ est prolongée, l'allobétulinol (**18**) se transforme en allobétulone (**23**, essai 8). Ce composé est un produit d'oxydation de l'allobétulinol (**18**). Ainsi, le $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3/\text{SiO}_2$ réagit, comme rapporté, en oxydant la fonction alcool.

Un autre adsorbant, l'alumine (Al_2O_3), a été testé. Avec ce dernier, le $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ provoque le réarrangement bétulinol (**2**)/allobétulinol (**18**) avec la même efficacité (essai 7). Cependant, l'oxydation de la fonction alcool secondaire de l'allobétulinol (**18**) ne fonctionne pas, et ce, même après 7h de réaction (essai 9). Pour ce qui est de l'oxydation, il est clair que la tâche de l'adsorbant n'est pas simplement d'augmenter la surface de contact comme pour le réarrangement. Dans la littérature, la même conclusion est rapportée sans plus de détail [Nishiguchi, T. et Asano, F.; 1989].

Les réactions réalisées avec le $\text{FeCl}_3/\text{SiO}_2$ dans le DCM sont encore plus rapides qu'avec le $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$: après 5 minutes, tous le bétulinol (**2**) est transformé en allobétulinol (**18**, essai 10). D'après les CCM, un composé peu polaire est formé si la réaction est prolongée. Pour l'identifier, une analyse GC-MS a été effectuée. Celle-ci révèle que le composé est en fait un mélange de deux produits inconnus. Comme ces deux produits sont très difficiles à séparer, une technique de chromatographie spéciale ($\text{AgNO}_3\text{-SiO}_2$) est utilisée. L'isolation des ces composés et leur caractérisation par RMN (voir annexe 4) montre que les α -allobétulin I et II (**20** et **21**) sont obtenus (Figure 18) [Li, T.-S. *et al.*; 1998].

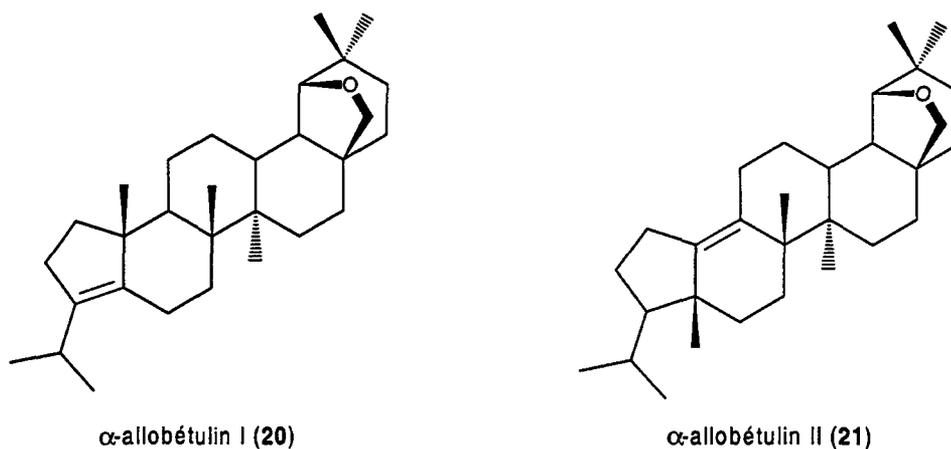


Figure 18 : Dérivé de réarrangement de l'allobétulinol (**18**)

Lorsque la réaction avec FeCl_3 est effectuée avec l'alumine comme adsorbant, l'allobétulinol (**18**) est formé après 5 minutes. Si cette réaction est poursuivie 2h de plus (essai 14-15), les α -allobétulin I et II (**20** et **21**) sont formés comme pour la silice. Contrairement à l'oxydation de l'allobétulinol (**18**) en allobétulone (**23**), le réarrangement

du cycle A de l'allobétulinol (**18**) fonctionne indépendamment du support solide choisi. Il est fort possible que dans ce cas, l'adsorbant joue le rôle du réactif principal et que le FeCl_3 ne soit qu'un spectateur. Cette hypothèse s'appuie sur le fait que l'allobétulinol (**18**) subit le même réarrangement en présence d'argile K10 employé sans ion métallique [Li, T.-S. et al.; 1998]. Un contre-argument est que le bétulinol (**2**), bien qu'il possède la même structure que l'allobétulinol (**18**) au niveau du cycle A, ne subit pas un tel réarrangement en présence de silice seule (essai 3). Pour confirmer ou infirmer l'hypothèse, il faudrait faire un essai avec l'allobétulinol (**18**) et la silice seule, ce qui n'a malheureusement pas été fait. Une proposition de mécanisme est tout de même présentée à l'annexe 2.

Finalement, les quantités typiques ainsi que les rendements, récupérés après isolation des différents produits de réaction, sont présentées au Tableau 9.

Tableau 9 : Rendements isolés pour les dérivés de réarrangement

Réaction	Composés	Quantité (mg)	Rendements ^a
$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3/\text{SiO}_2$, 20min	Allobétulinol (18)	45.5	91%
$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3/\text{SiO}_2$, 6h	Allobétulone (23)	35.0	70%
$\text{FeCl}_3/\text{SiO}_2$, 2h	α -allobétulinol I (20)	10.0	21%
	α -allobétulinol II (21)	15.0	31%

^a Rendement calculé pour 50 mg de bétulinol (**2**)

4.4. OXYDATION DU BÉTULINAL (**14**)

La réactif choisi pour oxyder le bétulinal (**14**) en acide bétulinique (**3**) est le KMnO_4 dans l'acétone. Ainsi, en utilisant 2 équivalents de réactif dans l'acétone à reflux, le bétulinal (**14**) est transformé en acide bétulinique (**3**) quantitativement. Aucune trace de

sous produit n'est remarquée sur les CCM. Le produit est récupéré après des lavages acides avec un rendement de 67%. La réaction n'étant pas encore optimisée, il ne fait aucun doute qu'un rendement proche de 90% pourra être atteint. Afin de recueillir le maximum de produit avec une pureté maximale, une solution d'oxalate de calcium dans l'acide sulfurique dilué pourrait être ajoutée au milieu réactionnel pour neutraliser l'excédent de réactif [Harris, D. C.; 1995]. Il suffira par la suite d'évaporer l'acétone puis d'extraire l'acide bétulinique (**3**) avec du DCM.

4.5. RÉACTION D'ESTÉRIFICATION

Afin de développer une réaction de couplage efficace, l'allobétulinol (**18**) et l'adipate de monométhyle (**17**) sont utilisés. L'allobétulinol (**18**) est choisi en raison de sa fonction alcool unique évitant ainsi des produits de mono et de di-estérification. L'acide adipique est constitué de deux fonctions acides carboxyliques dont l'une est protégé sous forme d'ester de méthyle. Le Tableau 10 présente les conditions de couplage testées avec les résultats obtenus.

Tableau 10 : Résultats des réactions de couplage entre l'allobétulinol (**18**) et l'adipate de monométhyle (**17**).

Essai	Condition réactionnelles			CCM ^a					
	Agent activant	Catalyseur	Solvant						
1	DCC (3 eq.)	Et ₃ N (2 eq.)	DCM			●			
2	BOP (3 eq.)	Et ₃ N (2 eq.)	DCM			●			
3	SOCl ₂ (6 eq.)	Et ₃ N (4 eq.)	DMF			●	●		
4	DCC (1.5 eq.)	DMAP (0.2 eq.)	DCM			●		●	
5	DCC (4 eq.)	DMAP (0.2 eq.)	DCM			●		●	

^a Les R_f des produits sont : allobétulinol (**18**), 0.41 et ester (**19**), 0.75 (élution avec 3% méthanol-dichlorométhane)

D'après ces résultats, les conditions favorables à la formation de l'ester nécessitent le DCC (**29**) comme activant et le DMAP (**31**) comme catalyseur (essai 4-5). La réaction a été effectuée avec 1.5 et 4 équivalents de DCC (**29**). D'après les CCM, ces quantités de réactif ne semblent pas influencer la quantité de produits formés. Pour la dernière réaction, le produit a été isolé avec un rendement de 35%. Son identité a été confirmée par des analyses RMN (voir annexe 4). Afin d'optimiser la réaction, il serait nécessaire d'avoir des solvants parfaitement anhydres. Sinon, peut-être qu'un autre solvant serait plus approprié, comme l'éther, le THF, le DMF ou l'acétonitrile [Höfle, G. et al.; 1978].

4.6. DONNÉES CHROMATOGRAPHIQUES ET SPECTRALES DES DÉRIVÉS

Cette section se divise en 4 parties, soit les données du bétulinol (**2**), des produits d'oxydation, des produits de réarrangement et des dérivés de couplage. Pour chaque partie, le comportement des composés en chromatographie gazeuse sera présenté. Toute comparaison entre les données de chaque partie devra être évitée puisqu'elles ont été

recueillies à des époques différentes du projet. Comme les colonnes capillaires sont renouvelées plusieurs fois durant cette période, les temps de rétention ne sont pas les mêmes d'une époque à l'autre. Les données MS, RMN ^1H et RMN ^{13}C suivront par la suite.

4.6.1. Bétulinol (2)

Le comportement chromatographique de ce composé sera présenté dans les autres parties afin de permettre les comparaisons. Les pics les plus intenses du spectre de masse du bétulinol (2) sont présentés au Tableau 11.

Tableau 11 : Données MS du bétulinol (2)

Composé	MS
Bétulinol (2)	442 (M^+ , 5%), 43 (100), 95 (96), 55 (96), 81 (95), 69 (84), 41 (81), 67 (79), 93 (79), 189 (76).

4.6.2. Dérivés d'oxydation

Les dérivés d'oxydation sont le bétulinal (14), la bétulone (15), le bétulonal (16), l'acide bétulinique (3) et l'acide bétulonique (9). Les ions les plus abondants des spectres de masse de ces dérivés sont résumés dans le Tableau 12, alors que les spectres complets sont présentés à l'annexe 5.

Tableau 12: Données chromatographiques et MS des dérivés d'oxydation

Composé	T _R (min)	MS
Bétulinol (2)	19.90	442 (M ⁺ , 5%), 43 (100), 95 (96), 55 (96), 81 (95), 69 (84), 41 (81), 67 (79), 93 (79), 189 (76).
Bétulinal (14)	18.39	440 (M ⁺ , 12%), 43 (100), 55 (92), 81 (90), 41 (85), 69 (82), 189 (82), 95 (80), 93 (78), 67 (76)
Bétulone (15)	19.55	440 (M ⁺ , 2%), 55 (100), 95 (87), 81 (82), 41 (78), 67 (77), 69 (67), 79 (67), 93 (67), 91 (62)
Bétulonal (16)	18.01	438 (M ⁺ , 7%), 55 (100), 41 (82), 81 (81), 67 (73), 79 (70), 69 (68), 93 (66), 95 (65), 43 (64)
Acide 28-O-méthylbétulinique	18.03	470 (M ⁺ , 2%), 189 (100), 43 (66), 55 (65), 81 (62), 69 (56), 93 (55), 119 (54), 95 (53), 207 (52)
Acide 28-O-méthylbétulonique	17.70	468 (M ⁺ , 5%), 189 (100), 55 (75), 81 (61), 43 (58), 67 (56), 69 (51), 45 (50), 105 (50), 79 (50)

Les temps de rétention du bétulinol (2) et de ses trois dérivés d'oxydation diminuent en fonction inverse de leur degré d'oxydation. En effet, une fonction alcool, de degré d'oxydation moindre, est en mesure d'effectuer des liens hydrogènes, diminuant ainsi la volatilité de la molécule. Si l'on compare les temps de rétention du bétulinol (2), de la bétulone (15), du bétulinal (14) et du bétulonal (16), on remarque que l'alcool primaire établit des liens hydrogènes plus forts que l'alcool secondaire. En effet, l'oxydation de l'alcool primaire (bétulinol (2) → bétulinal (14) ou bétulone (15) → bétulonal (16)) cause une diminution du temps de rétention de 1.51-1.54 min. Pour l'oxydation de l'alcool secondaire (bétulinol (2) → bétulone (15), bétulinal (14) → bétulonal (16) ou acide 28-O-méthylbétulinique (34) → acide 28-O-méthylbétulonique (35)) cause une diminution de 0.33-0.38 min.

Avec les spectres de masses, il est possible de reconnaître assez facilement chacun des dérivés. Le premier point important est la masse de l'ion moléculaire, toujours présent

sur les spectres. Ainsi, le bétulinol (2) est rapidement identifié avec sa masse moléculaire de 442, de même que l'acide 28-O-méthylbétulinique (34, 470), l'acide 28-O-méthylbétulonique (35, 470) et le bétulonol (16, 438). Le signal situé à 411 ou 409 dans le spectre du bétulinol (2) révèle le type de fonction présent en position 3 et 28 puisqu'il correspond à l'ion $M^+ - CH_2OH$ ou $M^+ - CHO$. La différence entre ce fragment et l'ion moléculaire indique que la fonction 28 est de type alcool ($M^+ - 31$) ou de type aldéhyde ($M^+ - 29$). De plus, si la masse de ce fragment est de 409, la fonction en position 3 est de type cétone tandis que si la masse est de 411, la fonction est de type alcool. Un deuxième fragment (22) aide à l'identification du type de fonction en position 3, soit l'ion de masse 205 pour une cétone ou 207 pour un alcool. La structure de cet ion est présentée à la Figure 19.

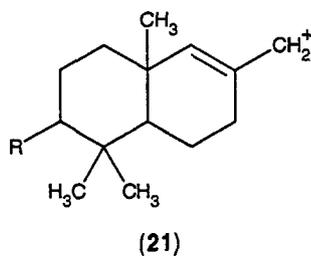


Figure 19 : Fragment de masse 205 ou 207 (22) [Budzikiewicz, H. *et al.*; 1963].

Les structures exactes de ces composés sont confirmées par spectroscopie RMN 1H et ^{13}C . Les signaux utiles à l'identification de ces composés sont résumés dans le Tableau 13 et le Tableau 14. Les spectres complets sont placés à l'annexe 4.

Tableau 13 : Principaux signaux RMN ^1H des dérivés d'oxydation

Molécule	Déplacement chimique (ppm) et multiplicité				
	H-2	H-3	H-19	H-28	H-29
Bétulinol (2)	< 2.04 ^a	3.19, dd	2.39, td	3.82-3.33, d	4.68-4.58, s
Bétulinal (14)	< 2.11 ^a	3.18, dd	2.86, td	9.67, d	4.75-4.62, s
Bétulone (15)	2.44, c	-	2.44, c	3.80-3.34, d	4.69-4.59, s
Bétulonal (16)	2.44, c	-	2.88, c	9.67, d	4.76-4.63, s
Acide bétulinique (3)	< 2.26 ^a	3.02, c	2.33, m	-	4.68-4.53, s
Acide bétulonique (9)	2.44, c	-	3.00, td	-	4.74-4.62, s

^a Le symbole « < » signifie que le signal se situe dans la portion des protons aliphatiques, entre 2.5 et 1.2 ppm, impossible à interpréter avec un simple RMN ^1H 1D

Tableau 14 : Principaux signaux RMN ^{13}C des dérivés d'oxydation

Molécules	Déplacement chimique (ppm)			
	C-3	C-20	C-28	C-29
Bétulinol (2)	79.0	150.5	60.6	109.7
Bétulinal (14)	79.0	149.7	206.7	110.2
Bétulonal (16)	218.0	149.7	206.6	110.2
Acide bétulinique (3)	78.5	151.6	177.6	109.9
Acide bétulonique (9)	218.0	150.2	181.7	109.6

Les spectres RMN ^1H des dérivés d'oxydation permettent très facilement l'identification de ces composés. Pour ce faire, les signaux situés au-delà de 2.0 ppm sont considérés. Les portions de spectre comprises entre 1.0 et 2.0 ppm ne peuvent être interprétées sans autres informations puisqu'elles représentent des protons chimiquement très semblables, soit ceux du squelette triterpénique. Le même raisonnement est fait pour les spectres RMN ^{13}C de sorte que, après s'être assuré de la présence de tous les carbones, seuls les signaux au-delà de 60 ppm sont considérés.

Une fonction alcool en position 28 déblindé les protons situés sur le carbone correspondant à des positions comprises entre 3.33 et 3.82 ppm. Comme cette fonction est attachée sur un carbone chiral (C-17), les deux protons du carbone 28 sont chimiquement

différents et présentent des signaux distincts. Évidemment, ces signaux ont la forme d'un doublet dont la constante de couplage est de 11 Hz, caractéristique des hydrogènes géminaux [Silverstein, R. M. *et al.*; 1991]. Lorsque la fonction alcool est oxydée en fonction aldéhyde, ces deux signaux disparaissent pour laisser place à un pic à 9.67 ppm. Pour une fonction acide, aucun signal n'est observé. Par contre, un signal entre 177 et 181 ppm est observé dans les spectres RMN ^{13}C des dérivés acides. Pour une fonction aldéhyde, le signal est déblindé à 206.6 ppm, tandis que pour une fonction alcool, le signal se retrouve à 60.6 ppm.

La fonction alcool en position 3 cause un signal très caractéristique : un doublet de doublet entre 3.0 et 3.2 ppm avec des constantes de couplage (J) d'environ 5 et 11 Hz. Ce signal est causé par le proton sur le carbone 3, porteur de la fonction alcool. Lorsque cette fonction est oxydée, le signal disparaît. Dans ce cas, un autre signal très caractéristique apparaît, soit celui à 2.44 ppm. Ce dernier est causé par les protons en position 2 (α par rapport à la cétone). Lorsque la fonction en position 3 est de type alcool, les protons H-2 ne sont pas déblindés et leur signal se cache dans ceux du squelette (1.0-2.0 ppm). Sur un spectre RMN ^{13}C , le carbone 3 se situe entre 77 et 79 ppm dans le cas d'un alcool et à 218.0 ppm dans le cas d'une cétone.

Dans certaines réactions d'oxydation, il arrive qu'une insaturation puisse être affectée par le réactif. Ainsi, pour s'assurer de l'intégrité de cette fonction sur les dérivés d'oxydation, la présence de signaux entre 4.50 et 4.75 ppm est vérifiée. Ceux-ci sont causés par les protons géminaux de l'insaturation en position 20(29). Généralement sous

forme de singulet, il arrive que ceux-ci prennent la forme d'un doublet. La forme singulet résulte d'un manque de résolution de l'appareil puisque la constante de couplage d'un tel système est très faible (0-2 Hz) [Silverstein, R. M. *et al.*; 1991]. Sur le RMN ^{13}C , les deux carbones de l'insaturation se situent à 110 et 150 ppm (C-29 et C-20 respectivement).

4.6.3. Dérivés de réarrangement

Les dérivés de réarrangement sont l'allobétulinol (**18**), l'allobétulone (**23**), l' α -allobétulin I (**20**) et l' α -allobétulin II (**21**). Les ions les plus abondants des spectres de masse de ces dérivés sont résumés dans le Tableau 15, alors que les spectres complets sont présentés à l'annexe 5.

Tableau 15: Données chromatographiques et MS des dérivés de réarrangement

Composé	T _R (min)	MS
Bétulinol (2)	19.66	442 (M ⁺ , 5%), 43 (100), 95 (96), 55 (96), 81 (95), 69 (84), 41 (81), 67 (79), 93 (79), 189 (76)
Allobétulinol (18)	18.63	442 (M ⁺ , 9%), 81 (100), 95 (92), 69 (90), 43 (86), 189 (80), 55 (78), 207 (70), 41 (69), 135 (59)
Allobétulone (23)	18.53	440 (M ⁺ , 22%), 81 (100), 55 (91), 69 (85), 95 (79), 41 (75), 43 (66), 67 (63), 93 (54), 107 (54)
α -allobétulin I (20)	14.22	424 (M ⁺ , 5%), 121 (100), 381 (82), 135 (79), 93 (72), 136 (67), 107 (65), 161 (59), 81 (59), 95 (54)
α -allobétulin II (21)	14.65	424 (M ⁺ , 28%), 55 (100), 69 (89), 119 (79), 105 (78), 41 (72), 95 (70), 189 (69), 81 (67), 91 (64)

Les spectres de masse des dérivés de réarrangement présentent des caractéristiques semblables aux dérivés d'oxydation. Pour reconnaître le squelette des allobétulanes, il faut remarquer le signal à M⁺-71. Celui-ci apparaît par réarrangement du cycle E des allobétulanes (Figure 20) [Schmidt, J. et Huneck, S.; 1979]. De plus, la masse de cet

ion (24) indique l'état d'oxydation de la fonction alcool en C-3. Ainsi, un ion M^+-71 (24) de masse 371 apparaît dans le spectre de l'allobétulinol (18) alors que cet ion est de 369 unités de masse pour l'allobétulone (23).

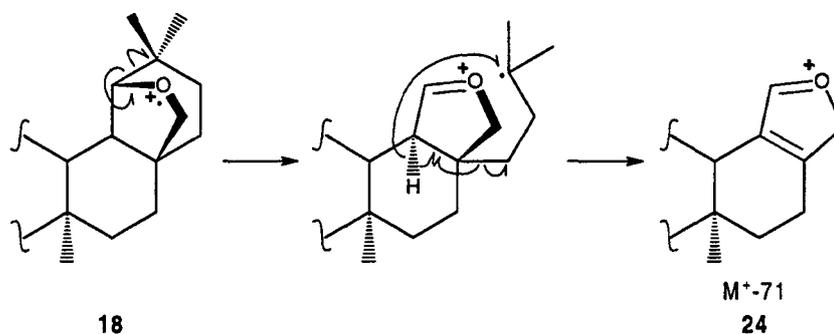


Figure 20 : Formation de l'ion M^+-71 (24) pour les allobétulanes

Pour ce qui est des dérivés de réarrangement du cycle A, soit les α -allobétulin I et II (20 et 21), c'est l'ion M^+-43 , formé par la perte du groupement isopropyl, qui caractérise leur spectre de masse. La plus forte intensité de cet ion dans le spectre de l' α -allobétulin I (20) s'explique par une délocalisation de la double liaison pour former un carbocation tertiaire, plus stable que le carbocation secondaire non délocalisé de l' α -allobétulin II (21, Figure 21) [Silverstein, R. M. *et al.*; 1991].

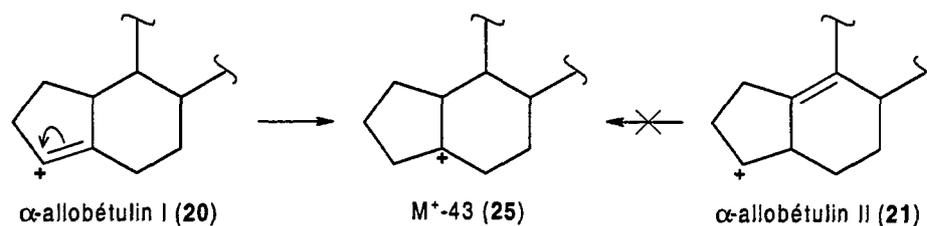


Figure 21 : Formation de l'ion M^+-43 (25) pour les α -allobétulin I et II (20 et 21)

Les structures exactes de ces composés sont confirmées par spectroscopie RMN ^1H et ^{13}C . Les signaux utiles à l'identification de ces composés sont résumés dans le Tableau 16 et le Tableau 17. Les spectres complets sont placés à l'annexe 4.

Tableau 16 : Principaux signaux RMN ^1H des dérivés de réarrangement

Molécule	Déplacement chimique (ppm)				
	H-2	H-3	H-19	H-28	Autres
Bétulinol (2)	< 2.04 ^a	3.19, dd	2.39, td	3.82-3.33, d	4.58-4.68, s, H-29
Allobétulinol (18)	< 1.76 ^a	3.20, dd	3.53, s	3.77-3.44, d	
Allobétulone (23)	2.46, c	-	3.53, s	3.78-3.45, d	1.94, ddd, H-5
a-allobétulinol I (20)	< 2.31 ^a	-	3.57, s	3.81-3.47, d	2.66, m, H-4
a-allobétulinol II (21)	< 2.31 ^a	< 2.31 ^a	3.57, s	3.82-3.47, d	

^a Le symbole « < » signifie que le signal se situe dans la portion des protons aliphatiques, entre 2.5 et 1.2 ppm, impossible à interpréter avec un simple RMN ^1H 1D

Tableau 17 : Principaux signaux RMN ^{13}C des dérivés de réarrangement

Molécules	Déplacement chimique (ppm)							
	C-3	C-5	C-9	C-10	C-19	C-20	C-28	C-29
Bétulinol (2)	79.0	< 60 ^a	< 60 ^a	< 60 ^a	< 60 ^a	150.5	60.6	109.7
Allobétulinol (18)	79.0	< 60 ^a	< 60 ^a	< 60 ^a	87.9	< 60 ^a	71.3	< 60 ^a
Allobétulone (23)	218.0	< 60 ^a	< 60 ^a	< 60 ^a	87.9	< 60 ^a	71.3	< 60 ^a
a-allobétulinol I (20)	136.2	140.0	< 60 ^a	< 60 ^a	88.0	< 60 ^a	71.3	< 60 ^a
a-allobétulinol II (21)	< 60 ^a	< 60 ^a	141.9	131.3	88.0	< 60 ^a	71.3	< 60 ^a

^a Le symbole « < » signifie que le signal se situe dans la portion des protons aliphatiques, entre 2.5 et 1.2 ppm, impossible à interpréter avec un simple RMN ^{13}C

Il est très facile de reconnaître les dérivés de réarrangements par RMN. Dans le réarrangement du cycle E du bétulinol (2), le carbone 19 d'abord lié au groupe isopropényle, forme un lien éther avec la fonction hydroxy- du carbone 28. Ainsi, le proton correspondant, situé à 2.44 ppm pour le bétulinol (2), est déblindé à 3.5 ppm pour les allobétulanes. Celui-ci apparaît sous la forme d'un singulet même s'il est voisin d'un autre proton en C-18. Dans ce cas, le couplage est nul en raison de la stéréochimie gauche de ces

protons [Silverstein, R. M. *et al.*; 1991]. De plus, les signaux situés entre 4.5 et 4.8 ppm sur les spectres des dérivés d'oxydation sont absents pour les allobétulanes. En effet, l'insaturation en C-20(29) disparaît durant le processus de réarrangement. Sur les spectres RMN ^{13}C de tous les dérivés de réarrangement, les signaux correspondants aux deux carbones de la fonction éther sont situés à 88.0 et 71.3 ppm. Le proton en C-3 de l'allobétulinol (18) présente le même signal que pour le bétulinol (2) à 3.2 ppm. De plus, comme pour la bétulone (15), ce proton disparaît dans le spectre de l'allobétulone (23) pour laisser place à un signal complexe à 2.44 ppm causé par le proton en C-2. L'état de la fonction hydroxy- en C-3 est encore plus évident sur les spectres RMN ^{13}C . En effet, pour l'allobétulinol (18), le carbone 3 possède un déplacement chimique de 79.0 ppm alors que pour l'allobétulone (23), le signal est déblindé à 218.0 ppm.

La caractéristique spectrale des dérivés de réarrangement du cycle A est l'absence de signaux à 3.2 ou 2.4 ppm, causés par une fonction alcool ou cétone. Le premier produit de réarrangement, l' α -allobétulin I (20), présente un multiplet à 2.66 ppm, causé par le proton en C-4. La multiplicité du signal s'explique par les deux groupements méthyles attachés au carbone 4, qui apparaissent sous forme de doublet. Pour l'autre produit de réarrangement, l' α -allobétulin II (21), ce signal n'est pas déblindé par une insaturation en α , expliquant ainsi l'absence de pic à 2.66 ppm. Par RMN ^{13}C , la présence d'insaturation se confirme par les signaux observés entre 131 et 142 ppm.

4.6.4. Dérivés de couplage

Les données chromatographiques et MS pour le produit de couplage ne sont pas disponibles car celui-ci n'était pas suffisamment volatil. Les spectres RMN ^1H et ^{13}C sont présentés à l'annexe 4.

Le spectre RMN ^1H démontre bien la réussite du couplage. Le signal à 3.67 ppm est caractéristique d'un groupe méthyle sur une fonction ester. Les protons sur les carbones en position α par rapport aux deux fonctions esters sont aussi déblindés : on les retrouve à 2.33 ppm sous forme d'un signal complexe. La forme de ce pic, très large, s'explique par la similitude de ces groupes de protons et par leur couplage respectif avec les protons voisins. Le proton en C-3, situé à 3.20 ppm sur le spectre de l'allobétulinol (**18**), est déblindé à 4.48 ppm en raison de l'effet de déblindage plus marqué de la fonction ester par rapport à une fonction alcool. La forme du pic est d'ailleurs très similaire au pic de l'allobétulinol (**18**). Finalement, les fonctions esters sont confirmés par RMN ^{13}C avec des pics à 173.6 et 173.0 ppm.

CHAPITRE 5
CONCLUSION

5.1. CONCLUSIONS GÉNÉRALES

D'après la revue de la littérature, l'acide bétulinique (**3**) est un produit naturel de choix pour le développement de nouveaux traitements. En effet, des activités biologiques ont été démontrées pour plusieurs pathologies. L'une des plus étudiées est sans aucun doute l'activité antitumorale. Pour preuve, l'acide bétulinique (**3**) a récemment été inscrit au programme RAID (Rapid Access to Intervention Development) du National Cancer Institute (NCI) aux États-Unis [<http://dtp.nci.nih.gov/docs/raid/raidwin3.html>].

Afin de poursuivre ces études, une source abondante d'acide bétulinique (**3**) est nécessaire. Il a été démontré que l'écorce du bouleau contient en très grande quantité un triterpène proche de l'acide bétulinique (**3**), soit le bétulinol (**2**) (rendement d'extraction et de purification de 11%). Une simple hémisynthèse suffit pour le transformer en acide bétulinique (**3**). Cependant, les stratégies employées pour la synthèse de l'acide bétulinique (**3**) comportent des lacunes. C'est dans ce cadre que cette recherche a été entreprise.

La stratégie de synthèse choisie pour préparer l'acide bétulinique (**3**) consistait à oxyder le bétulinol (**2**) en bétulinal (**14**), puis en acide bétulinique (**3**). Les réactifs testés pour réaliser la première étape étaient le TPAP/NMO, le PDC/SiO₂, le CrO₃/SiO₂ et le Fe(NO₃)₃/SiO₂. Le premier réactif, TPAP/NMO, a permis de préparer quantitativement le bétulonal (**16**). Ce composé n'a jamais été testé pour une activité thérapeutique quelconque. Quant aux réactifs chromés, PDC et CrO₃ adsorbé sur silice, ils ont montré

une certaine sélectivité pour les alcools primaires par rapport aux alcools secondaires. En effet, dans les débuts de la réaction, le bétulinal (14) est présent en plus grande concentration que la bétulone (15). Lorsque les premières traces de bétulonal (16) apparaissent, la réaction est arrêtée et le bétulinal (14) est isolé avec un rendement de 35%. Le bétulinol (2) n'ayant pas réagi pourra être récupéré afin d'être transformé dans une seconde réaction.

Les derniers réactifs choisis, le $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ ou le FeCl_3 adsorbés sur silice, ont permis de préparer l'allobétulinol (18), l'allobétulone (23) et les α -allobétulin I et II (20 et 21). Ces dérivés ne sont pas des produits d'oxydation mais des produits de réarrangements. Ces composés n'ont pas le même squelette triterpénique que l'acide bétulinique (3) ou le bétulinol (2). En effet, ces derniers font partie de la famille des lupanes alors que les dérivés de l'allobétulinol (18) sont de la famille des oléanes. Ces composés n'ont jamais fait l'objet d'étude pour des activités biologiques.

La deuxième étape de la stratégie de synthèse a été réalisée avec le KMnO_4 dans l'acétone à reflux. Le rendement de cette réaction est de 67%. Après optimisation des conditions réactionnelles, il ne serait pas surprenant d'obtenir des rendements proches de 90% puisque la formation de sous-produits n'est pas observée par CCM.

Le dernier objectif du travail était de développer une méthode efficace d'estérification entre un alcool triterpénique et un fragment constitué d'une fonction acide. Ce couplage a été réalisé avec l'allobétulinol (18) et l'adipate de monométhyle (17). Plusieurs conditions réactionnelles ont été testées : BOP (27)/ Et_3N , SOCl_2 et

DCC (29)/DMAP (31). Les derniers réactifs ont donné les meilleurs résultats : le 3-[(6-methoxy-6-oxohexanoyl)oxy-allobétulin (19) a été synthétisé avec un rendement isolé de 35%. La méthode n'est donc pas encore efficace. D'après les CCM, la réaction n'est pas complète puisqu'il y a encore de l'allobétulinol (18) même après 24h.

5.2. PERSPECTIVES FUTURES

L'étape d'oxydation du bétulinol (2) en bétulinol (14) a été effectuée avec un rendement de 35%. Ce type de réaction n'est pas envisageable pour une préparation à grande échelle puisqu'une chromatographie est nécessaire pour isoler le produit de réaction. Un constat très intéressant a tout de même pu être établi : c'est l'acidité de la silice qui permet la réaction avec le CrO_3 . En effet, un essai avec le CrO_3 et l'acide acétique a donné les mêmes résultats qu'avec le réactif $\text{CrO}_3/\text{SiO}_2$.

Si le rendement ne peut être amélioré en variant les conditions de réaction, il faudra envisager l'utilisation d'un autre réactif oxydant. À ce titre, le TEMPO [Siedlecka, R. *et al.*; 1990] et le $\text{RuCl}_2(\text{PPh}_3)_3$ [Tomioka, H. *et al.*; 1981] semblent des réactifs prometteurs.

La réaction avec KMnO_4 devra être optimisée. Le rendement moyen obtenu (67%) s'explique par une mauvaise récupération des produits de réaction. Une méthode pour neutraliser l'excédent de réactif pourra être testée : l'oxalate de calcium dans l'acide sulfurique dilué.

La synthèse de dérivés par réaction d'estérification n'a pas été réussie avec un rendement satisfaisant. Les conditions réactionnelles (quantité de réactif et distillation des solvants) n'ont pas encore été toutes testées. Si les réactifs usuels ne parviennent pas à compléter la réaction, il faudra envisager d'autres réactifs : des sels d'hafnium ont récemment permis la synthèse de plusieurs esters [Ishihara, K. *et al.*; 2000]. La suite de ces travaux consiste à préparer un ester avec l'acide bétulinique (**3**) ou l'acide bétulonique (**9**) et un fragment constituée d'une fonction alcool.

Finalement, il est intéressant de noter que certains dérivés synthétisés n'ont jamais été testés pour une quelconque activité biologique. La bétulone (**15**), le bétulonol (**16**), l'allobétulinol (**18**), l'allobétulone (**23**) et les α -allobétulin I et II (**20** et **21**) devront donc être étudiés pour vérifier leur potentiel thérapeutique.

BIBLIOGRAPHIE

- Anjaneyulu, A. S. R.; Narayana Rao, M.; Sree, A. et Suryanarayana Murty, V.; **1980**, Wagner-Meerwein rearrangements in lupanes, *Indian Journal of Chemistry*, 19B, 735-738.
- Barton, D. H. R. et Holness, N. J.; **1952**, Triterpenoids. Part V. Some relative configurations in rings C, D and E of the β -amyrin and the lupeol group of triterpenoids, *Journal of the Chemical Society*, 78-92.
- Barton, D. H. R.; Ramsay, G. C. et Wege, D. J.; **1967**, *Journal of the Chemical Society*, 1915.
- Breton, G. W.; **1997**, Selective monoacetylation of unsymmetrical diols catalyzed by silica gel-supported sodium hydrogen sulfate, *Journal of Organic Chemistry*, 62, 8952-8954.
- Bringmann, G.; Saeb, W.; Assi, L. A.; François, G.; Narayanan, A. S. S.; Peters, K. et Peters, E.-M.; **1997**, Betulinic acid: isolation from *Triphyophyllum peltatum* and *Ancistrocladus heyneanus*, antimalarial activity, and crystal structure of the benzyl ester, *Planta Medica*, 63, 255-257.
- Budzikiewicz, H.; Wilson, J. M. et Djerassi, C.; **1963**, Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic triterpenes, *Journal of the American Chemical Society*, 85, 3688-3699.
- Carlson, R. M.; Krasutsky, P. A. et Karim, M. R.-U.; **1998**, Use of betulin and analogs thereof to treat herpes virus infection, US Patent 5,750,578.
- Casey, J. P.; **1980**, Pulp and Paper. Chemistry and Chemical Technology, volume 1, "Pulp", 3^e Édition, *John Wiley & Sons*, New York.
- Chang, C.-W.; Wu, T.-S.; Hsieh, Y.-S.; Kuo, S.-C. et Lee Chao, P.-D.; **1999**, Terpenoids of *Syzygium formosanum*, *Journal of Natural Products*, 62, 327-328.

- Cho, S. H.; Gottlieb, K. et Santhanam, U.; **1996**, Cosmetic compositions containing betulinic acid, US Patent 5,529,769.
- Connolly, J. D. et Hill, R. A.; **1991**, Dictionary of Terpenoids, Chapman & Hall, London.
- Corey, E. J.; Lee, J.; **1993**, Enantioselective total synthesis of oleanolic acid, erythrodiol, β -amyrin, and other pentacyclic triterpenes from a common intermediate, *Journal of American Chemical Society*, 115, 8873.
- Cornelis, A. et Laszlo, P.; **1985**, Clay-supported copper (II) and iron (III) nitrates: novel multi-purpose reagents for organic synthesis, *Synthesis*, 909-918.
- Cox, R. J.; Amines, amino acids and peptides. Level II organic lectures, http://www.chm.bris.ac.uk/org/RJCox/Level_II_top.html, Université de Bristol, UK.
- Das Gupta, T. K. et Pezzuto, J. M.; **1997**, Method and composition for selectively inhibiting melanoma using betulinic acid, US Patent 5,658,947
- Dischendorfer, O.; **1923**, Untersuchungen auf dem gebiete der phytochemie 1. Mitteilung Über das betulin, *Monatshefte fur Chemie und Verwandte Teile Anderer*, 44, 123-129.
- Eckerman, C. et Ekman, R.; **1995**, Comparison of solvents for extraction and crystallisation of betulinol from birch bark waste, *Paperi ja Puu*, 100-106.
- Ege, S.; **1994**, Organic Chemistry. Structure and Reactivity, 3^e Edition, D. C. Heath and Company, Lexington, 1355 pages.
- Errington, S. G.; Ghisalberti, E. L. et Jefferies, P. R.; **1976**, The chemistry of the Euphorbiaceae. XXIV. Lup-20(29)-ene-3 β ,16 β ,28-triol from *Beyeria brevifolia* var. *brevifolia*, *Australian Journal of Chemistry*, 29, 1809-1814.

- 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. et Dereu, Norbert; **1996**, Betulinic acid derivatives: a new class of human immunodeficiency virus type 1 specific inhibitors with a new mode of action, *Journal of Medicinal Chemistry*, 39, 1056-1068.
- Fish, P. V. et Johnson, W. S.; **1994**, The first examples of nonenzymatic, biomimetic polyene pentacyclisations: Total synthesis of the pentacyclic triterpenoid sophoradiol, *Journal of Organic Synthesis*, 59, 2324-2335.
- Flora of North America Editorial Committee, **1997**, Flora of North America, vol. 3, *Oxford University Press*, New York, 507-538.
- Fuchino, H.; Konishi, S.; Satoh, T.; Yagi, A. et Saitsu, Kohei; **1996**, Chemical evaluation of Betula species in Japan. II. Constituents of Betula platyphylla var. japonica, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 44(5), 1033-1038.
- Fujioka, T.; Kashiwada, Y.; Kilkuskie, R. E.; Cosentino, L. M.; Ballas, L. M.; Jiang, J. B.; Janzen, W. P.; Chen, I.-S. et Lee, K.-H.; **1994**, Anti-Aids Agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV from Syzigium claviflorum, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids, *Journal of Natural Products*, 57(2), 243-247.
- Fulda, S.; Friesen, C.; Los, M.; Scaffidi, C.; Mier, W.; Benedict, M.; Nunez, G.; Krammer, P. H.; Peter, M. E. et Debatin, K.-M.; **1997**, Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors, *Cancer Research*, 57(21), 4956-4964.
- Fulda, S.; Scaffidi, C.; Susin, S. A.; Krammer, P. H.; Kroemer, G.; Peter, M. E. et Debatin, K.-M.; **1998**, Activation of mitochondria and release of mitochondrial apoptogenic factors by betulinic acid, *Journal of Biological Chemistry*, 273(51), 33942-33948.

- Fulda, S.; Jeremias, I.; Pietsch, T. et Debatin, K.-M.; **1999a**, Betulinic acid: a new chemotherapeutic agent in the treatment of neuroectodermal tumors, *Klinische Paediatric*, 211(4), 319-322.
- Fulda, S.; Jeremias, I.; Steiner, H. H.; Pietsch, T. et Debatin, K.-M.; **1999b**, Betulinic acid: a new cytotoxic agent against malignant brain-tumor cells, *International Journal of Cancer*, 82, 435-441.
- Green, D. R. et Reed, J. C.; **1998**, Mitochondria and apoptosis, *Science*, 281, 1309-1312.
- Harris, D. C.; **1995**, Quantitative Chemical Analysis, 4^e Edition, W. H. Freeman, New York, 837 pages.
- Hashimoto, F.; Kashiwada, Y.; Cosentino, L. M.; Chen, C.-H.; Garrett, P. E. et Lee, K.-H.; **1997**, Anti-AIDS agents - XXVII. Synthesis and anti-HIV activity of betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 5(12), 2133-2143.
- Hassner, A. et Alexanian, V.; **1978**, Direct room temperature esterification of carboxylic acids, *Tetrahedron Letters*, 46, 4475-4478.
- Hayek, E. W. H.; Jordis, U.; Moche, W. et Sauter, F.; **1989**, A bicentennial of betulin, *Phytochemistry*, 28(9), 2229-2242.
- Heemels, M.-T.; Dhand, R. et Allen, L.; **2000**, Apoptosis, *Nature*, 407(6805), 769.
- Hengartner, M. O.; **2000**, The biochemistry of apoptosis, *Nature*, 407(6805), 770-776.
- Holmbom, B. et Avela, E.; **1971**, Studies on tall oil from pine and birch, *Acta Academiae Aboensis, Serie B*, 31(16), 18.

- Hooper, S. N.; Chandler, R. F.; **1984**, Herbal remedies of the Maritime Indians: phytosterols and triterpenes of 67 plants, *Journal of Ethnopharmacology*, 10(2), 181-194.
- Höfle, G.; Steglich, W. et Vorbrüggen, H.; **1978**, 4-dialkylaminopyridines as highly active acylation catalysts, *Angewandte Chemie International Edition*, 17, 569-583.
- Hua, Y.; Bentley, M. D.; Cole, B. J. W.; Murray, K. D. et Alford, A. R.; **1991**, Triterpenes from the outer bark of *Betula nigra*, *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 11(4), 503-516.
- Ikan, R.; **1969**, Natural Products: a laboratory guide, *Academic Press*, London, 301 pages.
- Kirk, R. E.; Othmer, D. F.; Kroschwitz, J. I. et Howe-Grant, M.; **1992**, Encyclopedia of Chemical Technology, vol. 20, "Pulp", 4^e Edition, *John-Wiley & Sons*, New York, 493-582.
- Ishihara, K.; Ohara, S. et Yamamoto, H.; **2000**, Direct condensation of carboxylic acids with alcohols catalyzed by hafnium (IV) salts, *Science*, 290, 1140-1142.
- Jääskeläinen, P.; **1981**, Betulinol and its utilisation, *Paperi Ja Puu*, 63(10), 599-603.
- Jeong, H.-J.; Chai, H.-B.; Park, S.-Y. et Kim, D. S. H. L.; **1999**, Preparation of amino acid conjugates of betulinic acid with activity against human melanoma, *Bioorganic & Medicinal Letters*, 9, 1201-1204.
- Johnson, W. S.; Plummer, M. S.; Reddy, S. P. et Bartlett, W. R.; **1993**, The fluorine atom as a cation-stabilizing auxiliary in biomimetic polyene cyclizations. 4. Total synthesis of *dl*- β -amyrin, *Journal of American Chemical Society*, 115, 515-521.
- Kashiwada, Y.; Hashimoto, F.; Cosentino, L. M.; Chen, C.-H.; Garrett, P. E. et Lee, K.-H.; Betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives as potent anti-HIV agents, *Journal of Medicinal Chemistry*, 39, 1016-1017.

- Khadilkar, B. et Borkar, S.; **1998**, Silica gel supported ferric nitrate: a convenient oxidizing reagent, *Synthetic Communications*, 28, 207-212.
- Khadilkar, B.; Chitnavis, A. et Khare, A.; **1996**, An easy preparation of silica gel supported chromium trioxide oxidant and its use in the selective oxidation of alcohols, *Synthetic Communications*, 26(2), 205-210.
- Kim, D. S. H. L.; Chen, Z.; Nguyen, T.; Pezzuto, J. M.; Qiu, S. et Lu, Z.-Z.; **1997**, A concise semi-synthetic approach to betulinic acid from betulin, *Synthetic Communications*, 27(9), 1607-1612.
- Kinoshita, K.; Yang, Y.; Koyama, K.; Takahashi, K. et Nishino, H.; **1999**, Inhibitory effect of some triterpenes from cacti on 32Pi-incorporation into phospholipids of HeLa cells promoted by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, *Phytomedicine*, 6(2), 73-77, 1999.
- Labrosse, B.; Pleskoff, O.; Sol, N.; Jones, C.; Hénin, Y. et Alizon, M.; **1997**, Resistance to a drug blocking human immunodeficiency virus type 1 entry (RPR103611) is conferred by mutations in gp41, *Journal of Virology*, 71(11), 8230-8236.
- Laszlo, P.; **1990**, Les argiles en chimie organique, *La recherche*, 219, 314-323.
- Lavoie, S.; **2000**, Proposition de synthèse totale du lupéol, *Université du Québec à Chicoutimi*.
- Lawrie, W.; McLean, J. et Taylor, G. R.; **1960**, Triterpenoids in the bark of mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.), *Journal of the Chemical Society*, 4303-4309.
- Li, T.-S.; Wang, J.-X. et Zheng, X.-J.; **1998**, Simple synthesis of allobetulin, 28-oxyallobetulin and related biomarkers from betulin and betulinic acid catalysed by solid acids, *Journal of Chemical Society, Perkin Transaction I*, 3957-3965.

- Linkowska, E.; **1994**, Triterpenoids. Part XI. [II] Isomerization of betulin and its derivatives, *Polish Journal of Chemistry*, 68, 875-876.
- Lugemwa, F. N.; Huang, F.-Y.; Bentley, M. D.; Mendel, M. J. et Alford, A. R.; **1990**, A heliothis zea from abundant birchbark triterpene betulin, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 38, 493-496.
- Ma, C.; Nakamura, N.; Miyashiro, H.; Hattori, M. et Shimotohno, K.; **1999**, Inhibitory effects of constituents from Cynomorium songaricum and related triterpene derivatives of HIV-1 protease, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 47(2), 141-145.
- Ma, J.; Starck, S. R. et Hecht, S. M.; **1999**, DNA polymerase b inhibitors from Tetracera Boiviniana, *Journal of Natural Products*, 62, 1660-1663.
- Mahato, S.; Nandy, A. K. et Roy, G.; **1992**, Triterpenoids, *Phytochemistry*, 31(7), 2199-2249.
- Mahato, S. et Sucharita, S.; **1997**, Advances in triterpenoids research, 1990-1994, *Phytochemistry*, 44(7), 1185-1236.
- Máñez, S.; Recio, M. D. C.; Giner, R. M. et Ríos, J.-L.; **1997**, Effect of selected triterpenoids on chronic dermal inflammation, *European Journal of Pharmacology*, 334, 103-105.
- March, J.; **1992**, Advanced Organic Chemistry. Reactions, mechanisms and structure, 4^e Edition, *John Wiley & Sons*, New York, 1495 pages.
- Marie-Victorin; **1995**, Flore Laurentienne, 3^e Edition, *Les Presses de l'Université de Montréal*, Montréal, 1093 pages.
- Mayaux, J.-F.; Bousseau, A.; Pauwels, R.; Huet, T.; Hénin, Y.; Dereu, N.; Evers, M.; Soler, F.; Poujade, C.; De Clercq, E. et Le Pecq, J.-B.; **1994**, Triterpene derivatives

- that block entry of human immunodeficiency virus type 1 into cells *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 3564-3568.
- Miles, D. H.; Kokpol, U.; Zalkow, L. H.; Steindel, S. J. et Nabors, J. B.; 1974, Tumor inhibitors I: Preliminary investigation of antitumor activity of *Sarracenia flava*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 63(4), 613-615.
- Miller, L. J. et Marx, J.; 1998, Apoptosis, *Science*, 281, 1301.
- Nagourney, R. A.; Su, Y. Z.; Makalinao, A. J.; Ciarolla, A. et Evans, S. S.; 1996, Preliminary analysis of betulinic acid in human tumor primary cultures, *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, 37, #2724.
- Nishiguchi, T. et Asano, F.; 1989, Oxidation of alcohols by metallic nitrates supported on silica gel, *Journal of Organic Chemistry*, 54, 1531-1535.
- Noda, Y.; Kaiya, T.; Kohda, K. et Kawazoe, Y.; 1997, Enhanced cytotoxicity of some triterpenes toward leukemia L1210 cells cultured in low pH media: possibility of a new mode of cell killing, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 45(10), 1665-1670.
- O'Connell, M. M.; Bentley, M. D.; Campbell, C. S. et Cole, B. J. W.; 1988, Betulin and lupeol in bark from four white barked birches, *Phytochemistry*, 27(7), 2175-2176.
- Pavanasasivam, G. et Sultanbawa, M. U. S.; 1974, Betulinic acid in the Dilleniaceae and a review of its natural distribution, *Phytochemistry*, 13, 2002-2006.
- Pezzuto, J. M.; 1995, Natural Product cancer chemopreventive agents, dans *Phytochemistry of Medicinal Plant*, Plenum Press, New York, 19-45.
- Pezzuto, J. M. et Kim, D. S. H. L.; 1998, Methods of manufacturing betulinic acid, US Patent 5,804,575.

- Pezzuto, J. M.; Das Gupta, T. K. et Kim, D. S. H. L.; **1999a**; Method and composition for selectively inhibiting melanoma, US Patent 5,869,535.
- Pezzuto, J. M.; Das Gupta, T. K.; Schmidt, M. L.; Kuzmanoff, K. M.; Ling-Indeck, L. et Kim, D. S. H. L.; **1999b**, Method and composition for treating cancers, US Patent 5,962,527.
- Pisha, E.; Chai, H.; Lee, I.-S.; Chagwedera, T. E.; Farnsworth, N.; Cordell, G. A.; Beecher, C. W. W.; Fong, H. H. S.; Kinghorn, A. D.; Brown, D. M.; Wani, M. C.; Wall, M. E.; Hieken, T. J.; Gupta, D. et Pezzuto, J. M.; **1995**, Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis, *Nature Medicine*, 1(10), 1046-1051.
- Ramadoss, S.; Jaggi, M. et Siddiqui, M. J. A.; **2000**, Use of betulinic acid and its derivatives for inhibiting cancer growth and a method of monitoring this, US Patent 6,048,847.
- Recio, M. D. C.; Giner, R. M.; Máñez, S.; Gueho, J.; Julien, H. R.; Hostettmann, K. et Ríos, J. L.; **1994**, Investigations on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomelas*, *Planta Medica*, 61, 9-12.
- Rieber, M. et Strasberg-Rieber, M.; **1998**, Induction of p53 without increase in p21WAF1 betulinic acid-mediated cell death is preferential for human metastatic melanoma, *DNA Cell Biology*, 17, 399-406.
- Saleh, N. A. M. et Towers, G. H. N.; **1971**, Chemical examination of the barks and hearthwoods of *Betula* species of american origin, *Phytochemistry*, 10, 897-898.
- Schmidt, J. et Huneck, S.; **1979**, Mass spectroscopy of natural products. V. Mass spectroscopic studies of ring A substituted allobetulanes derivatives, *Organic Mass Spectrometry*, 14(12), 646-655.

- Schühly, W.; Heilmann, J.; Çalis, I. et Sticher, O.; **1999**, New triterpenoids with antibacterial activity from *Zizyphus joazeiro*, *Planta Medica*, 65, 740-743.
- Schulze, H. et Pieroh, K.; **1922**, Zur kenntnis des betulins, *Chemische Berichte*, 55, 2332-2336.
- Sechadri, T. R. et Vedantham, T. N. C.; **1971**, Chemical examination of the barks and hearthwoods of *Betula* species of american origin, *Phytochemsitry*, 10, 897-898.
- Setzer, W. N.; Setzer, M. C.; Bates, R. B. et Jackes, B. R.; **2000**, Biologically active triterpenoids of *Syncarpia glomulifera* bark extract from paluma, north Queensland, Australia, *Planta Medica*, 66, 176-177.
- Siedlecka, R.; Skarzewski, J. et Mlochowski, J.; **1990**, Selective oxidation of primary hydroxy groups in primary-secondary diols, *Tetrahedron Letters*, 31(15), 2177-2180.
- Silverstein, R. M.; Bassler, G. C. et Morrill, T. C.; **1991**, Spectrometric identification of organic compounds, 5th Edition, *John Wiley & Sons*, New York, 419 pages.
- Sheth, K.; Bianchi, E.; Wiedhopf, R. et Cole, J. R.; **1973**, Antitumor agents from *Alnus oregona* (Betulaceae), *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 62(1), 139-140.
- 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. et Dereu, Norbert; **1996**, Betulinic acid derivatives: a new class of specific inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 entry, *Journal of Medicinal Chemistry*, 39, 1069-1083.
- Steele, J. C. P.; Warhurst, D. C.; Kirby, G. C. et Simmonds, M. S. J.; **1999**, In vitro and in vivo evaluation of betulinic acid as an antimalarial, *Phytotherapy Research*, 13, 115-119.

- Stork, G.; Uyeo, S.; Wakamatsu, T.; Grieco, P. et Labovitz, J.; **1971**, The total synthesis of lupeol, *Journal of American Chemical Society*, 93, 4945.
- Swanson, S. M.; Cho, K. H.; Shin, Y. G.; Pezzuto, J. M. et Das Gupta, T. K.; **1999**, Betulinic acid does not require metabolic activation to induce apoptosis in melanoma cells, *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, 40, #3223.
- Thornberry, N. A. et Lazebnik, Y.; **1998**, Caspases: enemies within, *Science*, 281, 1312-1316.
- Tinto, W. F.; Blair, L. C et Alli, A.; **1992**, Lupane triterpenoids of Salacia Cordata, *Journal of Natural Products*, 55(3), 395-398.
- Tomioka, H.; Takai, K.; Oshima, K. et Nozaki, H.; **1981**, Selective oxidation of a primary hydroxyl in the presence of secondary one, *Tetrahedron Letters*, 22(17), 1605-1608.
- Torssell, K. B. G.; **1983**, Natural Product Chemistry, 1^e Édition, John Wiley & Sons Limited, Chichester, 401 pages.
- Udeani, G. O; Zhao, G.-M.; Shin, Y. G.; Cooke, B. P.; Graham, J.; Beecher, C. W. W.; Kinghorn, A. D. et Pezzuto, J. M.; **1999**, Pharmacokinetics and tissue distribution of betulinic acid in CD-1 mice, *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 20, 379-383.
- Varma, R. S. et Saini, R. K.; **1998**, Wet alumina supported chromium(VI) oxide : selective oxidation of alcohols in solventless system, *Tetrahedron Letters*, 39, 1481-1482.
- Vogel, A. I. et Furniss, B. S. ; **1994**, Vogel's textbook of practical organic chemistry, John Wiley & Sons, 5^e Edition, New York, 1514 pages.
- Vollhardt, K. P. C et Schore, N. E.; **1999**, Traité de Chimie Organique, 3^e Edition, De Boeck & Larcier s.a., Paris, 1297 pages.

- Wick, W.; Grimmel, C.; Wagenknecht, B.; Dichgans, J. et Weller, M.; **1999**, Betulinic acid-induced apoptosis in glioma cells: A sequential requirement for new protein synthesis, formation of reactive oxygen species, and caspase processing, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 289(3), 1306-1312.
- Yasukawa, K.; Takido, M.; Matsumoto, T.; Takeuchi, M. et Nakagawa, S.; **1991**, Sterol and triterpene derivatives from plants inhibit the effects of a tumor promoter, and sitosterol and betulinic acid inhibit tumor formation in mouse skin two-stage carcinogenesis, *Oncology*, 48, 72-76.
- Yasukawa, K.; Akihisa, T.; Yoshida, Z.-Y. et Takido, M.; **2000**, Inhibitory effect of euphol, a triterpene alcohol from the roots of *Euphorbia kansui*, on tumour promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52, 119-124.
- Ziegler, F. E. et Berger, G. D.; **1979**, A mild method for the esterification of fatty acids, *Synthetic Communications*, 9(6), 539-543.

ANNEXE 1

Liste des abréviations

Ac ₂ O	anhydride acétique
AcOH	acide acétique
ADN	<u>a</u> cide <u>d</u> ésoxyribo <u>n</u> ucléique
ADP	<u>a</u> dénosine <u>d</u> iphosphate
AIF	<u>f</u> acteur <u>i</u> nduisant l' <u>a</u> ptose
AgNO ₃	nitrate d'argent
Al ₂ O ₃	alumine
AZT	3'- <u>a</u> zido-3'-déoxythimidine
BOP (27)	hexafluorophosphate de <u>b</u> enzotriazolyl-N- <u>o</u> xytris(diméthylamino) <u>p</u> hosponium
CAM	<u>m</u> olybdate d' <u>a</u> mmonium <u>c</u> érique
CCM	<u>c</u> hromatographie sur <u>c</u> ouche <u>m</u> ince
CdCl ₂	chlorure de cadmium
CDCl ₃	chloroforme deutéré
Ce(SO ₄) ₄ (NH ₄) ₄	sulfate d'ammonium cérique
CHCl ₃	chloroforme
CH ₂ N ₂ (33)	diazométhane
CrO ₃	trioxyde de chrome
DCC (29)	<u>d</u> icyclohexyl <u>c</u> arbodiimide
DCM	<u>d</u> ichloro <u>m</u> éthane
DCU (30)	<u>d</u> icyclohexyl <u>u</u> rée
DHP	<u>d</u> ihydropyranne
DMAP (31)	N,N- <u>d</u> iméthyl <u>a</u> minopyridine
DMBA	7,12- <u>d</u> iméthyl <u>b</u> enz[<u>a</u>]anthracène
DMF	<u>d</u> iméthyl <u>f</u> ormamide
DMSO	<u>s</u> ulfo <u>x</u> ide de <u>d</u> iméthyle
ED ₅₀	dose efficace pour inhiber 50% de l'activité
EI	<u>i</u> onisation <u>é</u> lectronique
EtOAc	<u>a</u> cétate d' <u>é</u> thyle

EtOH	é <u>th</u> anol
Et ₃ N	trié <u>th</u> ylamine
FeCl ₃ • 6H ₂ O	chlorure de fer hexahydrate
Fe(NO ₃) ₃ • 9H ₂ O	nitrate de fer nonahydrate
GC	ch <u>ro</u> matographie gazeuse
HBr	acide bromique
HCl	acide chlorhydrique
HCOOH	acide formique
H ₂ CrO ₄	acide chromique
H ₂ O	eau
H ₂ SO ₄	acide sulfurique
IC ₅₀	concentration inhibant <u>50</u> % de l'activité
KOH	hydroxyde de potassium
KMnO ₄	permanganate de potassium
MeOH	mé <u>th</u> anol
MoO ₄ (NH ₄) ₂	molybdate d'ammonium
MS	spectrométrie de <u>ma</u> sse
NaBH ₄	borohydrure de sodium
Na ₂ SO ₄	sulfate de sodium
NCI	<u>n</u> ational <u>c</u> ancer <u>i</u> nstitute
NMO	N-méthylmorpholine-N-oxide
ODC	<u>o</u> rnithine <u>d</u> é <u>c</u> arboxylase
PARP	poly(<u>A</u> DP- <u>r</u> ibose) polymérase
PCC	pyridinium <u>ch</u> loro <u>ch</u> romate
PDC	pyridinium <u>d</u> ichromate
PE	é <u>th</u> er de p <u>é</u> trole
PPTS	<u>p</u> - <u>t</u> oluène <u>s</u> ulfonate de pyridine
Py	<u>py</u> ridine
RAID	“Rapid Access to Intervention Development”

R _f	facteur de <u>r</u> étention
RMN	<u>r</u> ésonance <u>m</u> agnétique <u>n</u> ucléaire
RuCl ₂ (PPh ₃) ₃	dichlorotris(triphénylphosphine)ruthénium
SiO ₂	gel de silice
SO ₂	dioxyde de soufre
SOCl ₂	chlorure de thionyle
TEMPO	2,2,6,6- <u>t</u> étraméthylpypéridyl <u>o</u> xyle
THF	<u>t</u> étra <u>h</u> ydro <u>f</u> urane
THP	<u>t</u> étra <u>h</u> ydro <u>p</u> yrane
TI	<u>i</u> ndice <u>t</u> hérapeutique
TMS	<u>t</u> étraméthyl <u>s</u> ilane
TNF	« tumor necrosis factor »
TPA	12-O- <u>t</u> étradécanoylphorbol-13- <u>a</u> cétate
TPAP	perruthenate de <u>t</u> étrapropyl <u>a</u> mmonium
T _R	<u>t</u> emps de <u>r</u> étention
UV	<u>u</u> ltraviolet
VIH	<u>v</u> irus de l' <u>i</u> mmuno-déficienc <u>e</u> <u>h</u> umaine

Abréviation pour la RMN

c	complexe
d	doublet
dd	doublet de doublet
δ	déplacement chimique
J	constante de couplage
m	multiplet
s	singulet
t	triplet
td	triplet de doublet

ANNEXE 2

ARTICLE PUBLIÉ DANS "SYNTHETIC COMMUNICATIONS"

SYNTHESIS OF BETULIN DERIVATIVES WITH SOLID SUPPORTED REAGENTS.

Serge Lavoie^{†,‡}, André Pichette^{†,‡,a}, François-Xavier Garneau[†], Michel Girard[§] and Daniel Gaudet[‡]

[†] LASEVE, Université du Québec à Chicoutimi, 555 boul. Université, Chicoutimi, Québec, Canada, G7H 2B1

[‡]Chicoutimi Hospital Research Unit, 305 St-Vallier, Chicoutimi, Québec, Canada, G7H 5H6

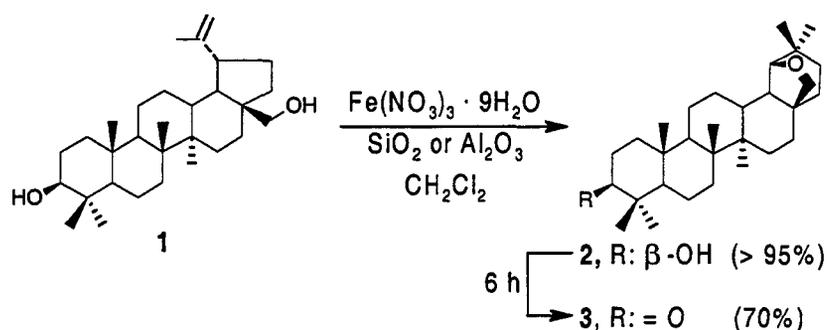
[§]Bureau of Biologics and Radiopharmaceuticals, Therapeutic Products Programme, Health Canada, Sir F. G. Banting Research Center, Tunney's Pasture, Ottawa, Ontario, Canada, K1A 0L2

Abstract: Betulin - allobetulin transformation is effected with ferric nitrate or ferric chloride adsorbed onto silica gel or alumina, in excellent yields. In addition, allobetulin can be converted to allobetulone with silica adsorbed ferric nitrate or to 19 β ,28-epoxy-A-neo-18 α -olean-3(5)-ene and 19 β ,28-epoxy-A-neo-5 β -methyl-25-nor-18 α -olean-9-ene with silica or alumina adsorbed ferric chloride.

Betulin (1), a triterpene of the lupane family, is found in large amounts in white birch bark (*Betula papyrifera* March)¹. Since it is abundant and easy to extract and purify, betulin is an interesting substrate for synthesizing several triterpene derivatives presenting various biological activities.²⁻⁴ Allobetulin, one of these derivatives, is often prepared from betulin in low yields, using various acids⁵⁻¹⁰. This transformation was recently achieved in good yields, with acid reagents previously adsorbed onto solid supports or even with certain solid supports used alone¹¹.

^aTo whom correspondence should be addressed

Our laboratory is interested in developing simple methods for synthesizing derivatives of betulin. Various oxidizing agents adsorbed onto solid supports have been tested, since in some cases, selective oxidations can be performed with these reagents, under mild reaction conditions¹². It has been reported in the literature that alcohol functions can be efficiently oxidized with iron nitrate ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$) adsorbed onto clays or silica gel¹³. However, in the course of our studies on the oxidation of betulin, we discovered that allobetulin (**2**) could be quantitatively prepared with this reagent, and in very short reaction times (Scheme 1). In addition, we noted that allobetulone could be synthesized in good yields, when longer reaction times were used.



Scheme 1

The reagent was prepared by grinding iron nitrate with silica gel or alumina. The obtained yellowish powder was combined with betulin (1) dissolved in CH_2Cl_2 and then refluxed. Under these conditions, allobetulin (**2**) was obtained in yields exceeding 95% in 15 minutes (Table 1). If the reaction is maintained for 6 hours, allobetulin (**2**) is transformed into allobetulone (**3**) in 70% yield. To our knowledge, the synthesis of allobetulone (**3**) from betulin (1) in a single step has never been reported. Other allobetulone (**3**) synthetic approaches reported in the literature always involve two synthetic steps^{14,15}.

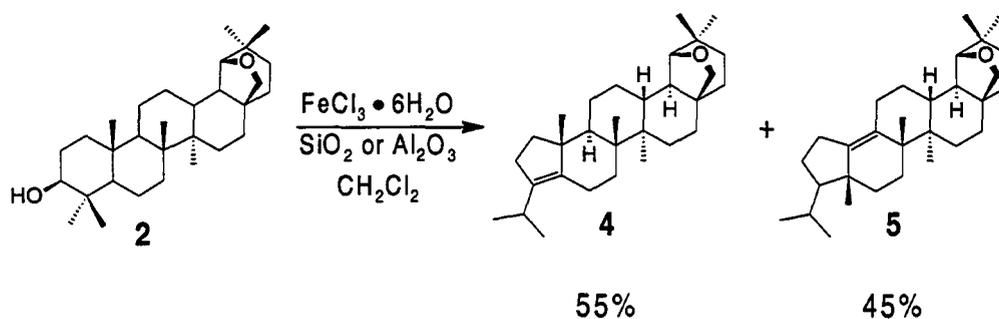
The transformation shown in scheme 1 occurs via a rearrangement of betulin's E ring (1). This rearrangement is due to the Lewis acid nature of the iron of $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, and is not due to the adsorbent. Indeed, when betulin is combined with the adsorbent alone, no reaction is observed. However, the reaction between the unadsorbed $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ and betulin is much slower, indicating that the adsorbent greatly accelerates the reaction's progression. The transformation to allobetulin (2) with a well-known Lewis acid such as FeCl_3 adsorbed onto either of the two adsorbents is even faster than with the adsorbed $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ (Table 1). These observations seem to indicate that $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ initially acts as a Lewis acid rather than an oxidant.

Allobetulone (3) can be obtained in excellent yields if the reaction between $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ adsorbed on silica gel and betulin is maintained for a six-hour period. In this case, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ adsorbed onto silica gel first transforms betulin into allobetulin and subsequently acts as an oxidant by transforming the secondary alcohol function into a ketone. It is important to specify that oxidation of the secondary alcohol is solely observed when silica gel is used as the adsorbent. Increasing the reaction time between betulin and FeCl_3 or adsorbed FeCl_3 results in the formation of two allobetulin derived products: 19 β ,28-epoxy-A-*neo*-18 α -olean-3(5)-ene (4) and 19 β ,28-epoxy-A-*neo*-5 β -methyl-25-*nor*-18 α -olean-9-ene (5) (Scheme 2). The formation of such ring-A contracted products has been previously studied in lupane type triterpenes¹⁶ and rationalized on the basis of Wagner-Meerwein rearrangements. As such, the products resulted from 1,2-hydride and alkyl shifts following the initial generation of a carbocation by the acid-catalyzed loss of the 3 β -OH in ring A.

Table 1 : Transformation of betulin with solid supported reagents^a.

Reaction	Reagent ^a	Solid support	Reaction time	Yield ^b			
				2	3	4	5
1	FeCl ₃	SiO ₂	5 min.	> 95%	-	-	-
2	FeCl ₃	SiO ₂	2 h	-	-	55 %	45 %
3	FeCl ₃	Al ₂ O ₃	5 min	> 95%	-	-	-
4	FeCl ₃	Al ₂ O ₃	2 h	-	-	55 %	45 %
5	FeCl ₃	-	5 min	> 95%	-	-	-
6	FeCl ₃	-				55%	45%
7	Fe(NO ₃) ₃	SiO ₂	15 min	> 95%	-	-	-
8	Fe(NO ₃) ₃	SiO ₂	6 h	-	70 %	trace	trace
9	Fe(NO ₃) ₃	Al ₂ O ₃	30 min	> 95%	-	-	-
10	Fe(NO ₃) ₃	-	90 min	> 95%	-		

^a FeX₃/adsorbent ratio 1:4 (wt/wt), solvent : CH₂Cl₂, room temperature, magnetic stirring. ^b GC-determined. Isolated yield are available in experimental section.

**Scheme 2**

Experimental section

General : Reagents and solid supports were bought and used without purification. GC-MS analyses were performed with a HP 5890 / HP 5972 instrument. Separation was achieved on a 25 m x 0.25 mm i.d. HP-5MS capillary column. The operating conditions were as follows: injector temperature 280 °C, column temperature 100 °C (1 min), 100 ° - 280 °C (25 °C/min), 280 ° - 325 °C (5 °C/min) and 325 °C (30 min), carrier gas (helium) flow-rate 1 mL/min. NMR spectra were done with Bruker (300 and 400 MHz) instruments. Thin-layer chromatographies were performed on silica gel-covered glass plates 60F₂₅₄ (Merck).

Isolation of betulin (1) : Finely ground birch bark (100 g) was macerated under reflux in 1 L of chloroform. The mixture was filtered and then vacuum-evaporated to obtain 28 g of crude betulin (1). This extract was purified by silica gel chromatography using a petroleum ether and ethyl acetate solution as eluent (90:10 to 85:15). Betulin (17 g) was obtained as a white solid which was >95 % pure by GC and shown only one spot on TLC. Only signals due to this compound were observed and were essentially identical to the NMR spectrum of the literature¹⁷. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4.68 (1 H, d, H-29), 4.58 (1 H, d, H-29), 3.77 (1 H, d, J = 7.8 Hz, H-28), 3.31 (1 H, d, J = 7.8 Hz, H-28), 3.18 (1 H, m, H-3), 2.38 (1 H, m, H-19), 1.02 - 1.95 (complex, CH₂, CH), 1.68, 1.02, 0.98, 0.96, 0.82, 0.76 (18 H, all s, 6 × CH₃); EIMS, *m/z*, 442 (M⁺, 5%), 43 (100), 95 (96), 55 (96), 81 (95), 69 (84), 41 (81), 67 (79), 93 (79), 189 (76).

Example of reagent preparation : Fe(NO₃)₃ • 9H₂O (0.2 g, 0.50 mmol) and silica gel (0.8 g) were ground in a mortar until a fine homogeneous powder was obtained. Other reagents were prepared using the same mass ratio (1 : 4).

Preparation of allobetulin (2): Betulin (1, 50 mg, 0.11 mmol) was dissolved into 10 mL of freshly distilled dichloromethane. The solution was heated at reflux, then 456 mg of $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 / \text{SiO}_2$ (0.22 mmol $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$) was added and the resulting mixture was stirred for 30 min. When the reaction was over (followed by TLC, approximately 30 min), the solution was filtered through a sintered glass funnel covered with silica gel. The solution was then thoroughly rinsed with a solution of 2% methanol in dichloromethane. The solvent was removed by vacuum-distillation and 45.5 mg of allobetulin (2) was obtained as an amorphous solid, in 91% yield. The isolated product was >95 % pure by GC and shown only one spot by TLC. Only signals due to this compound were observed and essentially identical to the NMR spectrum of the literature¹⁵. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 3.76 (1 H, d, $J = 7.8$ Hz, H-28), 3.53 (1 H, s, H-19), 3.44 (1 H, d, $J = 7.8$ Hz, H-28), 3.20 (1 H, m, H-3), 1.01 - 1.78 (complex, CH_2 , CH), 0.98, 0.93, 0.92, 0.85, 0.80, 0.77 (21 H, all s, $7 \times \text{CH}_3$); EIMS, m/z , 442 (M^+ , 9%), 81 (100), 95 (92), 69 (90), 43 (86), 189 (80), 55 (78), 207 (70), 41 (69), 135 (59).

The reagent can also be prepared with $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ and alumina as solid support.

Preparation of allobetulone (3): To obtain allobetulone (3), the previous reaction was maintained another 6 h. Afterwards, the mixture was filtered with a sintered glass funnel covered with silica gel (1 cm). Thorough rinsing with a dichloromethane solution containing 2% methanol was required for maximum product recovery. The solvent was vacuum evaporated and allobetulone (3) was recovered as an amorphous solid (35 mg, 70 %) by silica gel chromatography with a petroleum ether/ethyl acetate 95:5 mixture. The isolated product was >95 % pure by GC and shown only one spot on TLC. Only signals due to this compound were observed and were essentially identical to the NMR spectrum of the literature¹⁵. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 3.78 (1 H, d, $J = 6$ Hz, H-28),

3.53 (1 H, s, H-19), 3.45 (1 H, d, J = 6 Hz, H-28), 2.46 (2 H, m, H-2), 1.94 (1 H, m, H-5), 1.20 - 1.75 (complex, CH₂, CH), 1.08, 1.03, 1.01, 0.94, 0.93, 0.92, 0.80 (21 H, all s, 7 × CH₃); EIMS, *m/z*, 440 (M⁺, 22%), 81 (100), 55 (91), 69 (85), 95 (79), 41 (75), 43 (66), 67 (63), 93 (54), 107 (54).

Preparation of 19 β ,28-epoxy-A-neo-18 α -olean-3(5)-ene (4) and of 19 β ,28-epoxy-A-neo-5 β -methyl-25-nor-18 α -olean-9-ene (5) : These products were obtained by maintaining the reaction with ferric chloride an additional hour. The reaction medium was then filtered with a sintered glass funnel covered with a layer of silica gel (1 cm). Both products were isolated by chromatography with 10% AgNO₃-SiO₂ using a petroleum ether solution containing dichloromethane as eluent (90:10 to 50:50 v/v). 19 β ,28-epoxy-A-neo-18 α -olean-3(5)-ene (4, 10 mg) and 19 β ,28-epoxy-A-neo-5 β -methyl-25-nor-18 α -olean-9-ene (5, 15 mg) were obtained as amorphous solids, which were >90 % pure GC and shown only one spot by TLC. Only signals due to these compounds were observed and were essentially identical to the NMR spectra of the literature¹¹. 4 ¹H NMR (CDCl₃) δ 3.81 (d, J = 8 Hz, 1 H, H-28), 3.57 (s, 1 H, H-19), 3.47 (d, J = 8 Hz, 1 H, H-28), 2.66 (m, 1 H, H-4), 1.10 – 2.31 (complex, CH₂, CH), 1.00, 0.94 (all d, J = 6.9 Hz, 6 H, H-23 and H-24), 1.06, 0.96, 0.89, 0.88, 0.82 (all s, 21 H, 5 × CH₃); EIMS, *m/z*, 424 (M⁺, 5%), 121 (100), 381 (82), 135 (79), 93 (72), 136 (67), 107 (65), 161 (59), 81 (59), 95 (54). 5 ¹H NMR (CDCl₃) δ 3.82 (d, J = 8 Hz, 1 H, H-28), 3.57 (s, 1 H, H-19), 3.47 (d, J = 8 Hz, 1 H, H-28), 1.10 – 2.31 (complex, CH₂, CH), 0.95, 0.91 (all d, J = 6.6 Hz, 6 H, H-23 et H-24), 1.08, 0.95, 0.82, 0.80, 0.79 (all s, 21 H, 5 × CH₃); EIMS, *m/z*, 424 (M⁺, 28%), 55 (100), 69 (89), 119 (79), 105 (78), 41 (72), 95 (70), 189 (69), 81 (67), 91 (64).

Acknowledgements

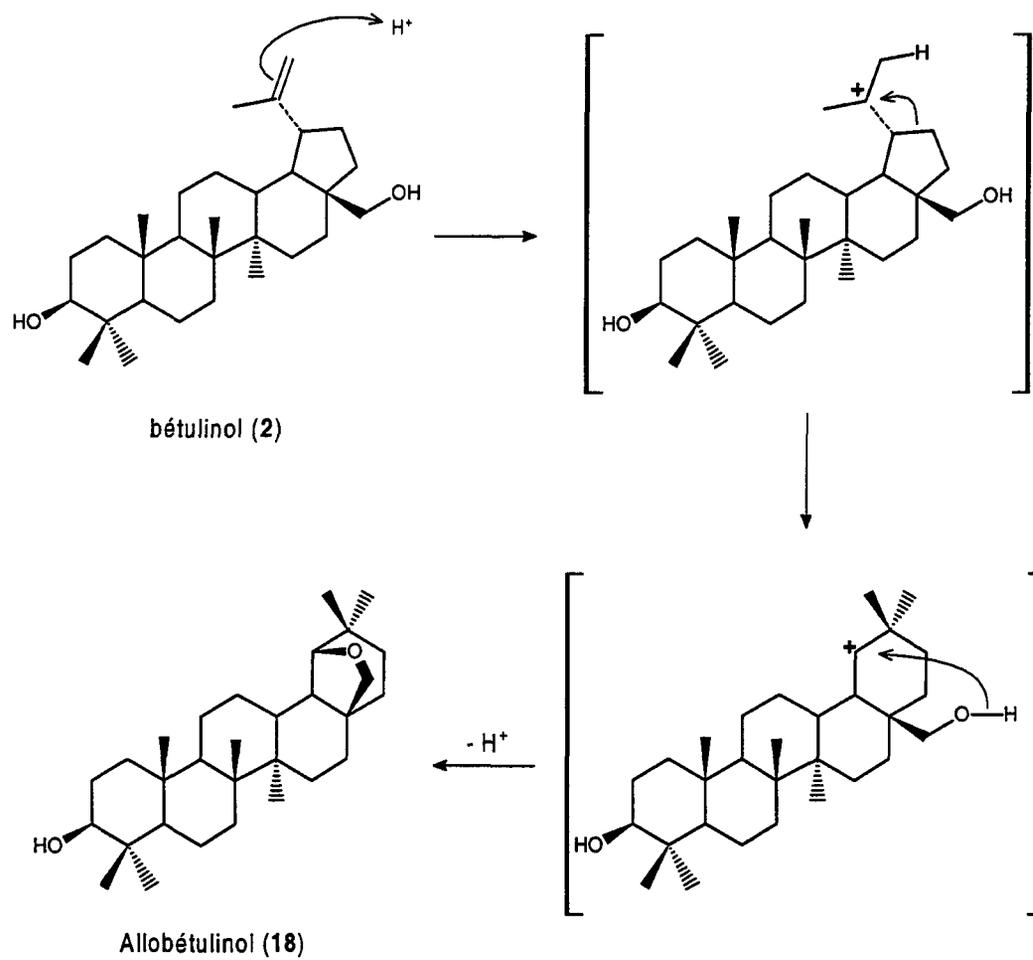
We would like to thank Jimmy Bouchard, Bruce Black and Brian Dawson for their assistance in the NMR experiments. The financial support of the Fondation de l'UQAC is gratefully acknowledged. S. Lavoie thanks PAIR, Bourse Paul-Émile-Boulet and Association des diplômé(e)s et ami(e)s de l'UQAC for graduate scholarships.

References

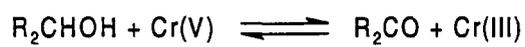
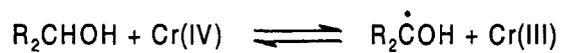
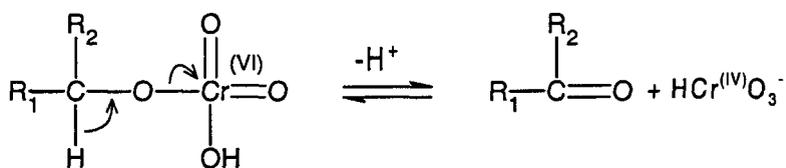
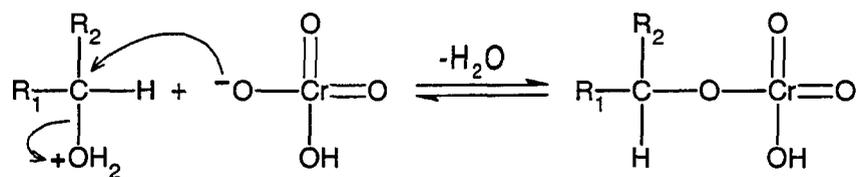
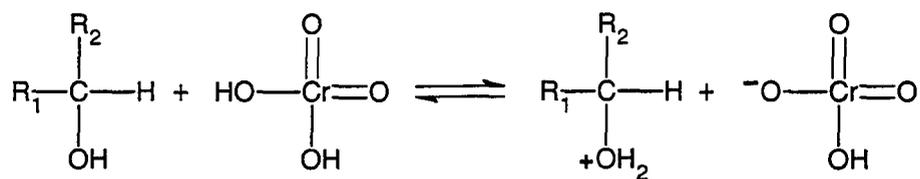
1. O'CONNELL, M. M., BENTLEY, M. D., CAMPBELL, C. S., COLE, B. J. W. Phytochemistry, **1988**, *27*, 2175.
2. PISHA, E., CHAI, H., LEE, I.-S., CHAGWEDERA, T. E., FARNSWORTH, N., CORDELL, G. A., BEECHER, C. W. W., FONG, H. H. S., KINGHORN, A. D., BROWN, D. M., WANI, M. C., WALL, M. E., HIEKEN, T. J., GUPTA, D., PEZZUTO, J. M. Nature Med., **1995**, *1*, 1046.
3. STEELE, J. C. P., WARHURST, D. C., KIRBY, G. C., SIMMONDS M. S. J. Phytother. Res., **1999**, *13*, 115.
4. MÁNEZ, S., RECIO, M. C., GINER, R. M., RÍOS, J.-L. Eur. J. Pharm., **1997**, *334*, 103.
5. SCHULZE, H. et PIEROH, K. Chem. Ber., **1922**, *55*, 2332.
6. DISCHENDORFER, O. Monatsh. Chem., **1923**, *44*, 123.
7. BARTON, D. H. R. et HOLNESS, N. J. J. Chem. Soc., **1952**, 78.
8. LAWRIE, W., McLEAN, J. et TAYLOR, G. R. J. Chem. Soc., **1960**, 4303.

9. BARTON, D. H. R., RAMSAY, G. C. et WEGE, D. J. J. Chem. Soc., **1967**, 1915.
10. ERRINGTON, S. G., GHISALBERTI, E. L. et JEFFERIES, P. R. Aust. J. Chem., **1976**, *29*, 1809.
11. LI, T.-S., WANG, J.-X., ZHENG, X.-J. J. Chem. Soc., Perkin Trans. I., **1998**, 3957.
12. CORNELIS, A. et LASZLO, P. Synthesis, **1985**, 909.
13. KHADILKAR, B. et BORKAR S. Synthetic Communications, **1998**, *28*, 207.
14. LINKOWSKA, E. Polish J. Chem., **1994**, *68*, 875.
15. LUGEMWA, F. N., HUANG, F.-Y., BENTLEY, M. D., MENDEL, M. J. et ALFORD, A. R. J. Agric. Food. Chem., **1990**, *38*, 493.
16. ANJANEYULU, A.S.R., NARAYANA RAO, M., SREE, A. AND SURYANARAYANA MURTY, V., Indian J. Chem., **1980**, *19B*, 735.
17. TINTO, W. F., BLAIR, L. C. and ALLI, A., J. Nat. Prod., **1992**, *55*, 395.

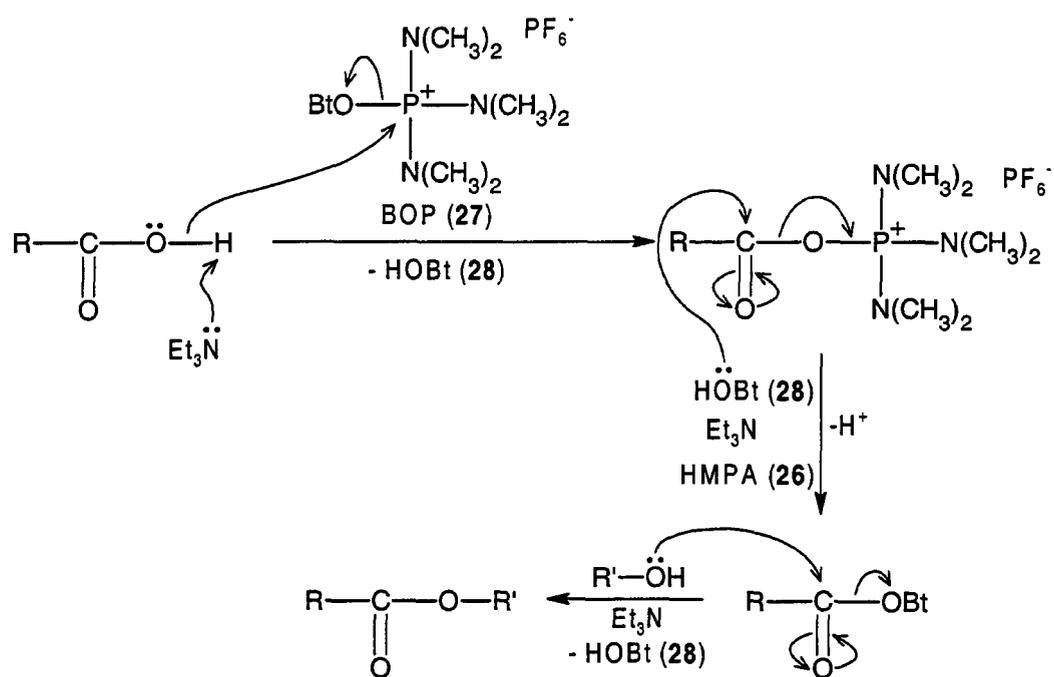
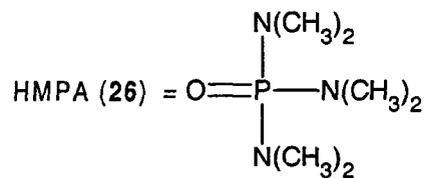
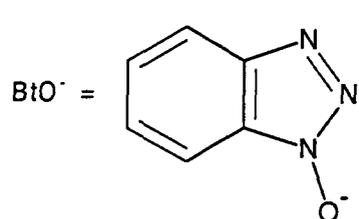
ANNEXE 3
MÉCANISMES RÉACTIONNELS

RÉARRANGEMENT BÉTULINOL (2)/ALLOBÉTULINOL (18) [Ikan, R.; 1969]

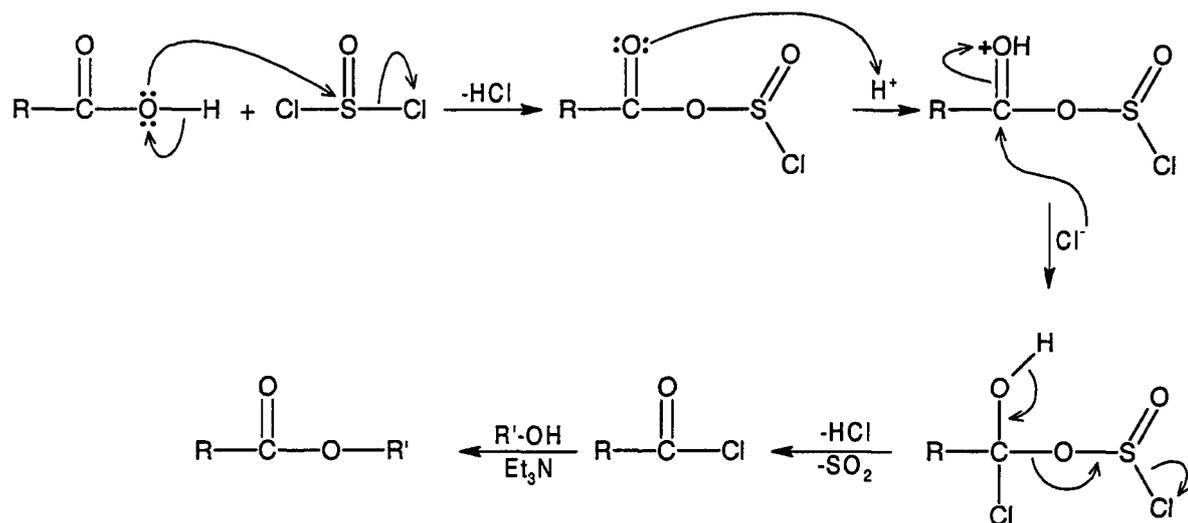
OXYDATION H_2CrO_4 [March, J.; 1992]



ESTÉRIFICATION AVEC BOP (27)/Et₃N [Cox, R. J.]

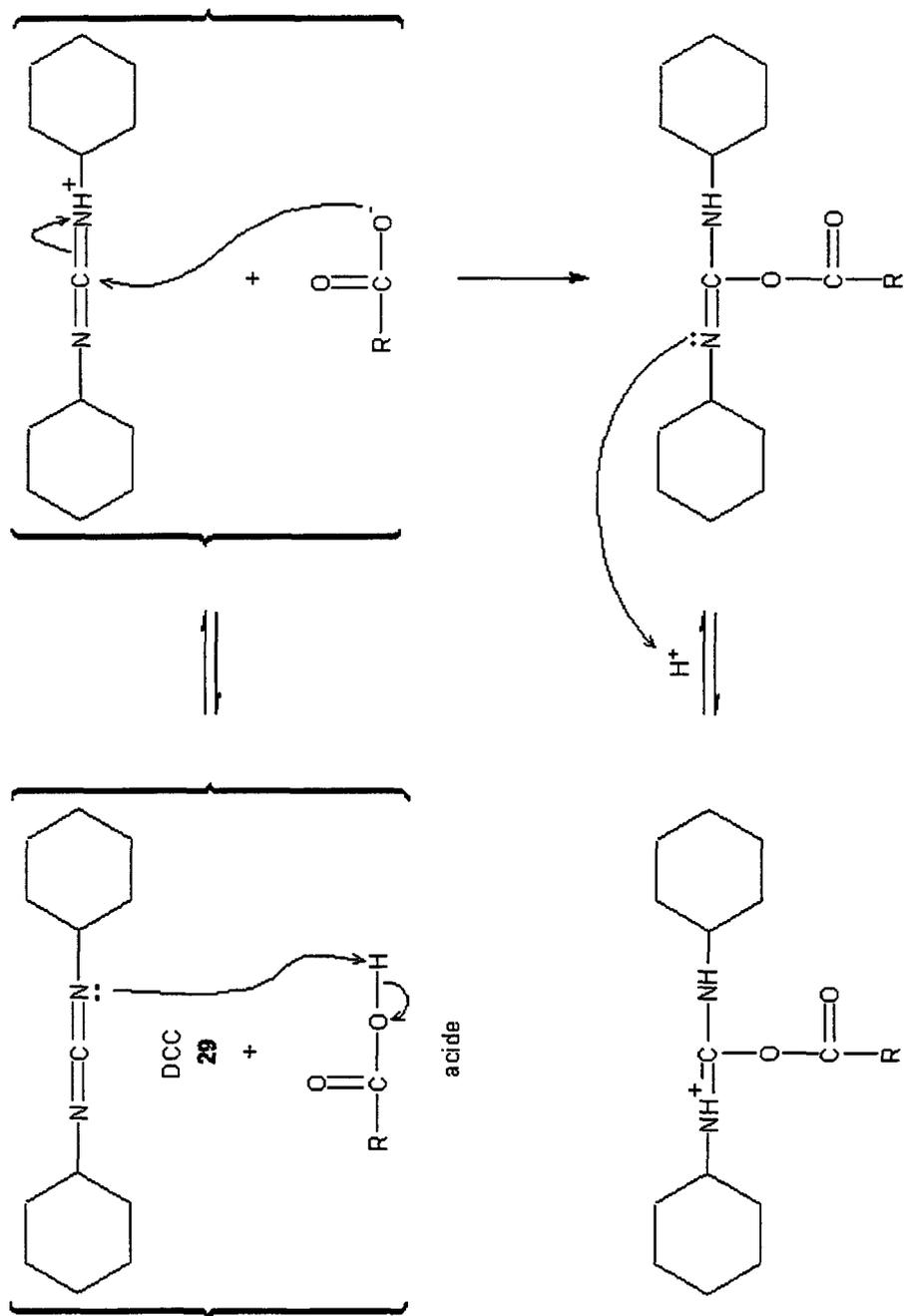


ESTÉRIFICATION AVEC SOCl₂ [Vollhardt, K. P. C. et Schore, N. E.; 1999]

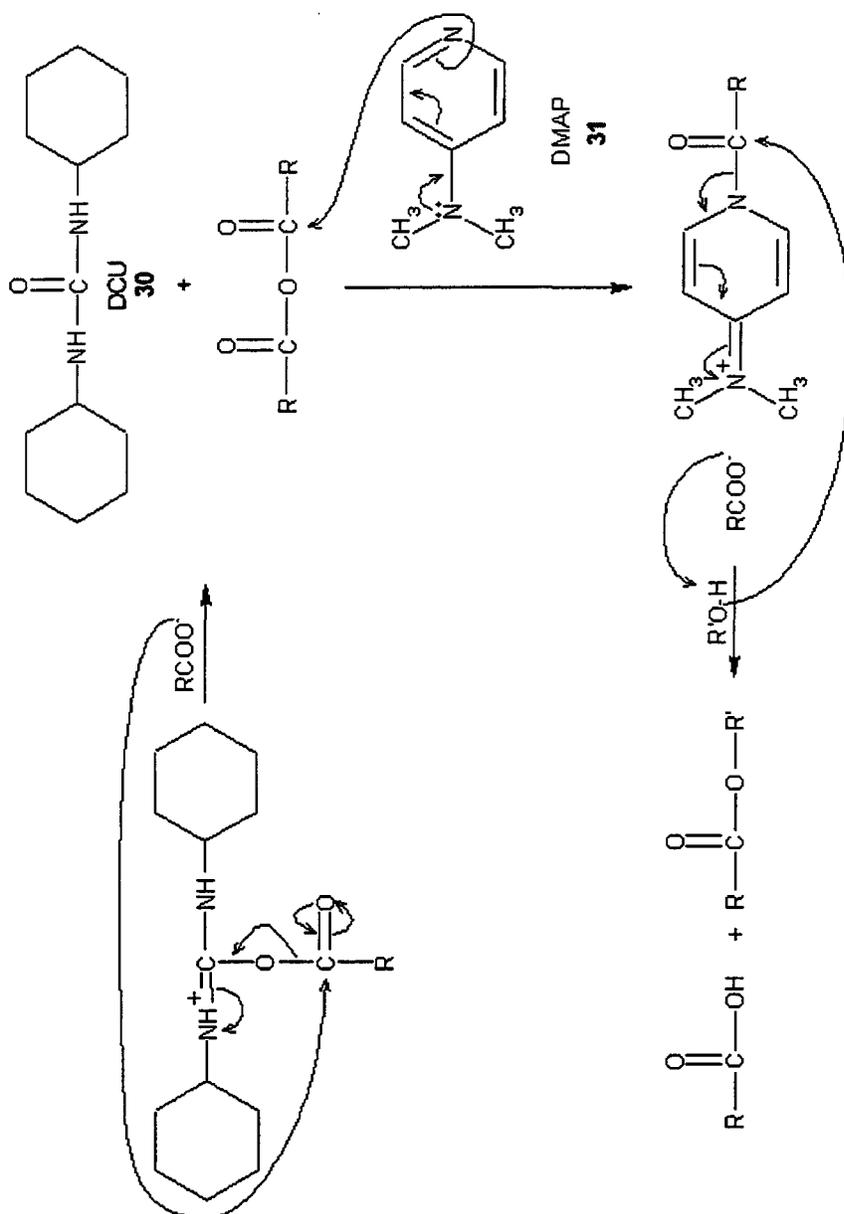


ESTÉRIFICATION AVEC DCC (29)/DMAP (31)

[Hassner, A. et Alexanian, V.; 1978]

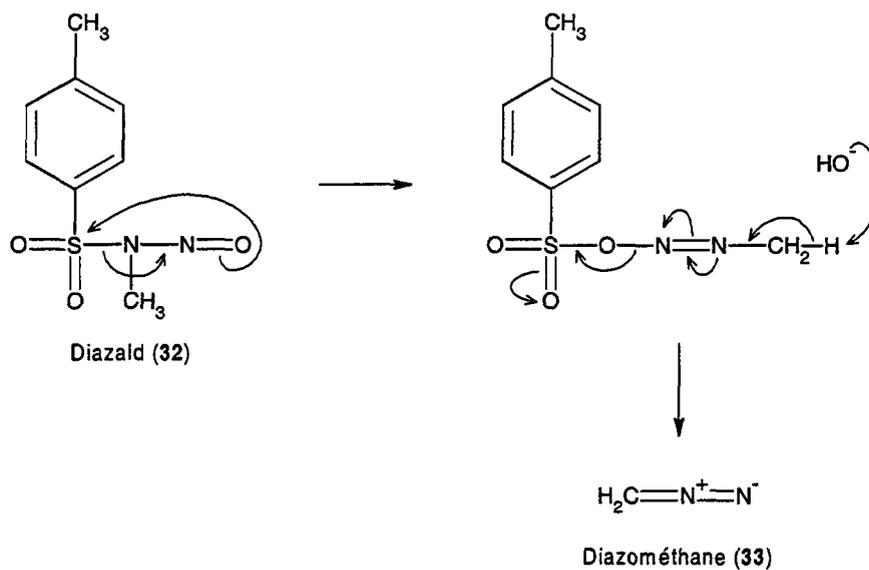


ESTÉRIFICATION AVEC DCC (29)/DMAP (31) (SUITE)

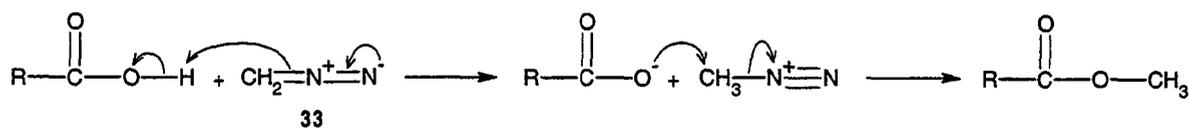


MÉTHYLATION AVEC DIAZOMÉTHANE (33) [March, J.; 1992]

Synthèse du diazométhane (33) à partir du diazald (32)

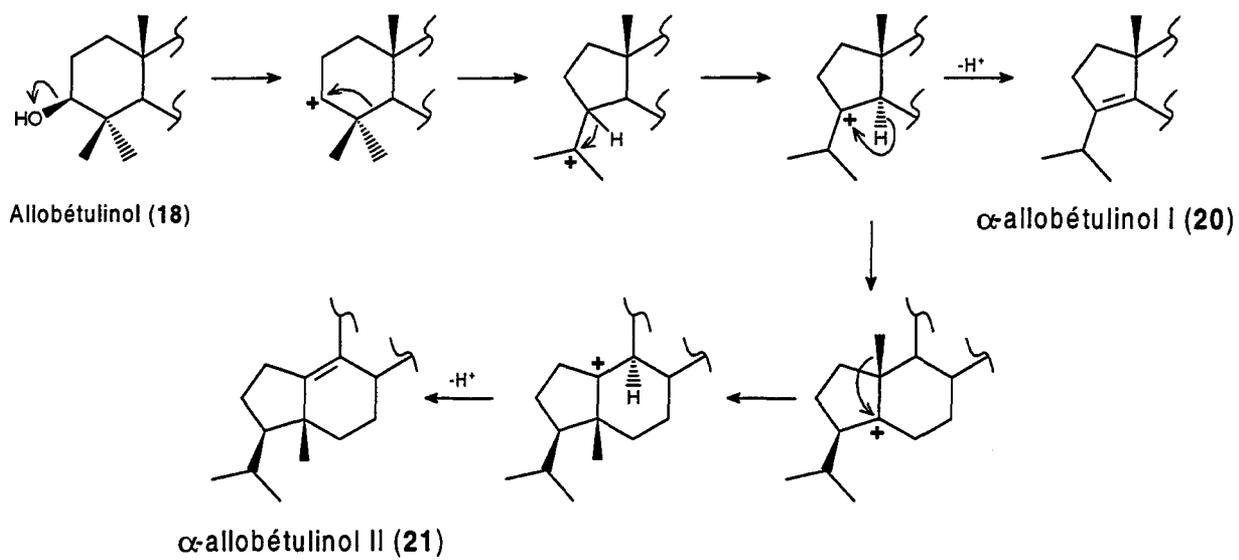


Méthylation



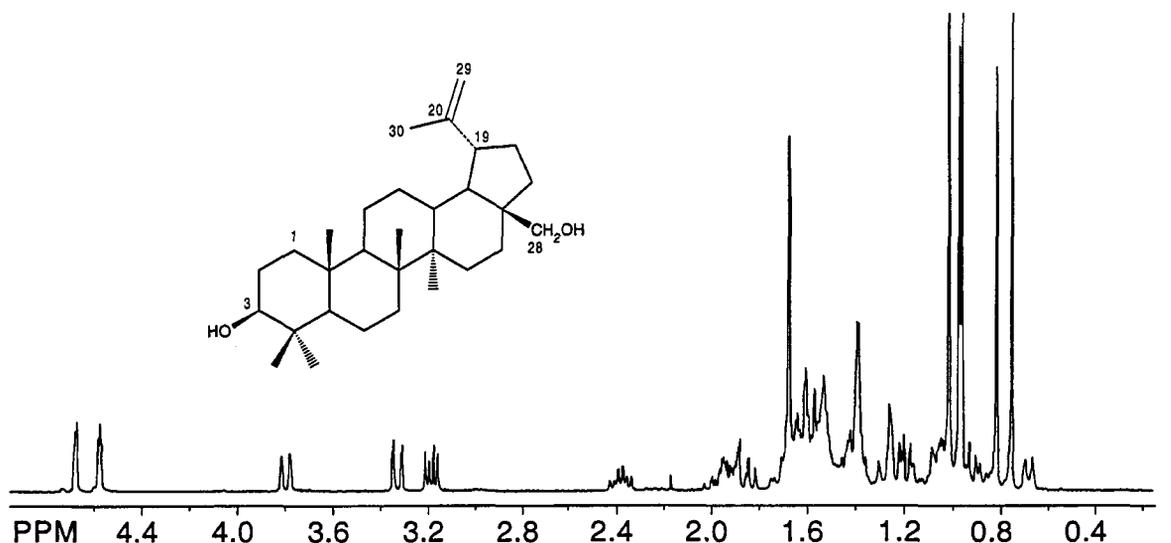
PROPOSITION DE MÉCANISME DE RÉARRANGEMENT DU CYCLE A DE

L'ALLOBÉTULINOL (18)

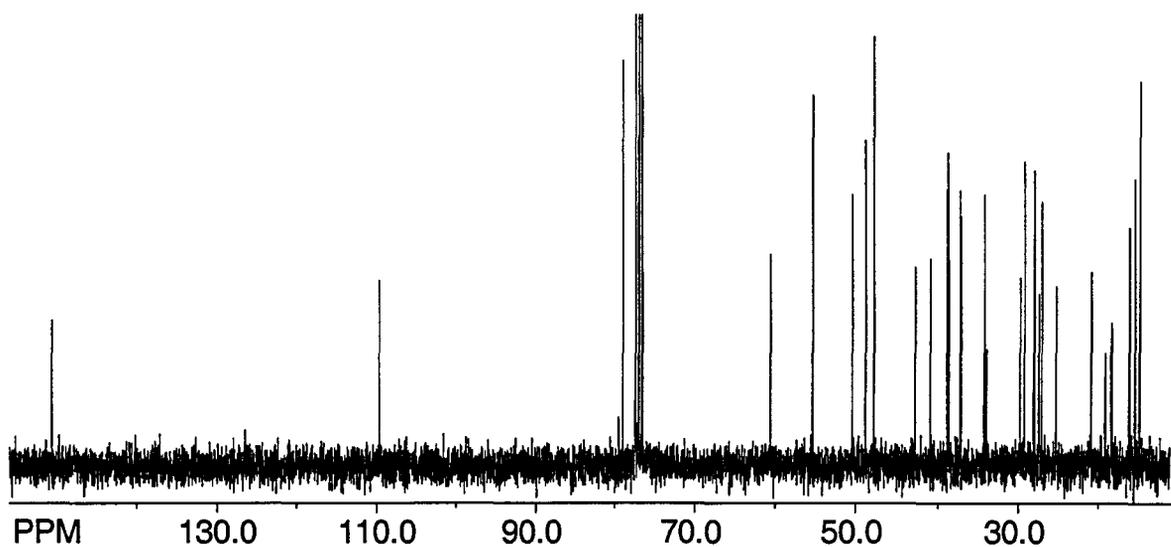


ANNEXE 4
SPECTRES RMN DES DÉRIVÉS

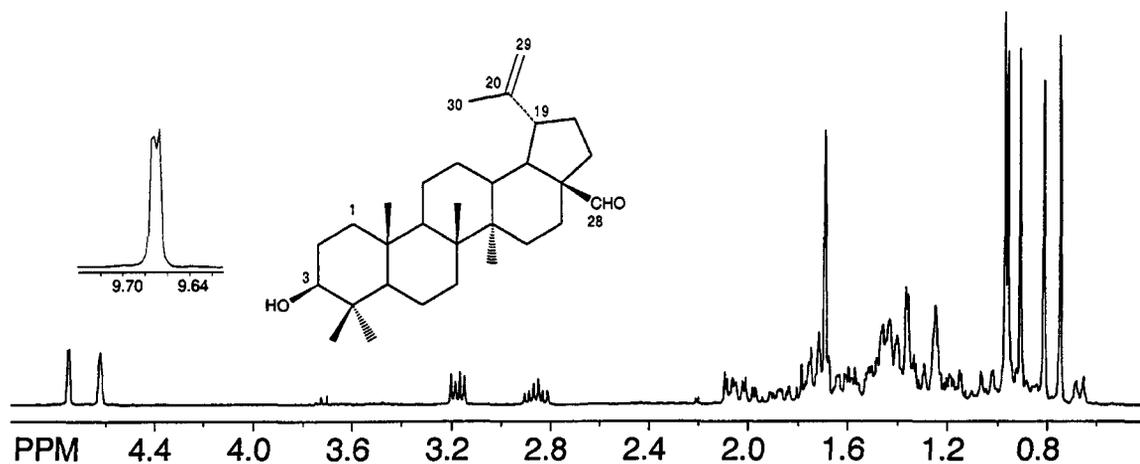
Bétulinol (2)



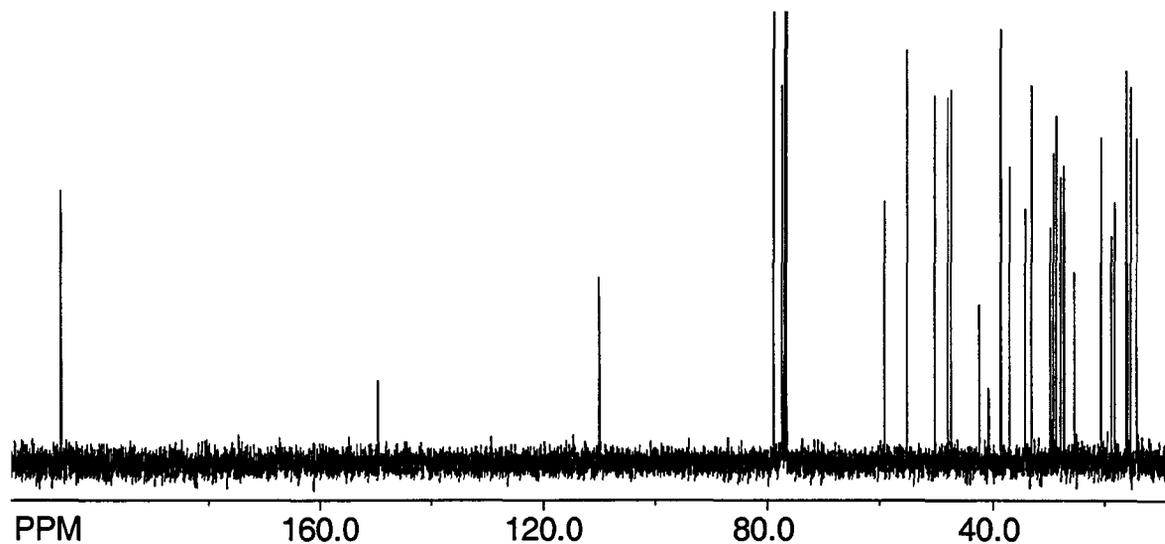
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ 4.68 (1 H, s, H-29), 4.58 (1 H, s, H-29), 3.82 (1 H, d, $J = 10.9$ Hz, H-28), 3.33 (1 H, d, $J = 10.9$ Hz, H-28), 3.19 (1 H, dd, $J = 10.8$ et 5.2 Hz, H-3), 2.39 (1 H, td, $J = 10.4$ et 5.8 Hz, H-19), 1.04-2.04 (26 H, c, CH et CH_2 du squelette), 1.68 (3 H, s, CH_3 -30), 0.76, 0.82, 0.97, 0.98, 1.02 (tous 3 H, s, $5 \times \text{CH}_3$) [Tinto, W. F. *et al.*; 1992].



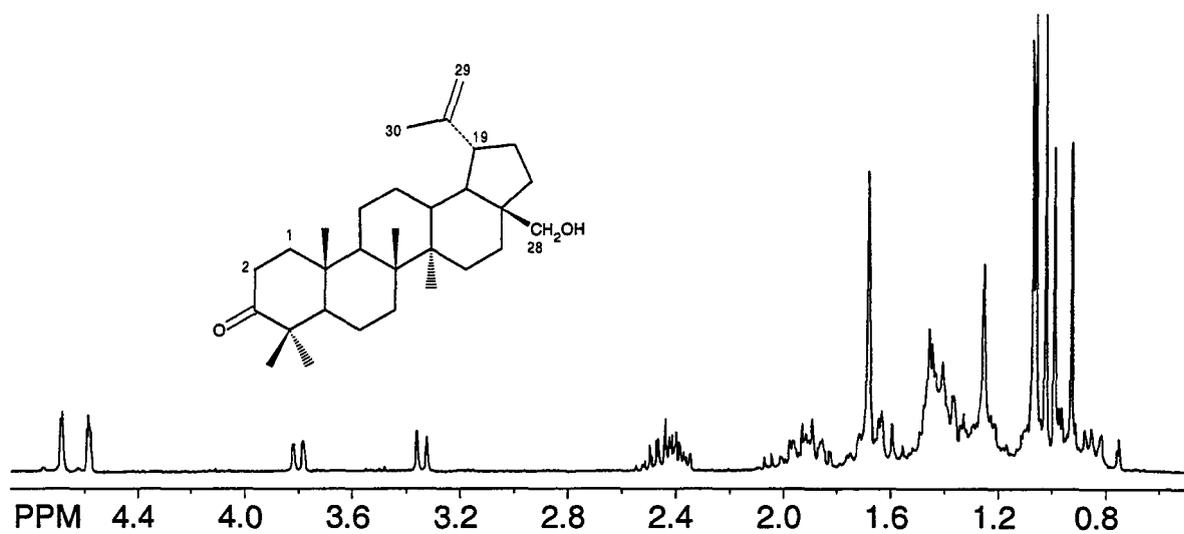
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ 150.5 (20), 109.7 (29), 79.0 (3), 60.6 (28), 55.3 (5), 50.4 (9), 48.8 (19), 47.8 (18), 47.8 (17), 42.7 (14), 40.9 (8), 38.9 (4), 38.7 (1), 37.3 (10), 37.2 (13), 34.3 (7), 34.0 (22), 29.8 (21), 29.2 (16), 28.0 (23), 27.4 (2), 27.1 (15), 25.2 (12), 20.8 (11), 19.1 (30), 18.3 (6), 16.1 (25), 16.0 (26), 15.3 (24), 14.8 (27) [Sholichin, M. *et al.*; 1980].

Bétulinal (14)

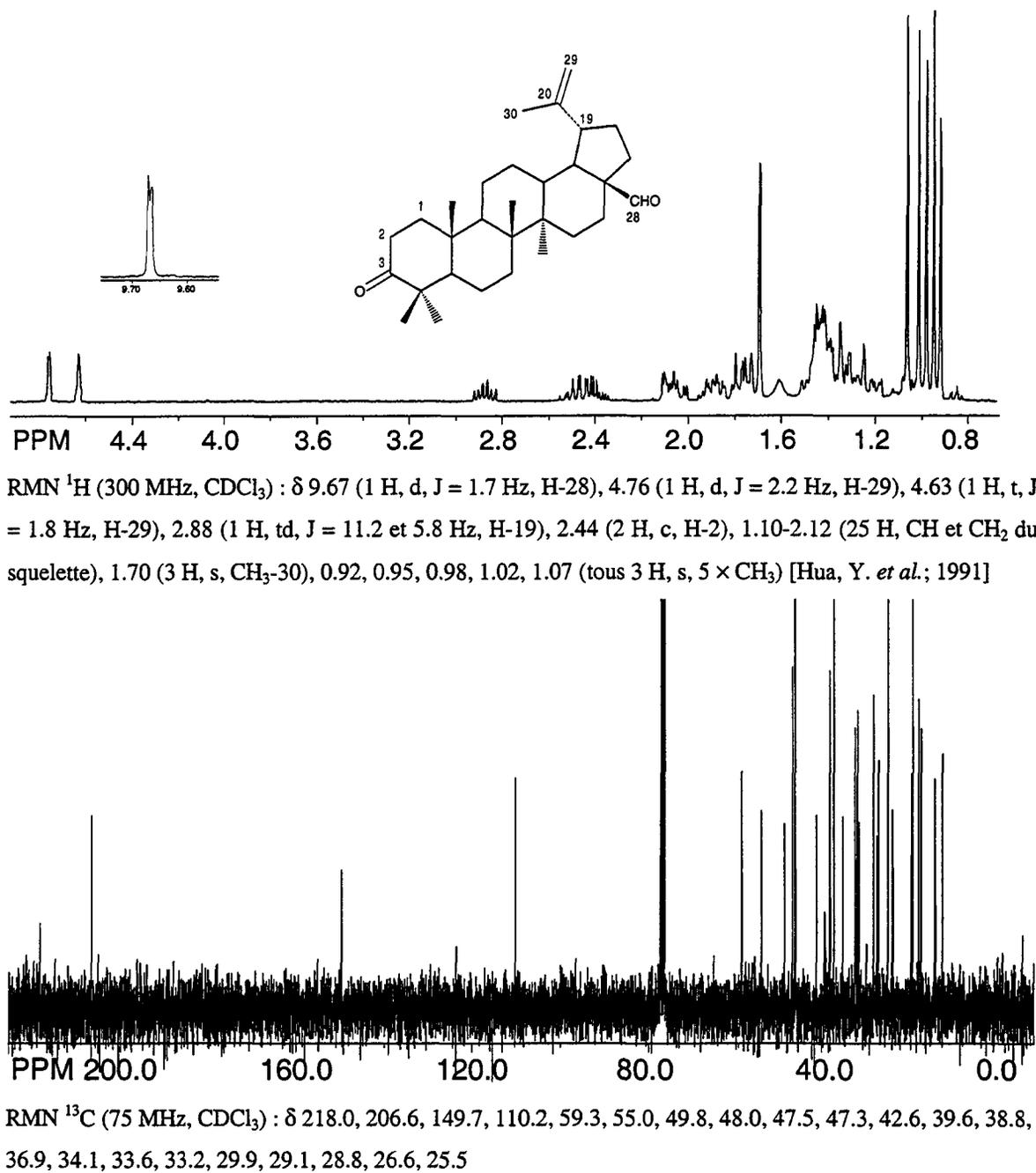
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ 9.67 (1 H, d, $J = 1.5$ Hz, H-28), 4.75 (1 H, d, 1.8 Hz, H-29), 4.62 (1 H, s, H-29), 3.18 (1 H, dd, $J = 10.7$ et 5.2 Hz, H-3), 2.86 (1 H, td, $J = 11.1$ et 5.8 Hz, H-19), 1.0-2.11 (25 H, c, CH et CH_2 du squelette), 1.69 (3 H, s, CH_3 -30), 0.73, 0.81, 0.91, 0.96, 0.97 (tous 3 H, s, $5 \times \text{CH}_3$).

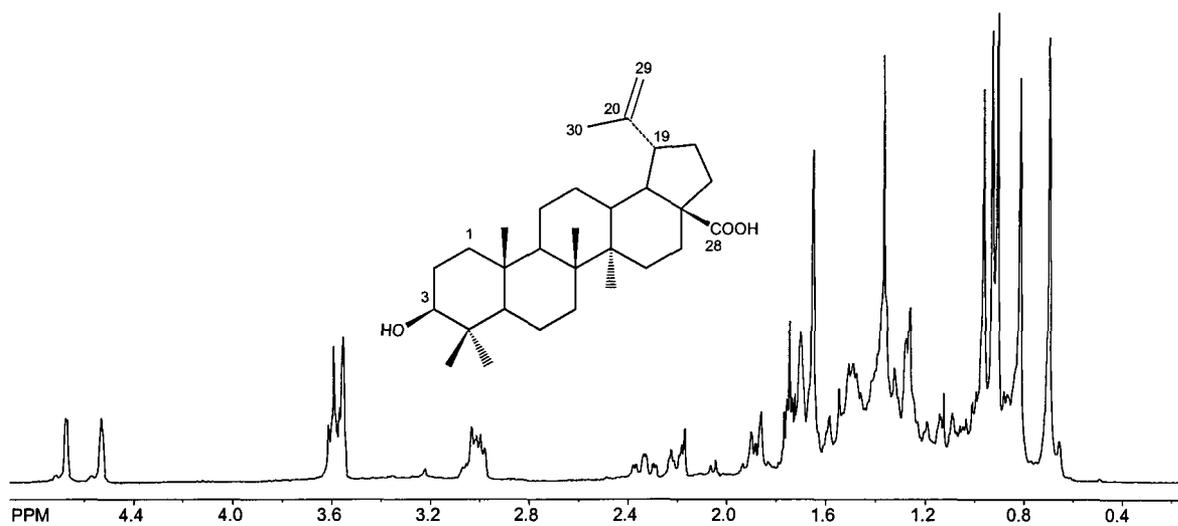


RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ 206.7 (28), 149.7 (20), 110.2 (29), 79.0 (3), 59.3 (17), 55.3 (5), 50.5 (9), 48.1 (18), 47.5 (19), 42.6 (14), 40.9 (8), 38.9 (4), 38.8 (1), 38.7 (13), 37.2 (10), 34.3 (7), 33.2 (22), 29.9 (21), 29.3 (15), 28.8 (16), 28.0 (23), 27.4 (2), 25.6 (12), 20.8 (11), 19.0 (30), 18.3 (6), 16.1 (26), 15.9 (25), 15.3 (24), 14.3 (27) [Monaco, P. et Previtera, L.; 1984].

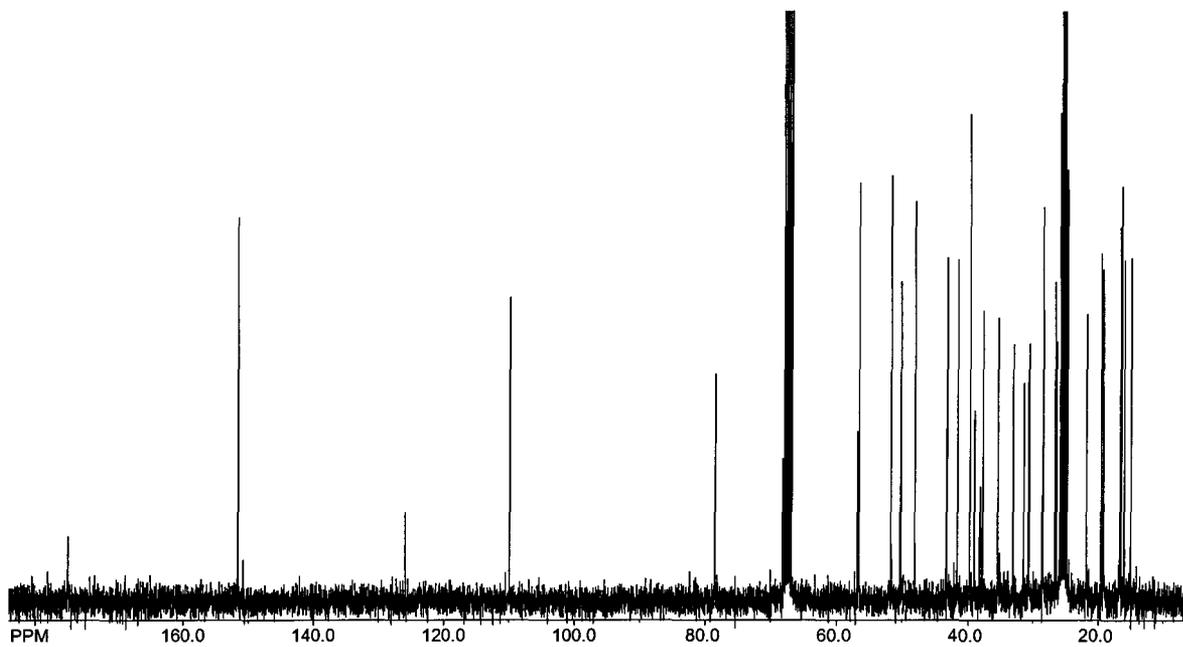
Bétulone (15)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) : δ 4.69 (1 H, s, H-29), 4.59 (1 H, s, H-29), 3.80 (1 H, d, J = 10.9 Hz, H-28), 3.34 (1 H, d, J = 10.9 Hz, H-28), 2.44 (3 H, c, H-2 et H-19), 1.10-2.08 (23 H, c, CH et CH₂ du squelette), 1.68 (3 H, s, CH₃-30), 0.93, 0.99, 1.02, 1.06, 1.07 (tous 3 H, s, 5 × CH₃) [Tinto, W. F. *et al.*; 1992].

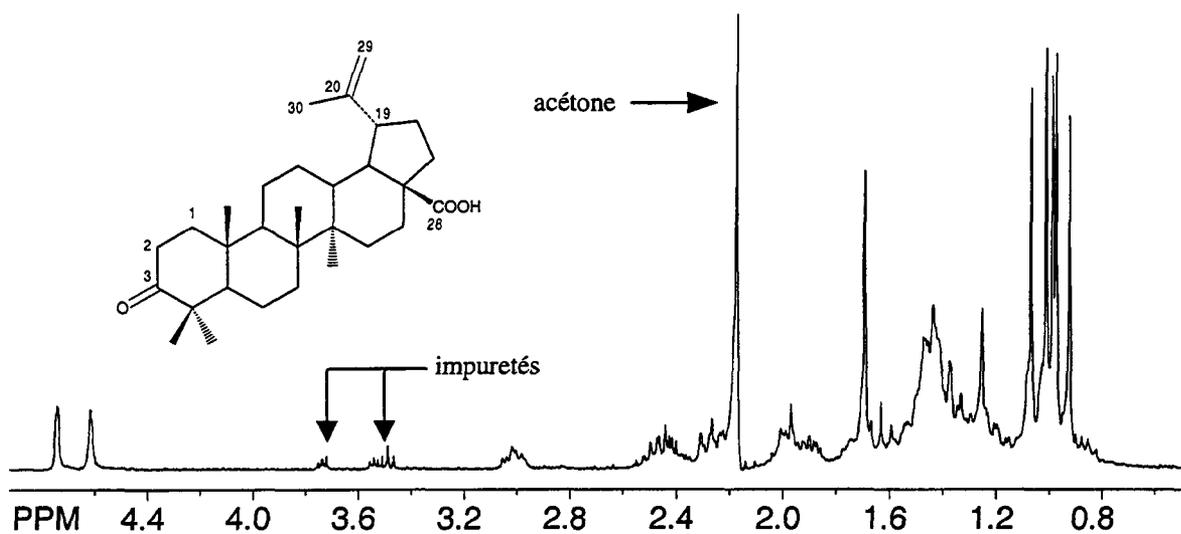
Bétulonal (16)

Acide bétulinique (3)

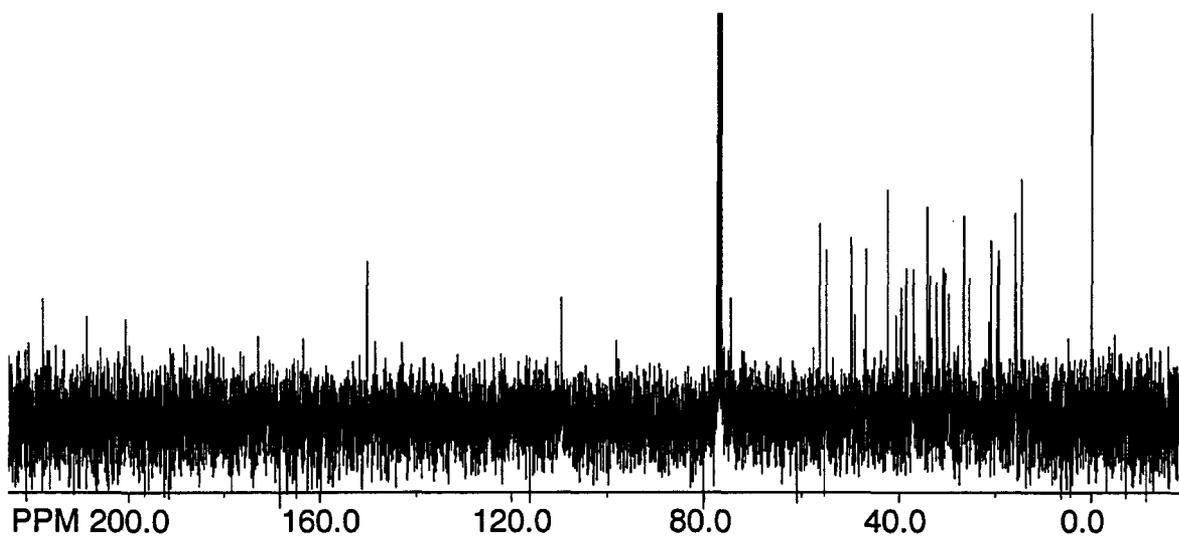
RMN ^1H (300 MHz, THF- d_8) : δ 4.68 (1 H, s, H-29), 4.53 (1 H, s, H-29), 3.02 (1 H, c, H-3), 2.33 (1 H, m, H-19), 1.02-2.26 (26 H, c, CH et CH_2 du squelette), 1.66 (3 H, s, CH_3 -30), 0.70, 0.82, 0.91, 0.93, 0.97 (tous 3 H, s, $5 \times \text{CH}_3$)



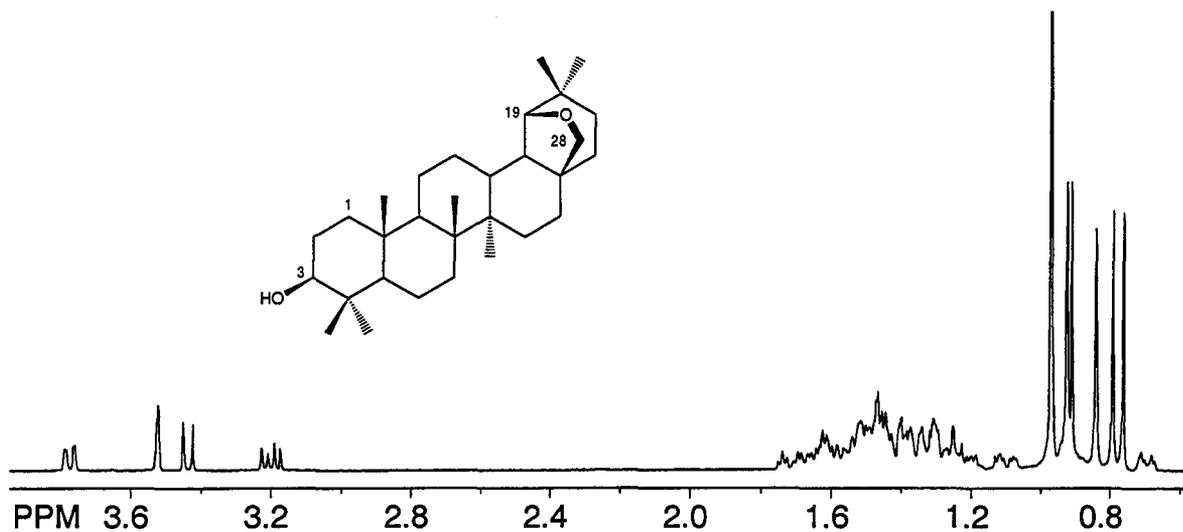
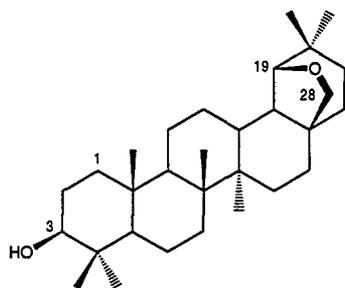
RMN ^{13}C (75 MHz, THF- d_8) : δ 177.6, 151.6, 109.9, 78.5, 56.6, 51.7, 50.2, 48.0, 43.3, 41.7, 39.8, 39.7, 39.1, 37.7, 35.4, 33.1, 31.5, 30.7, 30.6, 28.5, 28.5, 26.6, 26.4, 21.8, 19.6, 19.3, 16.7, 16.5, 16.1, 15.0

Acide bétulonique (9)

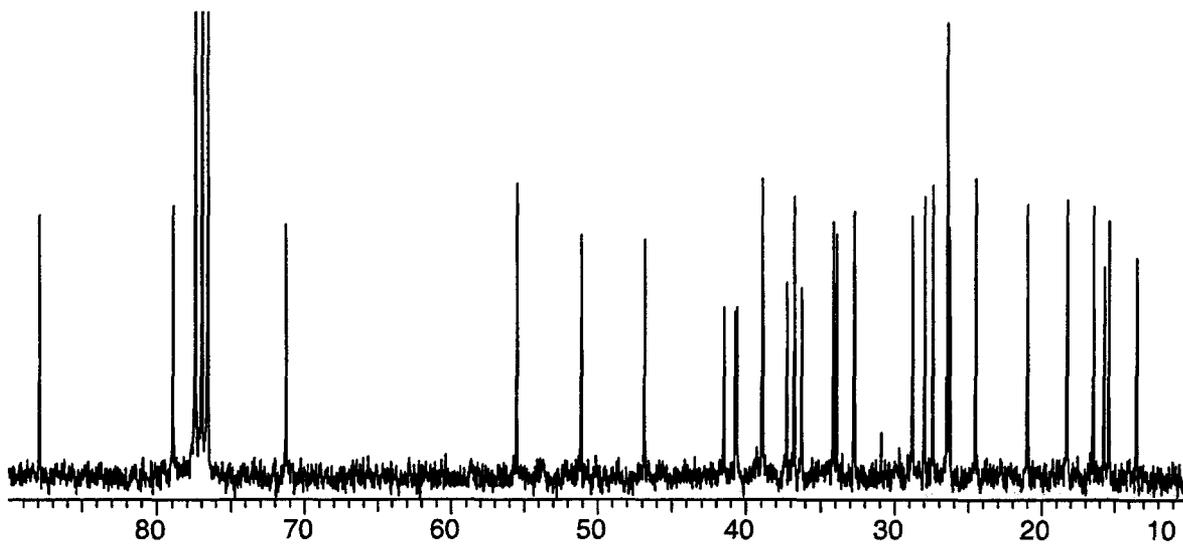
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ 4.74 (1 H, s, H-29), 4.62 (1 H, s, H-29), 3.00 (1 H, td, $J = 11.3$ et 4.5 Hz, H-19), 2.44 (2 H, c, H-2), 1.13-2.34 (23 H, c, CH et CH_2 du squelette), 1.69 (3 H, s, CH_3 -30), 0.93, 0.98, 0.99, 1.02, 1.07 (tous 3 H, s, $5 \times \text{CH}_3$) [Cole, B. J. W. *et al.*; 1991].



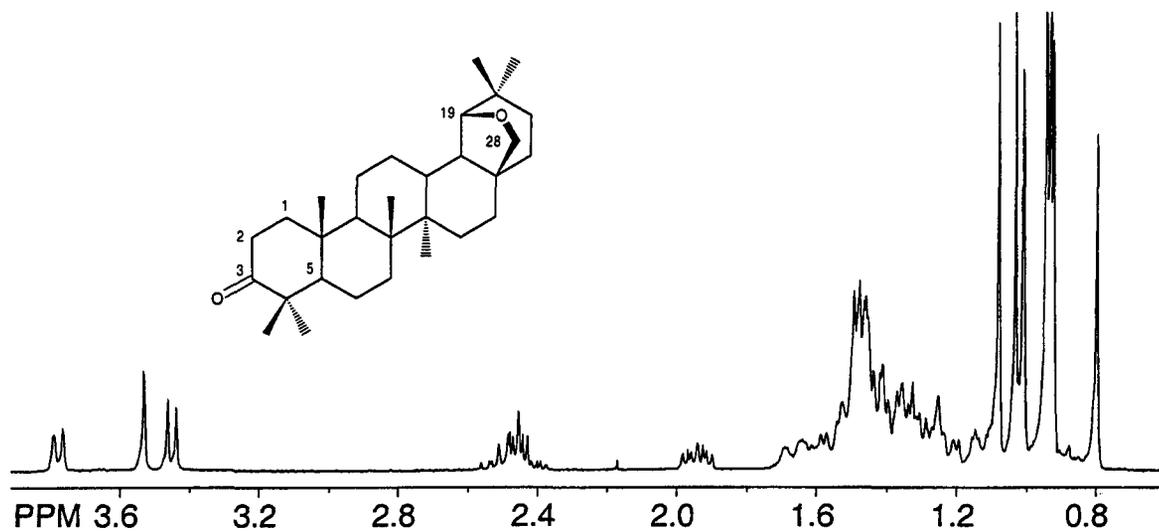
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ 218.0 (3), 181.7 (28), 150.2 (20), 109.6 (C-29), 56.3 (17), 54.9 (5), 49.8 (9), 49.1 (18), 47.2 (4), 46.8 (19), 42.4 (14), 40.6 (8), 39.5 (1), 38.4 (13), 36.8 (10), 36.8 (22), 34.0 (2), 33.5 (7), 32.0 (16), 30.5 (15), 29.6 (21), 26.5 (23), 25.4 (12), 21.3 (11), 20.9 (24), 19.5 (6), 19.2 (30), 15.8 (25), 15.7 (26), 14.5 (27) [Patra, A. *et al.*; 1988]

Allobétulinol (18)

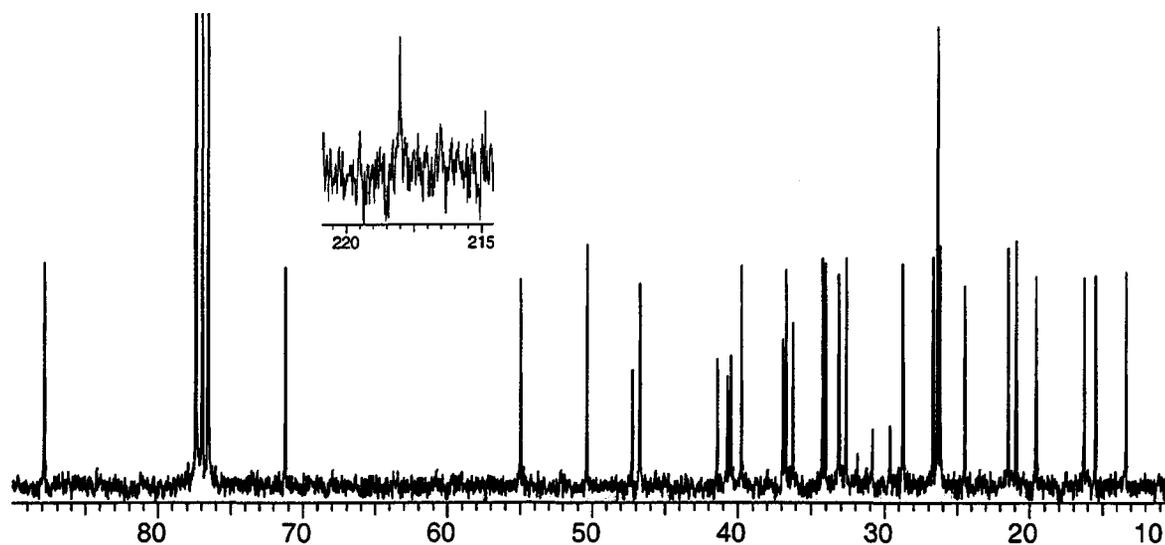
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ 3.77 (1 H, d, $J = 7.9$ Hz, H-28), 3.53 (1 H, s, H-19), 3.44 (1 H, d, 7.9 Hz, H-28), 3.20 (1 H, dd, $J = 10.9$ et 5.3 Hz), 1.04-1.76 (25 H, c, CH et CH_2 du squelette), 0.97 (6 H, s, $2 \times \text{CH}_3$), 0.76, 0.79, 0.84, 0.91, 0.93 (tous 3 H, s, $5 \times \text{CH}_3$) [Klinot, J. *et al.*; 1990]



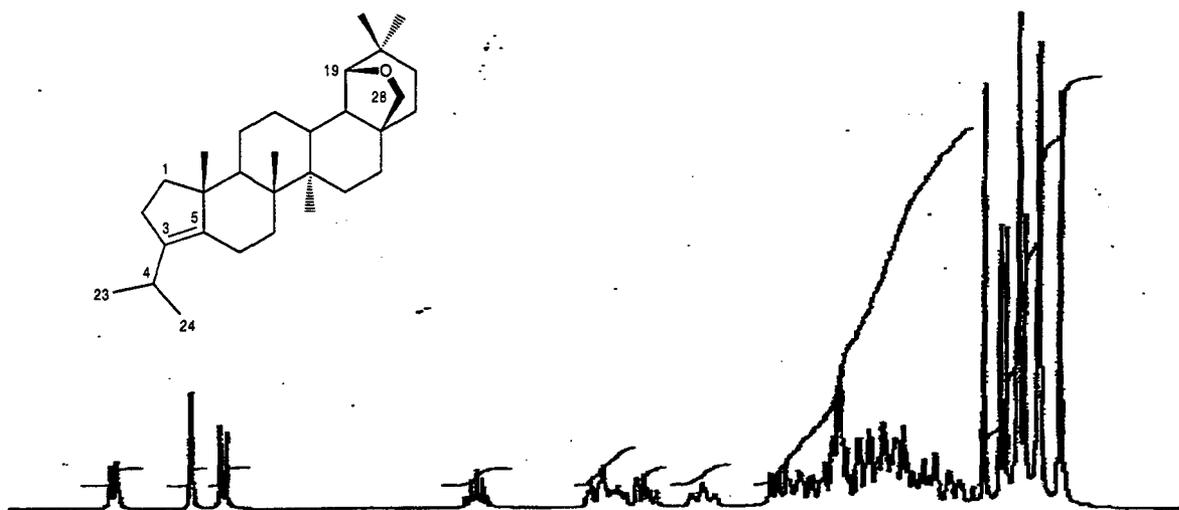
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ 87.9, 79.0, 71.3, 55.5, 51.1, 46.9, 41.5, 40.7, 40.6, 38.9, 37.3, 36.8, 36.3, 34.2, 33.9, 32.7, 28.8, 28.0, 27.4, 26.5, 26.3, 24.6, 21.0, 18.3, 16.5, 15.7, 15.4, 13.5

Allobétulone (23)

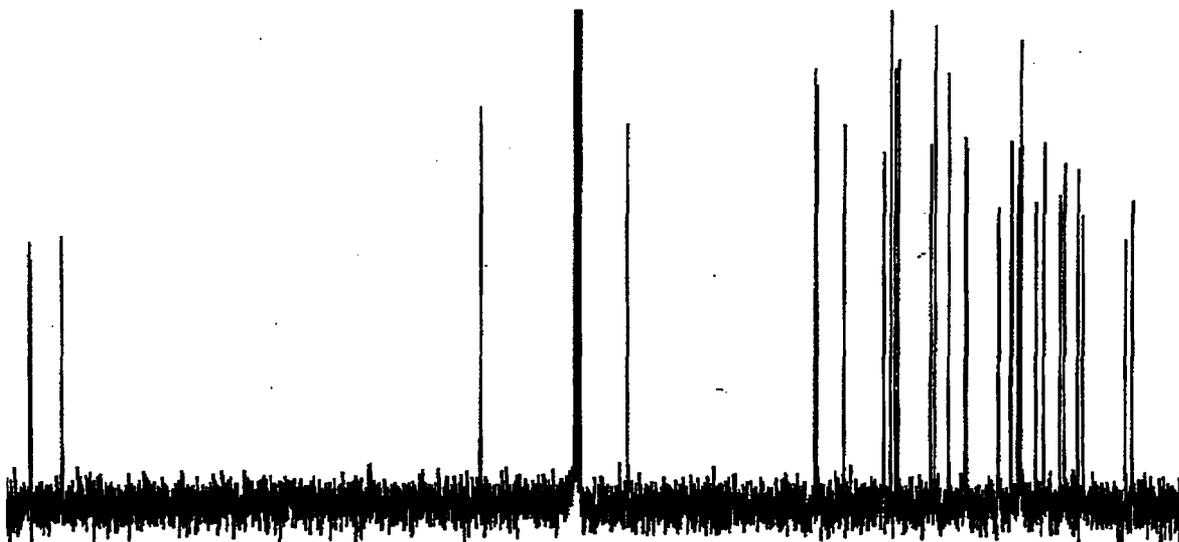
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ 3.78 (1 H, d, $J = 7.3$ Hz, H-28), 3.53 (1 H, s, H-19), 3.45 (1 H, d, $J = 7.3$ Hz, H-28), 2.46 (2 H, c, H-2), 1.94 (1 H, ddd, $J = 13.2, 7.3$ et 4.5 Hz, H-5), 1.12-1.73 (21 H, c, CH et CH_2 du squelette), 0.80, 0.92, 0.93, 0.94, 1.01, 1.03, 1.08 (tous 3 H, s, $7 \times \text{CH}_3$) [Klinot, J. *et al.*; 1990]



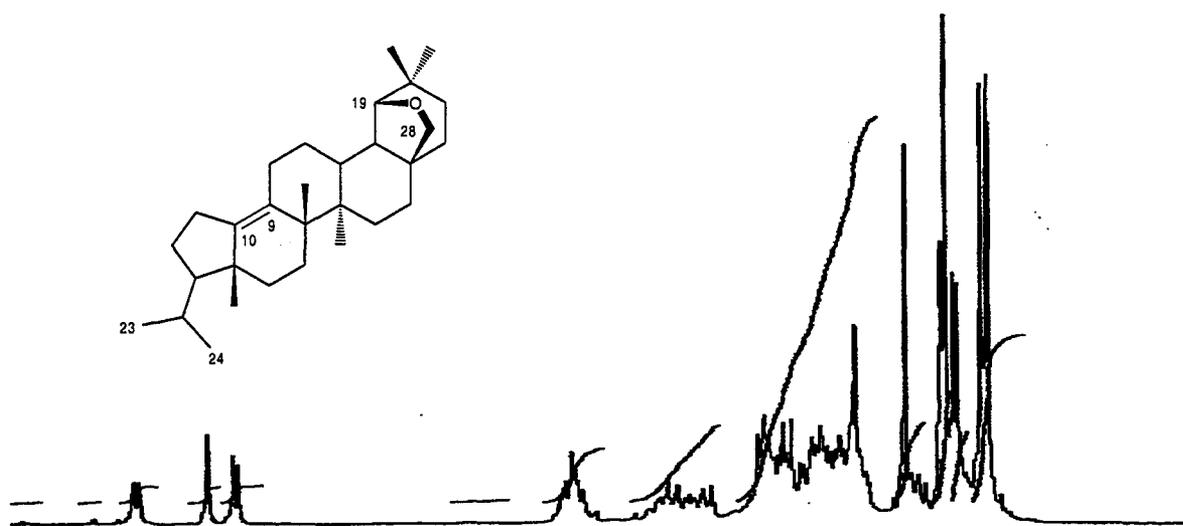
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ 218.0, 87.9, 71.3, 55.0, 50.4, 47.3, 46.8, 41.5, 40.8, 40.6, 39.8, 37.0, 36.7, 36.3, 34.3, 34.1, 33.2, 32.7, 28.8, 26.7, 26.4 ($\times 2$), 26.2, 24.6, 21.5, 21.0, 19.6, 16.3, 15.5, 13.4

α -allobétulin I (20)

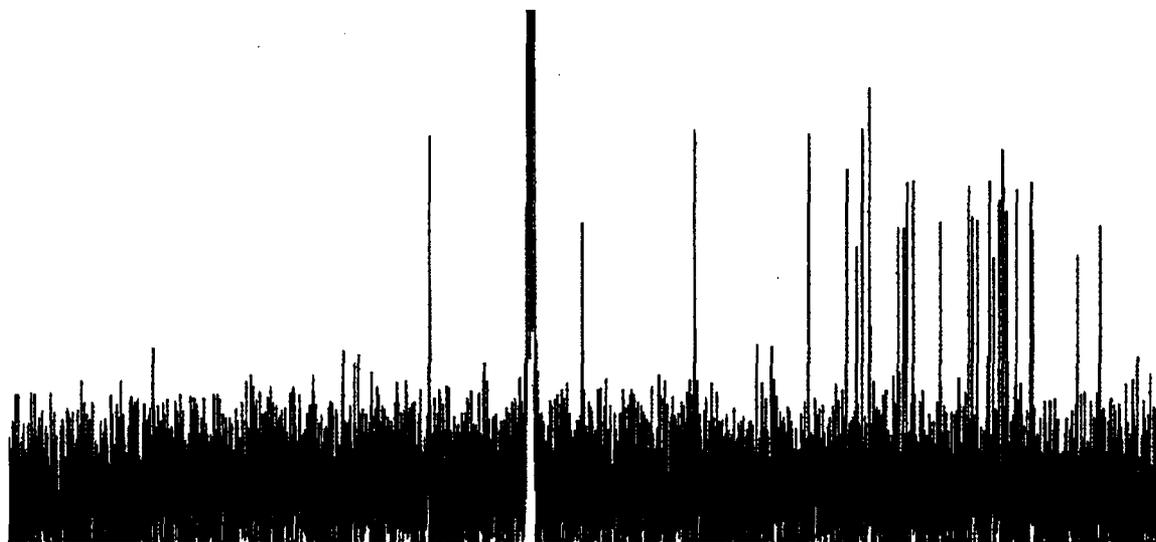
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ 3.81 (1 H, d, $J = 8$ Hz, H-28), 3.57 (1 H, s, H-19), 3.47 (1 H, d, $J = 8$ Hz, H-28), 2.66 (1 H, m, H-4), 1.10 – 2.31 (23 H, c, CH et CH_2 , du squelette), 1.00, 0.94 (tous 3 H, d, $J = 6.9$ Hz, CH_3 -23 et CH_3 -24), 1.06, 0.96, 0.89, 0.88, 0.82 (tous 3 H, s, $5 \times \text{CH}_3$) [Li, T. S. *et al.*; 1998]



RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ 140.0 (5), 136.2 (3), 88.0 (19), 71.3 (28), 50.1 (9), 49.9 (10), 46.7 (18), 42.2 (1), 41.5 (20), 40.8 (14), 40.6 (8), 36.8 (16), 36.3 (17), 34.7 (13), 32.7 (21), 32.6 (7), 28.8 (30), 27.4 (2), 26.8 (15), 26.5 (11), 26.3 (4), 26.3 (22), 24.6 (29), 23.9 (12), 21.9 (24), 21.3 (23), 19.8 (6), 19.2 (25), 14.3 (26), 13.4 (27) [Li, T. S. *et al.*; 1998]

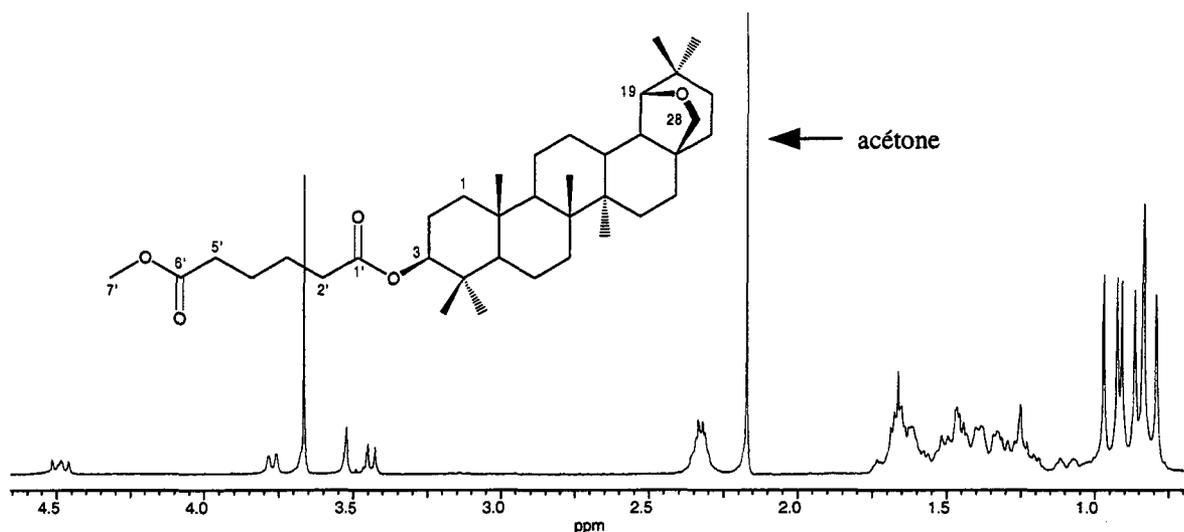
α -allobétulin II (21)

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ 3.82 (1 H, d, $J = 8$ Hz, H-28), 3.57 (1 H, s, H-19), 3.47 (1 H, d, $J = 8$ Hz, H-28), 1.10-2.31 (24 H, c, CH et CH_2 du squelette), 0.95, 0.91 (tous 3 H, d, $J = 6.6$ Hz, CH_3 -23 et CH_3 -24), 1.08, 0.95, 0.82, 0.80, 0.79 (tous 3 H, s, $5 \times \text{CH}_3$) [Li, T. S. *et al.*; 1998]

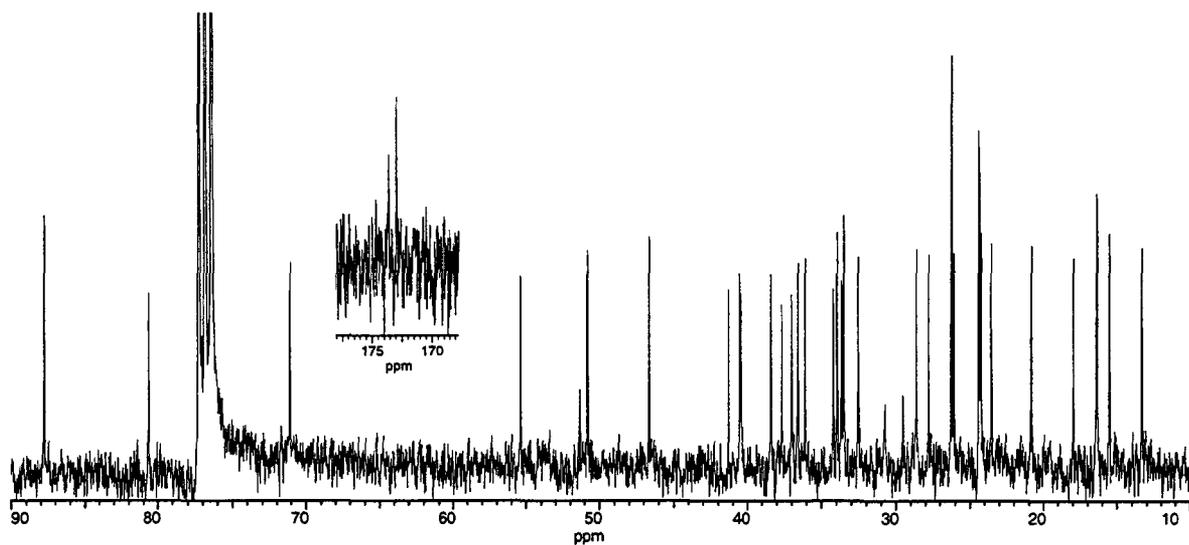


RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) : δ 141.9 (9), 131.3 (10), 88.0 (19), 71.3 (28), 59.2 (4), 46.8 (18), 42.8 (14), 41.7 (5), 41.1 (20), 40.3 (8), 37.3 (1), 36.7 (16), 36.3 (17), 35.7 (13), 32.7 (21), 29.8 (3), 29.3 (12), 28.8 (30), 27.6 (2), 27.1 (7), 26.5 (15), 26.5 (11), 26.1 (22), 26.0 (6), 25.7 (25), 24.6 (29), 23.1 (24), 22.9 (23), 18.0 (26), 15.5 (27) [Li, T. S. *et al.*; 1998]

3-[(6-methoxy-6-oxohexanoyl)oxy]-allobétulin (19)

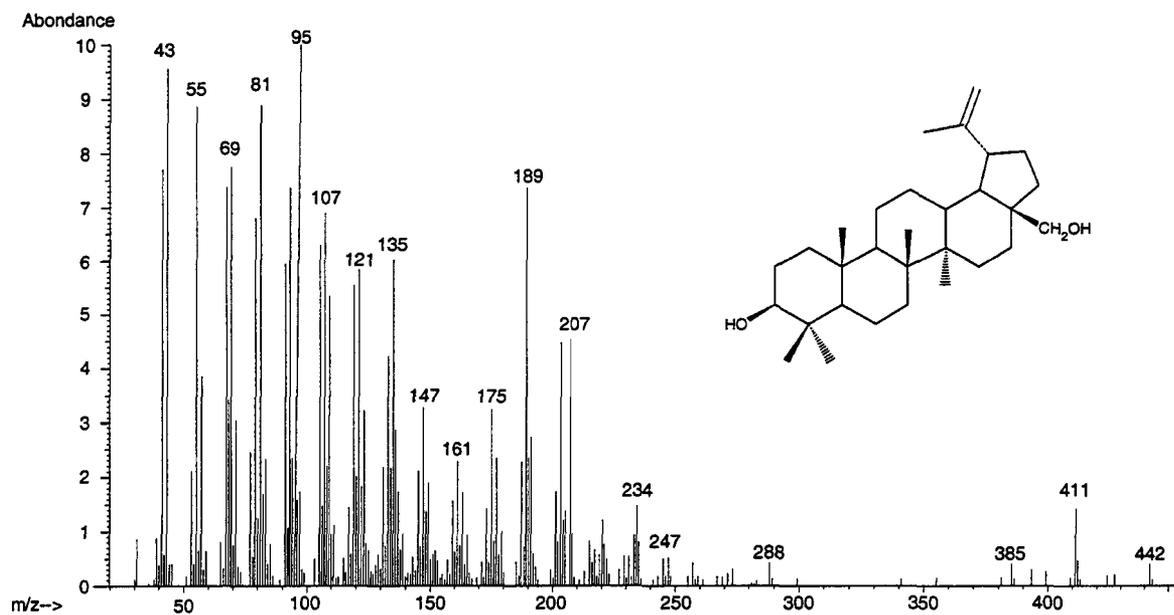
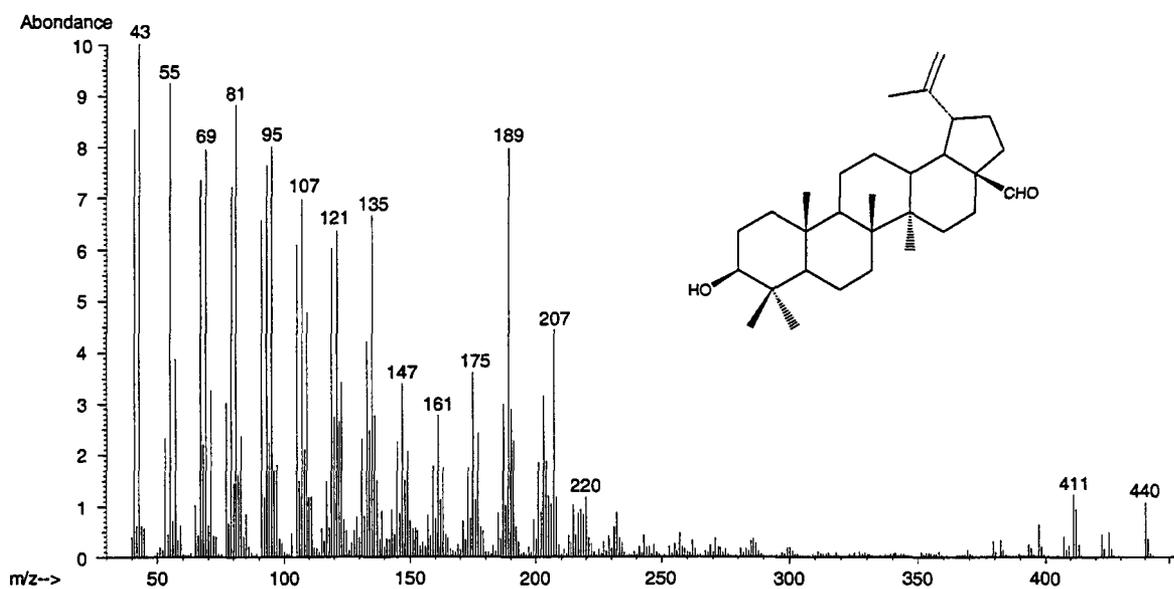


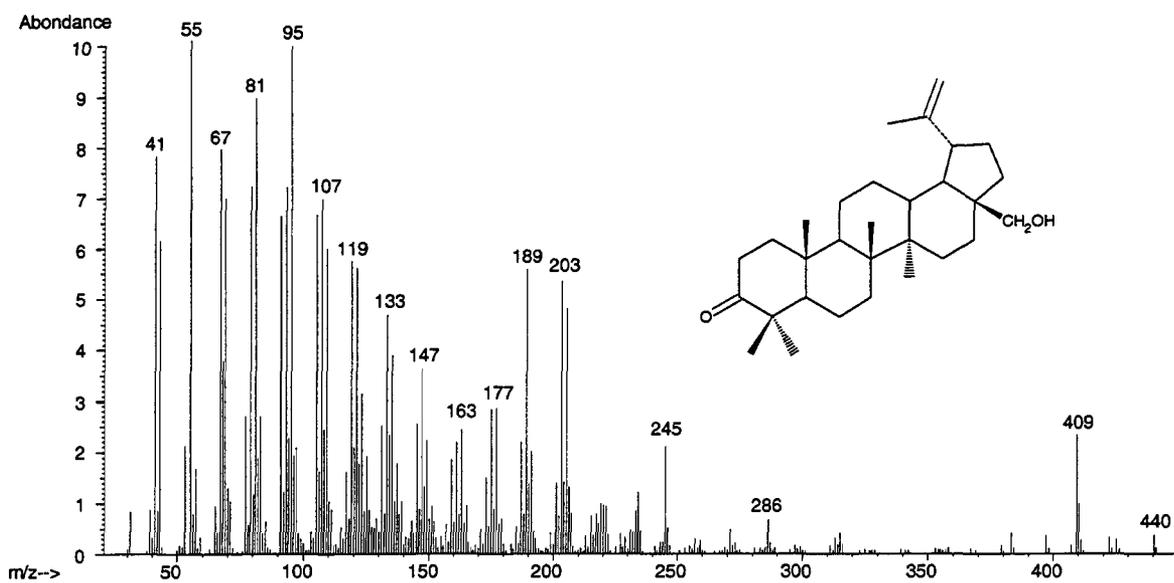
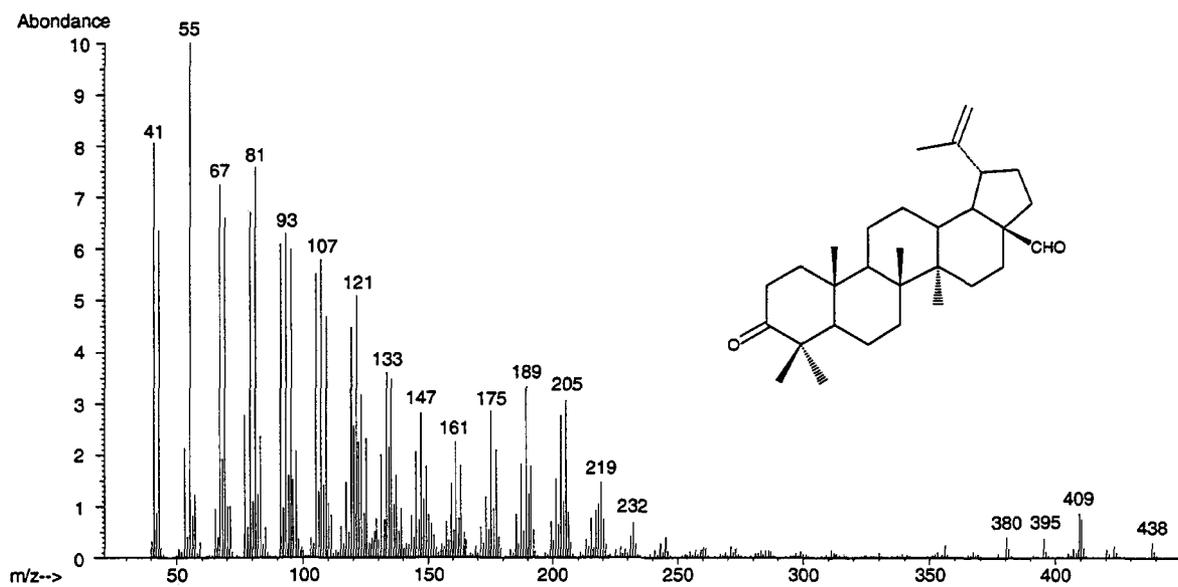
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) : δ 4.48 (1 H, c, H-3), 3.77 (1 H, d, $J = 7.4$ Hz, H-28), 3.67 (3 H, s, CH_3 -7'), 3.52 (1 H, s, H-19), 3.44 (1 H, d, $J = 7.4$ Hz, H-28), 2.33 (4 H, c, CH_2 -2' et CH_2 -5'), 1.00-1.75 (26 H, c, CH et CH_2 du squelette et CH_2 -3' et 4'), 0.84 (6 H, s, $2 \times \text{CH}_3$), 0.79, 0.87, 0.91, 0.92 et 0.97 (tous 3 H, s, $5 \times \text{CH}_3$)

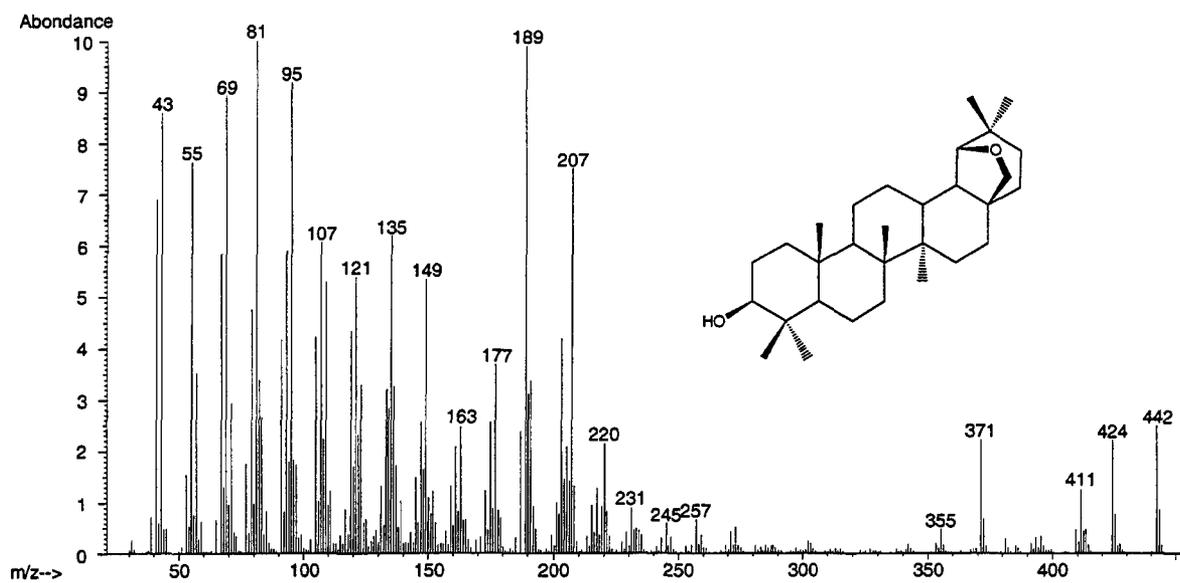
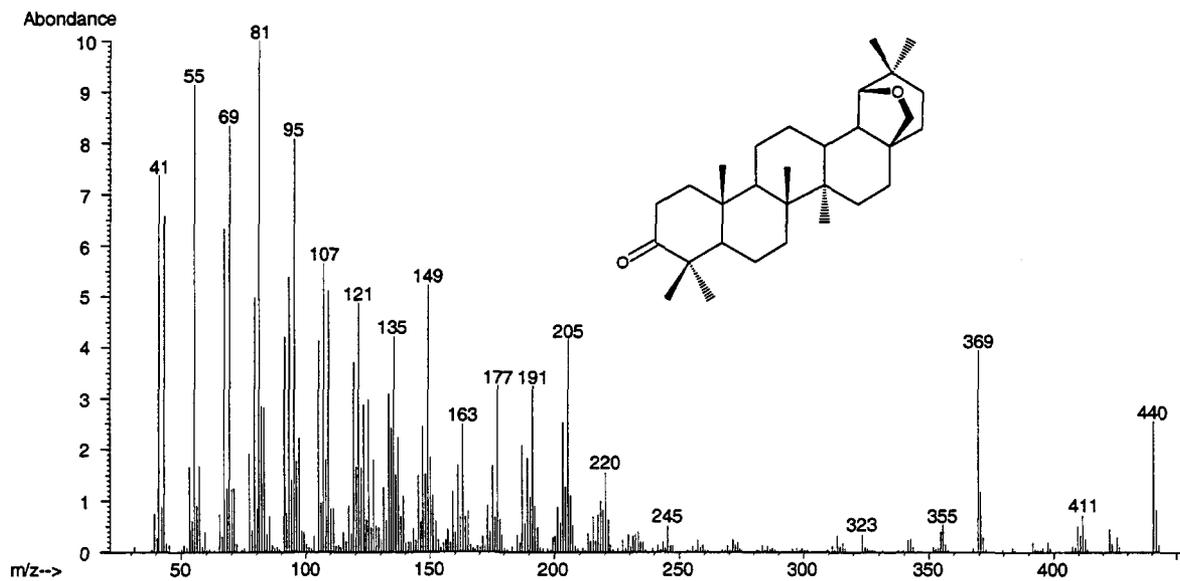


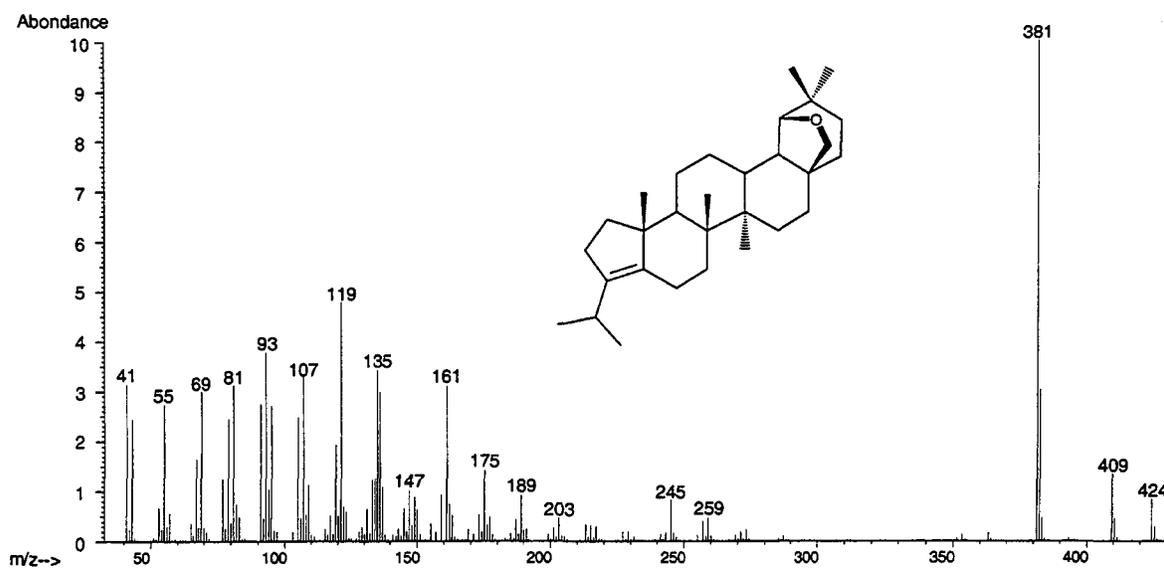
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) : δ 173.6, 173.0, 87.8, 80.7, 71.1, 55.4, 51.4, 50.9, 46.7, 41.3, 40.6, 40.5, 38.4, 37.7, 37.0, 36.6, 36.1, 34.2, 34.0, 33.7, 33.6, 32.6, 28.7, 27.8, 26.3, 26.3, 26.1, 24.4, 24.4, 24.3, 23.6, 20.9, 18.0, 16.4, 16.4, 15.6, 13.4

ANNEXE 5
SPECTRES DE MASSE DES DÉRIVÉS

Bétulinol (2)**Bétulinol (14)**

Bétulone (15)**Bétulonal (16)**

Allobétulinol (18)**Allobétulone (23)**

α -allobétulin I (20) **α -allobétulin II (21)**