

## 2.2. LES TRITERPÈNES DE TYPE LUPANE

### 2.2.1. Généralités

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

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

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

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

### 2.2.2. Activités Biologiques

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

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

### *2.2.2.1. Activités Cytotoxique et Antitumorale*

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

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

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

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

#### **2.2.2.2. Activité Anti-VIH**

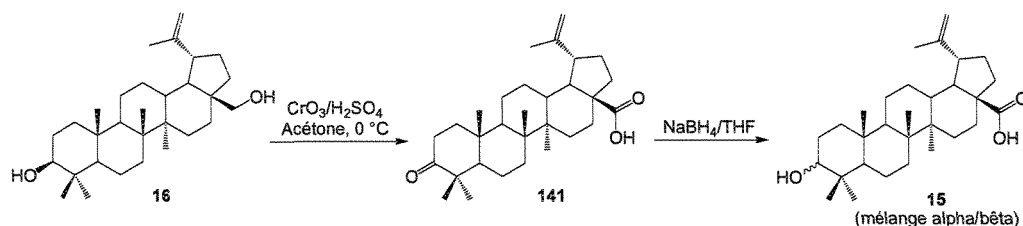
En 1994, un groupe de chercheurs a publié un article dans le *Journal of Natural Products* relatant l'isolation de composés triterpéniques dont l'acide bétulinique (15) à partir de l'extrait méthanolique des feuilles de *Syzygium claviflorum* [Fujioka *et al.*, 1994]. Lors de cette étude, l'activité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

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

### 2.2.3. Synthèse de l'Acide Bétulinique

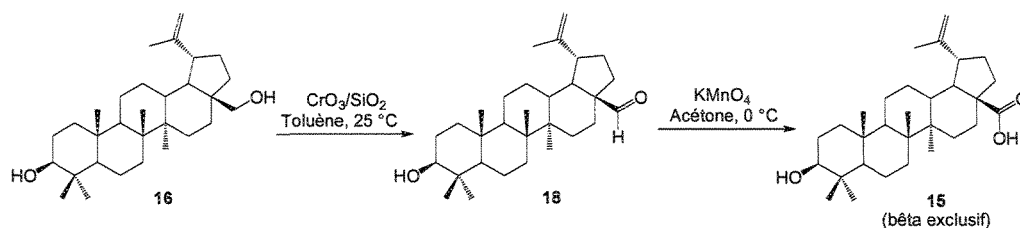
Peu après la découverte de ses propriétés anti-mélanomes [Pisha *et al.*, 1995], certains chercheurs ont mis au point des semi-synthèses de l'acide bétulinique (**15**) en tirant profit de l'abondance du bétulinol (**16**) dans les écorces de bouleau [Krasutsky, 2006]. Tout d'abord, le groupe de Pezzuto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

(141). Le rendement global est de l'ordre de 71% (deux étapes) en épimère  $\beta$  après la recristallisation.



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

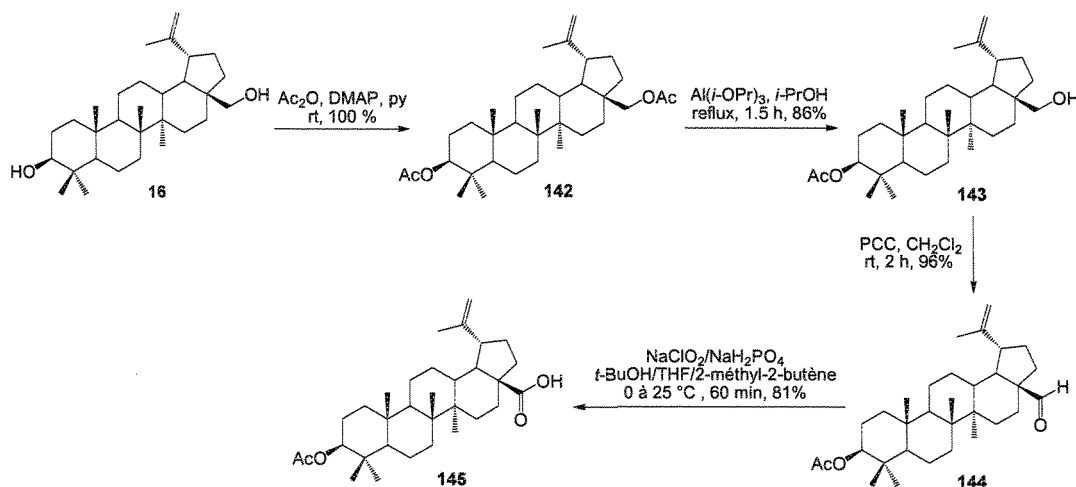
Une voie de synthèse en deux étapes consistant à l'oxydation régiosélective de la fonction alcool primaire (C-28) du bétulinol (16) a été développée par notre groupe de recherche. Celle-ci consiste en 1) l'oxydation de 16 en aldéhyde bétulinique (18) par l'action du  $\text{CrO}_3$  adsorbé sur gel de silice et 2) l'oxydation de l'aldéhyde en acide par ajout de  $\text{KMnO}_4$  (Figure 25) [Pichette *et al.*, 2004]. Cette méthode possède l'avantage que l'acide bétulinique (15) est obtenu uniquement sous la forme de l'épimère  $\beta$  sans recristallisation nécessaire.



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

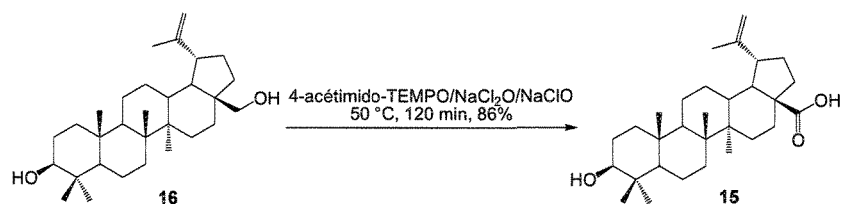
Une autre approche de synthèse consistant en une modification de la procédure utilisée par Krasutsky et ses collaborateurs [2001] a également été publiée par notre groupe de recherche (Figure 26) [Thibeault *et al.*, 2007]. Brièvement, les fonctions alcools du bétulinol (16) ont été acétylées (142, 100%) et la fonction acétyle en C-28 a été déprotégée sélectivement (143, 86%). Par la suite, l'oxydation par PCC a mené à la formation de l'aldéhyde 144 (96%) qui a été subséquemment oxydé en l'acide 145 (81%) par l'action combinée de  $\text{NaClO}_2$  et  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . L'acide bétulinique (15) a

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



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

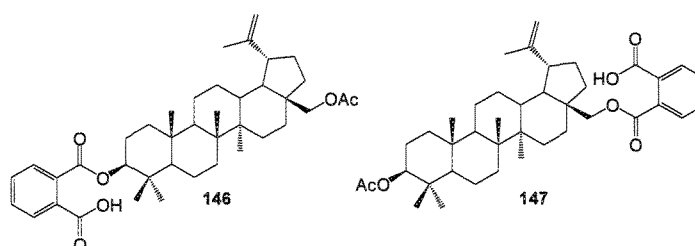
Afin d'augmenter les rendements globaux et de faciliter la préparation de l'acide bétulinique (**15**) à plus grande échelle, un groupe allemand a récemment rapporté la synthèse en une seule étape de **15** à partir de **16** [Csuk *et al.*, 2006]. L'approche consistait en l'oxydation sélective de l'alcool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



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

#### 2.2.4. Dérivés Synthétiques Anticancéreux

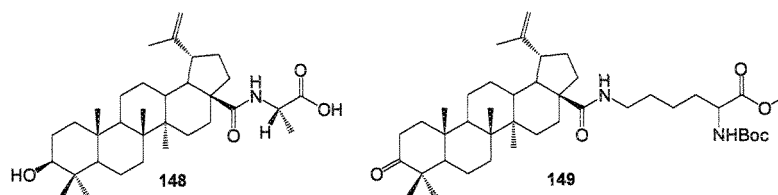
Durant la dernière décennie, des centaines de dérivés triterpéniques de type lupane ont été synthétisés et leur activité anticancéreuse évaluée. Plusieurs revues de littérature ont d'ailleurs été publiées en ce qui a trait aux relations de structure-activité de l'acide bétulinique (**15**) et de ses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



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

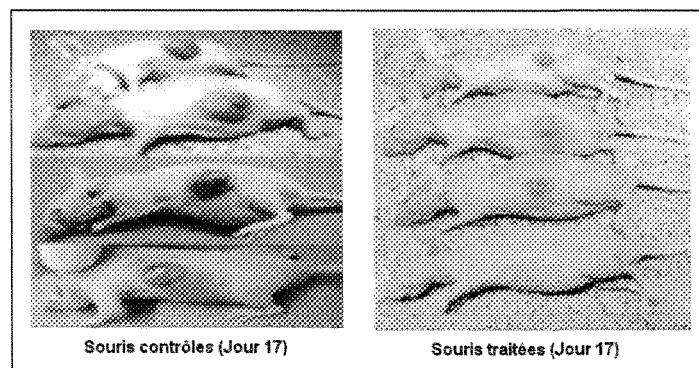
Un groupe de recherche de la République Tchèque a effectué la synthèse de dérivés phthalates de l'acide bétulinique (**15**) et du bétulinol (**16**) [Kvasnica *et al.*, 2005]. Dans la majorité des cas, l'ajout d'une section phthalate en position C-3 ou C-28 du squelette lupane a eu pour effet une augmentation significative de l'activité cytotoxique envers différentes lignées cellulaires cancéreuses. Le 3 $\beta$ -O-acétyl bétulinol hémiphthalate (**146**) et le 28-O-acétyl bétulinol hémiphthalate (**147**) (Figure 28) représentent les dérivés les plus actifs d'une série d'une trentaine de composés. Selon les auteurs, les dérivés hémiphthalates **146** et **147** sont très polaires et se dissolvent très facilement dans les solvants qu'ils ont utilisés lors des tests de cytotoxicité (10% DMSO dans H<sub>2</sub>O).





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

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

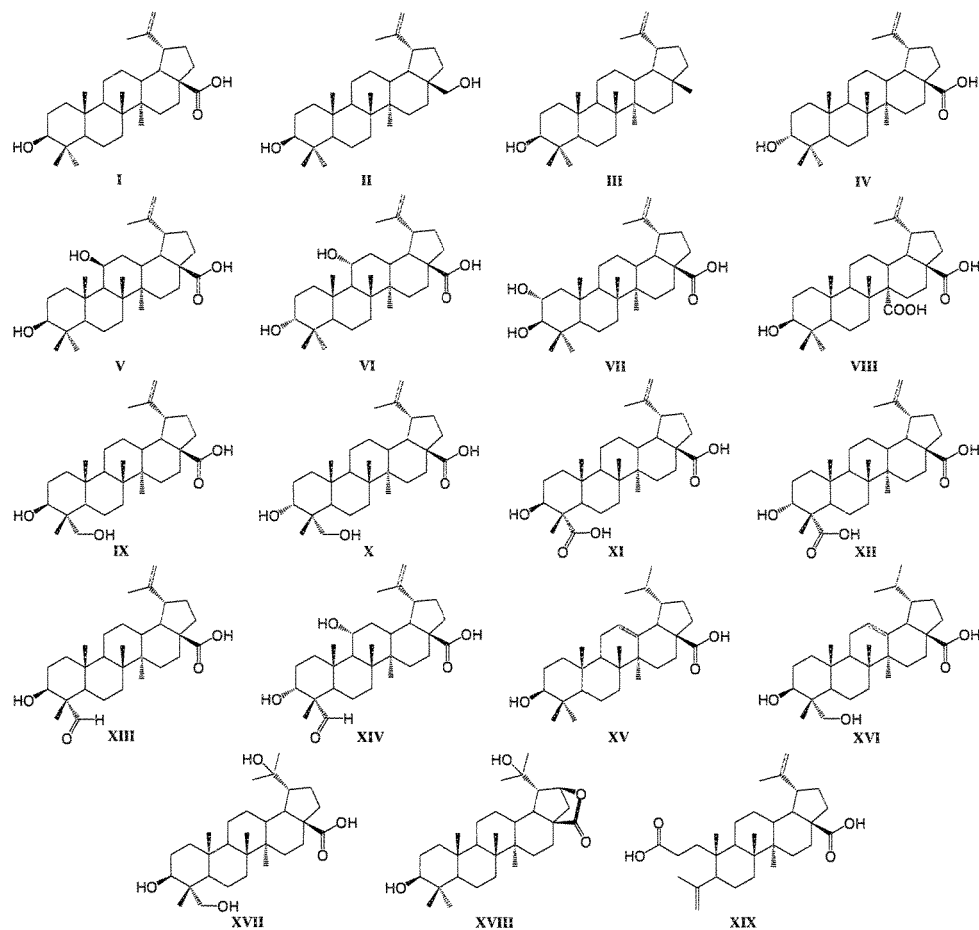


**Figure 30.** Souris traitées avec le dérivé Boc-lysine (**149**) de l'acide bétulinique (**141**)

## 2.3. LES SAPONINES DE TYPE LUPANE

### 2.3.1. Isolement et Activités Biologiques

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



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

Tableau 3. Saponines triterpéniques naturelles de type lupane

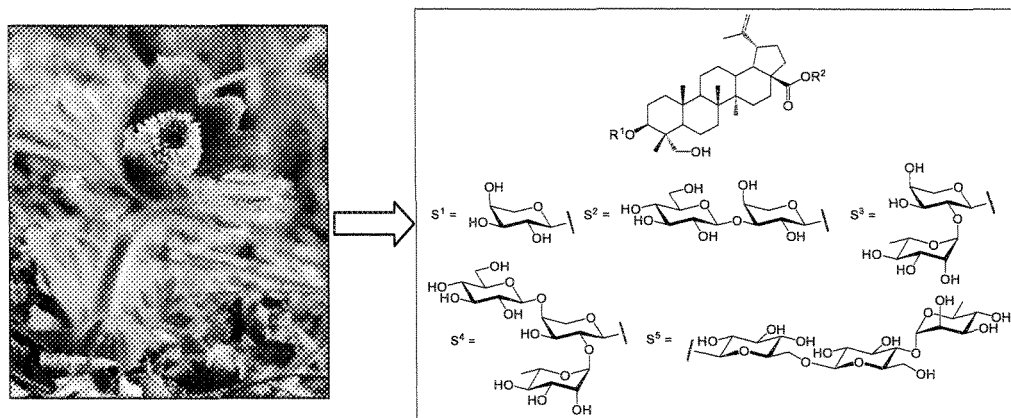
Espèce végétale	Saponine (génine)	Section Sucres		Références
		C-3	C-28	
<i>Acacia leucophloea</i>	(I)	Mal	-	Mishra, 1985
<i>Acanthopanax koreanum</i>	(VI)	-	Rha(1-4)Glc(1-6)Glc	Yook, 1998
	Acankoreoside C (VI)	Glc	Rha(1-4)Glc(1-6)Glc	Chang, 1999
<i>Acanthopanax gracilistylus</i>	Wujiapioside B (X)	-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

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

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

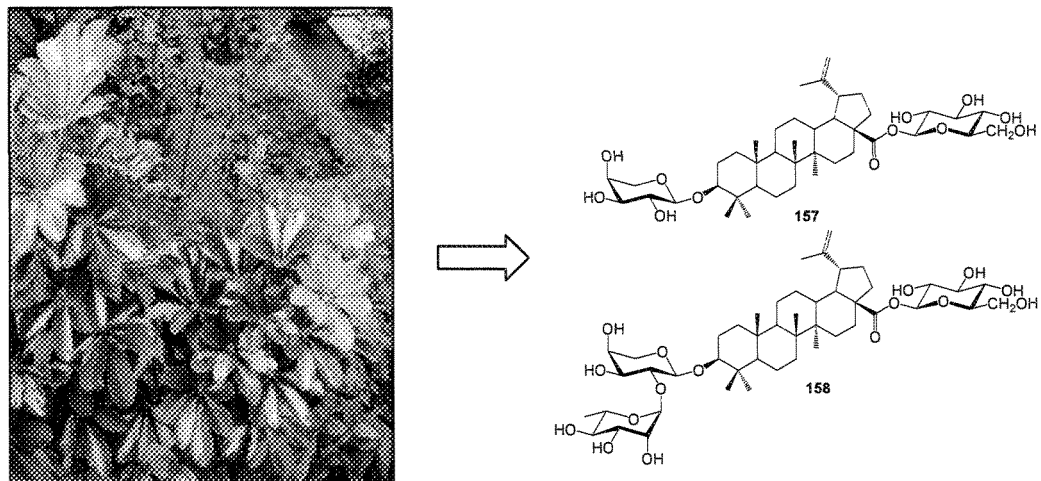
- L'acide bétulinique (I) est l'aglycone le plus souvent retrouvé (23×) suivi de l'acide 23-hydroxybétulinique (IX, 17×), de l'acide 3 $\alpha$ ,11 $\alpha$ -hydroxybétulinique (VI, 5×) et de l'acide 3 $\alpha$ -bétulinique (IV, 4×) ou acide épi-bétulinique.
- Une seule saponine à base de bétulinol (II)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

Très peu d'études ont rapporté l'activité biologique des saponines de type lupane. En effet, à notre connaissance, seulement quelques articles traitent de l'activité [Just *et al.*, 1998; Yoshizumi *et al.*, 2006], et plus particulièrement de la cytotoxicité [Cioffi *et al.*, 2003; Bang *et al.*, 2005] de ces saponines naturelles. À cet égard, des saponines mono- et bidesmosidiques (**150-155**) isolées des racines de *Pulsatilla chinensis* contenant une génine acide 23-hydroxybétulinique (**156, IX**) ont été testées pour leur activité anticancéreuse *in vitro* [Ye *et al.*, 2002]. Les résultats présentés dans le tableau 4 sous la forme d'IC<sub>50</sub> montrent que les saponines monodesmosidiques **150** (pulsatilloside A) et **151** (pulsatilloside B ou anémoside A<sub>3</sub>) contenant, respectivement, des sections Arap et Rhap(1→2)Arap sont celles qui inhibent le plus fortement la croissance des lignées cellulaires cancéreuses K-562 (leucémie) et HeLa (cancer de l'utérus) surpassant l'activité des acides bétulinique (**15**) et 23-hydroxybétulinique (**156**). Il est intéressant de noter que le monodesmoside **152** contenant une section sucre en C-28 est la molécule la moins active de cette série. Des études supplémentaires ont établi que les pulsatillosides A (**150**) et B (**151**) sont capables de protéger les cellules PC12 contre l'apoptose induite par le cyanure de sodium et/ou une carence en glucose [Gao *et al.*, 2003].

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

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

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

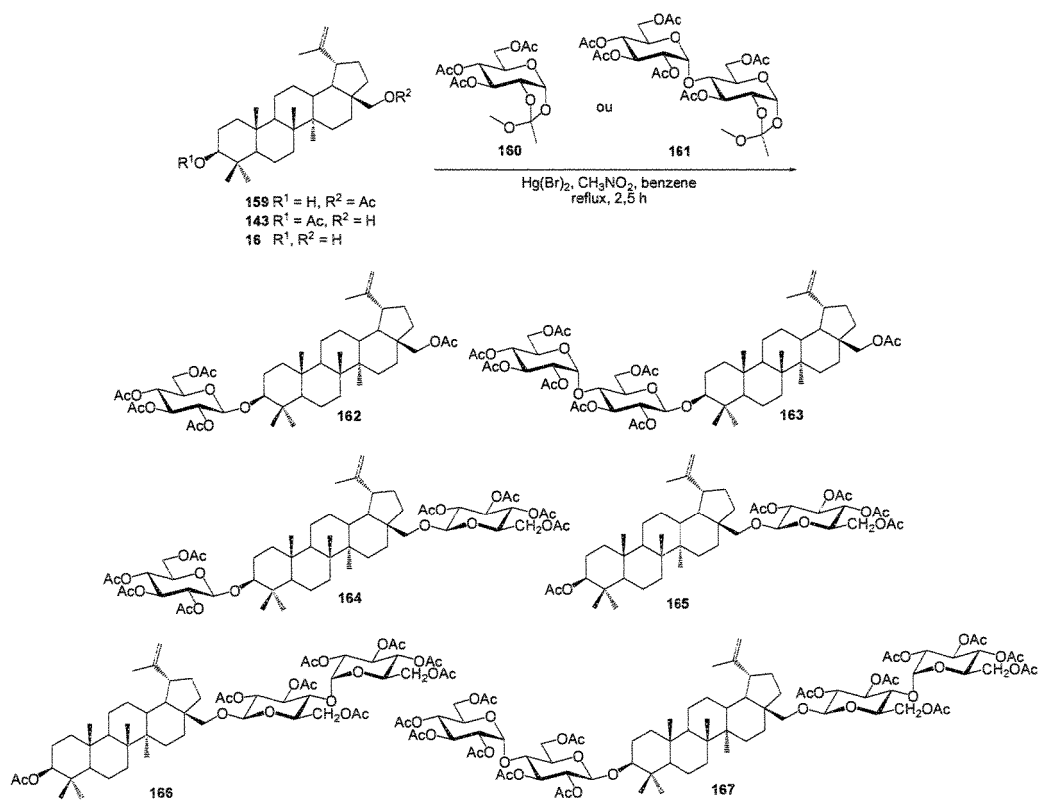


**Figure 32.** Saponines bidesmosidiques (**157** et **158**) de type lupane isolées de *S. rotundifolia*

### 2.3.2. Synthèse de Saponines de Type Lupane

#### 2.3.2.1. Groupes Russes

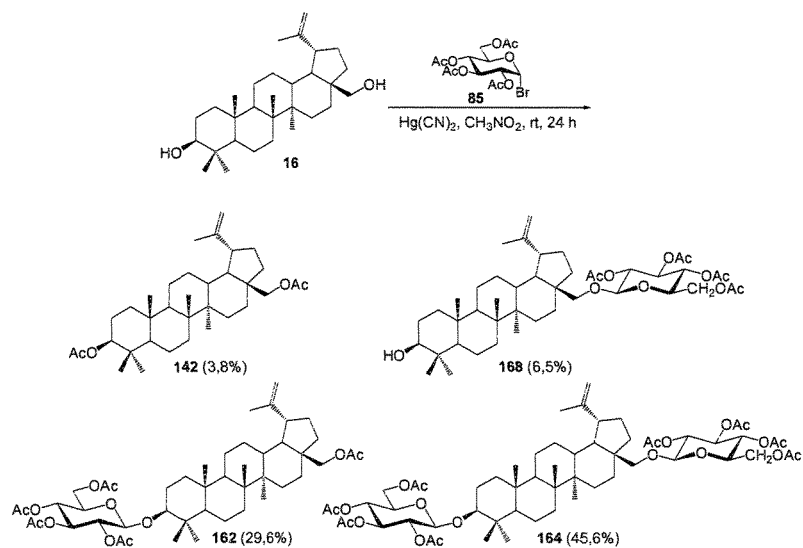
L'une des premières synthèses de glycosides triterpéniques de type lupane a été publiée en 1973 par un groupe de chercheurs de l'académie des sciences de l'ancienne U.R.S.S. [Uvarova *et al.*, 1973]. Plusieurs saponines mono- et bidesmosidiques (**162-167**) à génine bétulinol (**16**) ont ainsi été préparées par l'utilisation des sucres orthoesters peracétylés de type glucose (**160**) et maltose (**161**) en présence de  $\text{Hg}(\text{Br})_2$  dans le  $\text{CH}_3\text{NO}_2$ . Il est pertinent de mentionner que les liaisons glycosidiques étaient de nature  $\beta$  (1,2-*trans*-glycosides) pour toutes les saponines synthétisées peracétylées (Figure 33) comme c'est le cas généralement avec l'utilisation des sucres orthoesters [Levy *et al.*, 2006].



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

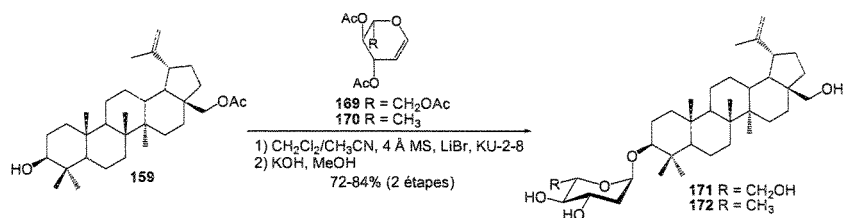
Quelques années plus tard, les mêmes chercheurs ont rapporté à nouveau la synthèse de 1,2-*trans*-glucosides de bétulinol (**142**, **162**, **164** et **168**) [Uvarova *et al.*, 1980] en utilisant les conditions de Koenigs-Knorr [1901]. Cette fois-ci, le couplage du bétulinol (**16**) avec le sucre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





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

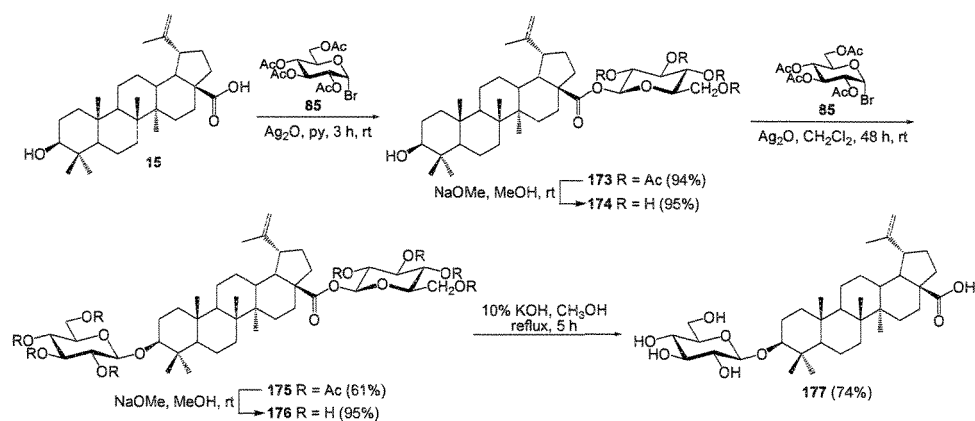
Flekhter et ses collaborateurs [2000] ont rapporté la synthèse de 2-désoxy- $\alpha$ -L-glycosides de bétulinol (**171** et **172**) via les sucres de type glycols **169** et **170** en conditions de catalyse acide (Figure 35). Après la déprotection des groupements acétyles (KOH/MeOH), les saponines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



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

Des saponines d'acide bétulinique (**15**) à sections D-glucose ont été préparées par un groupe de chercheurs russes [Samoshina *et al.*, 2003]. Leur méthodologie de synthèse consistait au couplage du triterpène **15** avec le sucre bromé **85** en présence d'une quantité stoechiométrique d'oxyde d'argent ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ) dans la pyridine (Figure

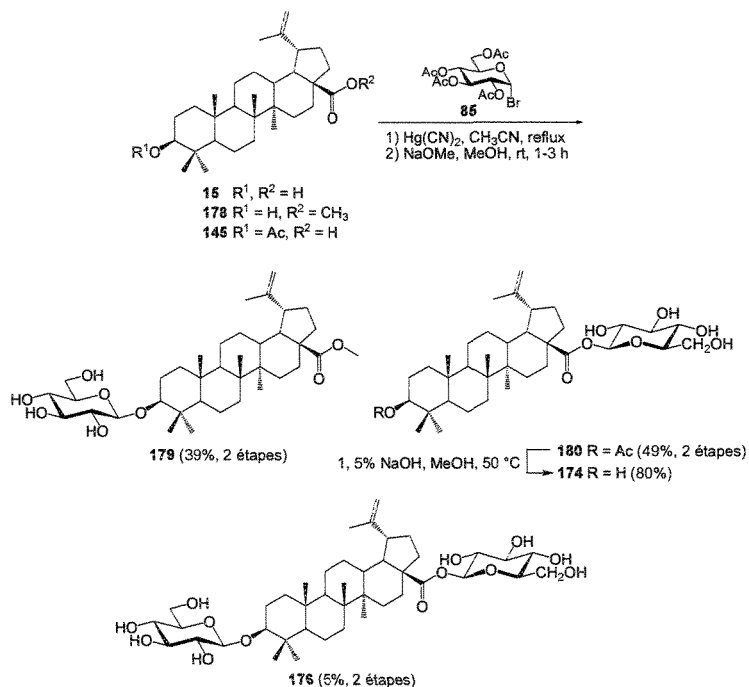
36). Le C-28 glycoside peracétylé résultant (**173**, 94%) a ensuite été déprotégé en **174** (95%). La glycosylation entre **173** et **85** avec  $\text{Ag}_2\text{O}$  comme promoteur de la réaction a généré le bidesmoside peracétylé **175** (61%) qui a été déprotégé en **176** (95%). L'acide 3 $\beta$ -O- $\beta$ -D-glucopyranoside bétulinique (**177**, 74%) a finalement été obtenu après l'hydrolyse basique de la saponine **175**.



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

### 2.3.2.2. Groupes Tchèques

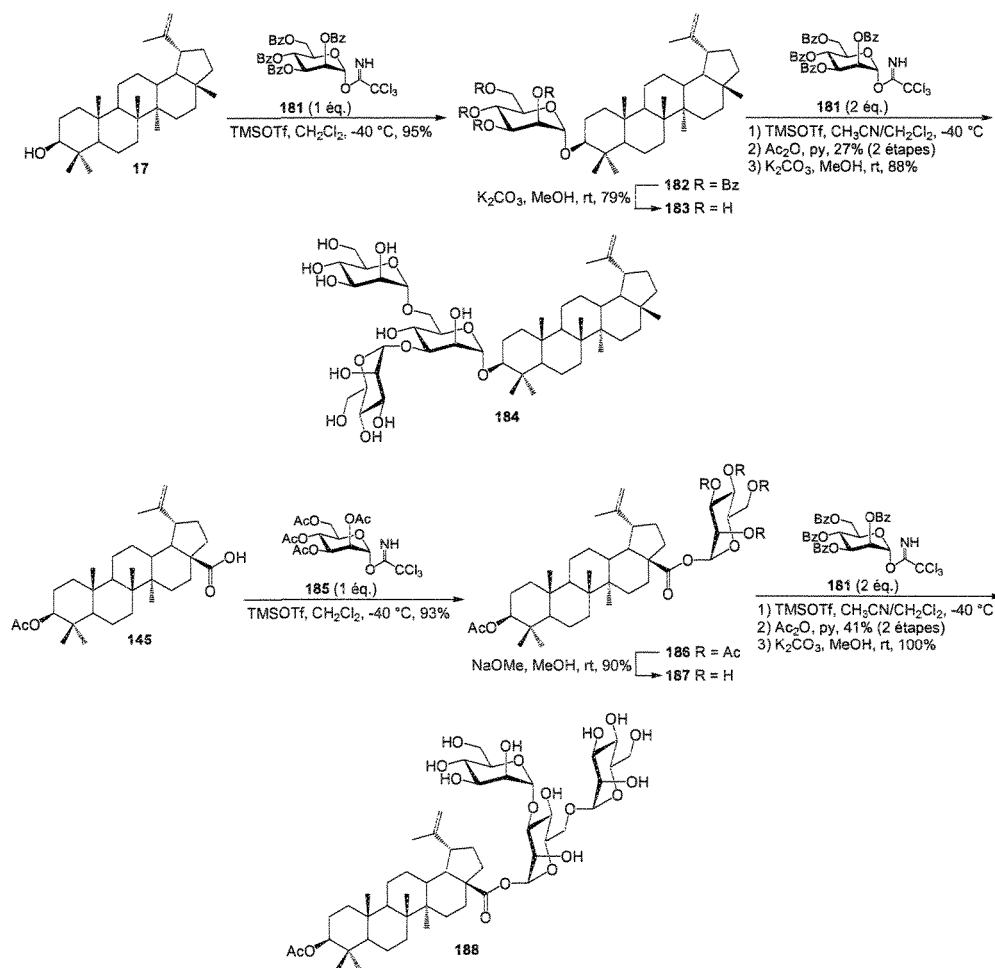
En 1997, Klinitová et ses collaborateurs [1997] de la Charles University de Prague en République Tchèque ont rapporté la préparation d'une série de C-3 et C-28 glycosides triterpéniques de type lupane. En utilisant des conditions standards de glycosylation (sucre bromé **85** et  $\text{Hg}(\text{CN})_2$  dans  $\text{CH}_3\text{CN}$ ), les chercheurs ont réussi la synthèse du C-3 glycoside de bétulinate de méthyle (**179**, 39%, deux étapes), du C-28 glycoside d'acide bétulinique (**174**, 39%, trois étapes) et du 3,28-bis-glycoside d'acide bétulinique (**176**, 5%, deux étapes) au départ du bétulinate de méthyle (**178**), de l'acide 3-acétyl bétulinique (**145**) et de l'acide bétulinique (**15**), respectivement (Figure 37). Il est à noter que ces conditions réactionnelles dites de Koenigs-Knorr conduisent à la formation du bidesmoside **176** dans un très faible rendement de 5% après deux étapes de synthèse.



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

Récemment, la synthèse de trimannosides 3,6-branchés de lupéol (**17**) et d'acide bétulinique (**15**) a été rapportée dans le journal *Carbohydrate Research* [Cmoch *et al.*, 2008]. Les auteurs stipulent que ce type de sections osidiques pourrait permettre de cibler certaines cellules humaines telles que les macrophages et les cellules dendritiques par l'entremise d'interactions avec des récepteurs protéiques spécifiques au mannose [Pakułski *et al.*, 2005]. Leur voie de synthèse présentée à la figure 38 consistait au couplage du lupéol (**17**) ou de l'acide 3-acétyl bétulinique (**145**) avec le mannose TCA perbenzoylé **181** ou peracétylé **185** en présence du promoteur TMSOTf. Les monodesmosides résultant (**182**, 95%; **186**, 90%) ont ensuite été déprotégés (**183**, 79%; **187**, 90%) et subséquemment couplés aux positions C-3' et C-6' avec le TCA **181**. L'hydrolyse basique ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ , MeOH) des groupements protecteurs a mené à la formation des trimannosides de lupéol (**184**) et d'acide 3-acétyl bétulinique (**188**). Les molécules ont toutes été testées quant à leur capacité à inhiber la croissance de lignées cellulaires cancéreuses humaines. Les résultats ont révélé que les saponines contenant une seule unité osidique (**183** et **187**) exercent des

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

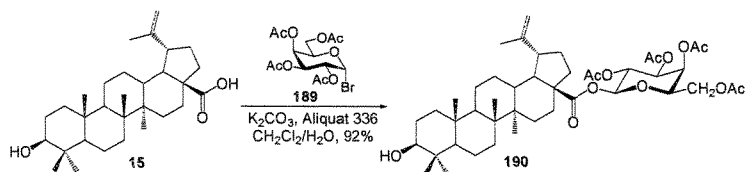


**Figure 38.** Synthèse de trimannosides 3,6-branchés (**184** et **188**)

### 2.3.2.3. Autres Groupes

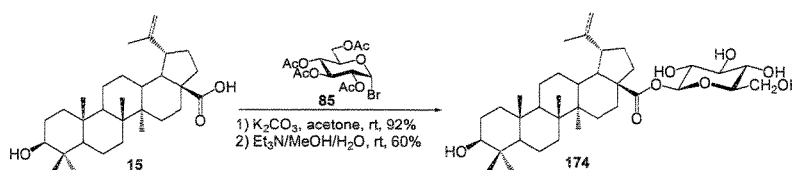
Vers le milieu des années 1990, des chercheurs du laboratoire de Pharmacognosie de l'Université de Reims en France ont publié un court article dans lequel ils décrivent la synthèse d'acyl-glycosides en conditions de transfert de phase [Bliard *et al.*, 1994]. Cette méthodologie qui mène à la formation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

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



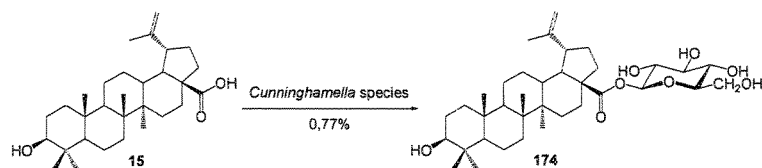
**Figure 39.** Synthèse d'un C-28 galactoside d'acide bétulinique (**190**) en conditions de transfert de phase

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



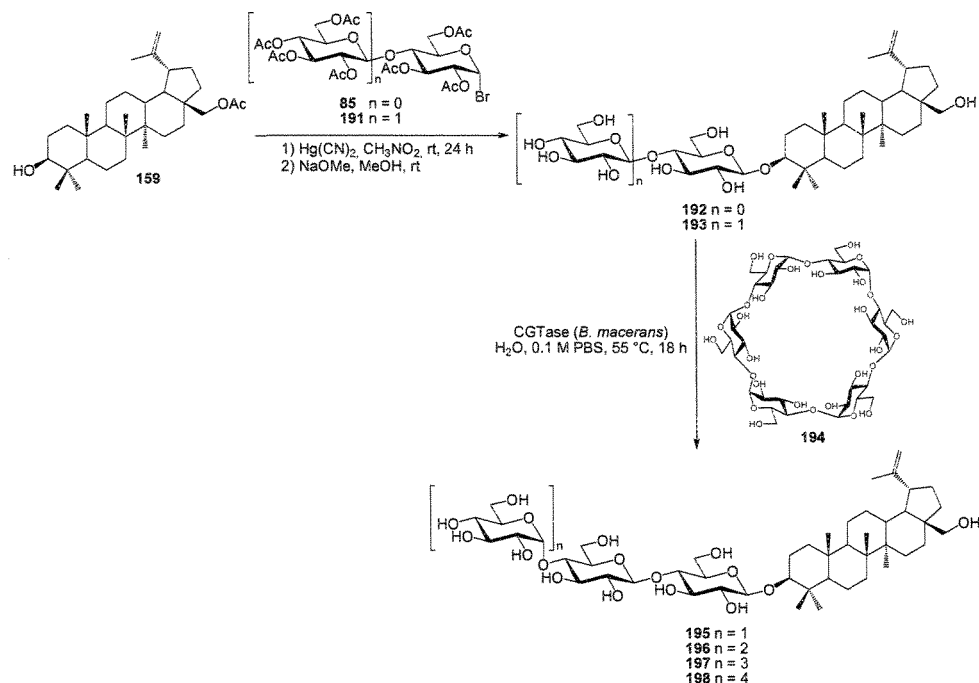
**Figure 40.** Synthèse du C-28 glucoside d'acide bétulinique (**174**)

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



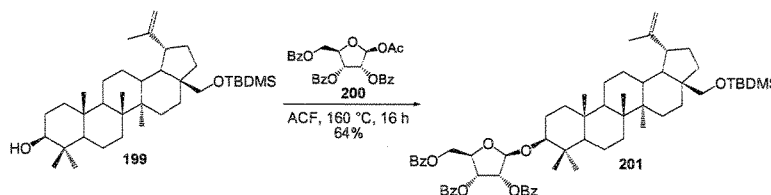
**Figure 41.** Biotransformation de l'acide bétulinique (15) par *Cunninghamella*

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



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

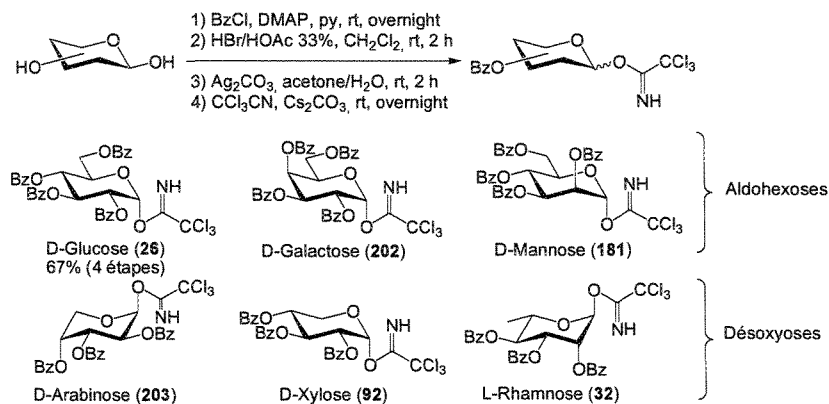
Dernièrement, un article publié dans *Green Chemistry* a montré que, pour la première fois, il était possible de synthétiser des *O*- et *N*-glycosides en utilisant de la fibre de carbone activé (ACF) comme promoteur dans des conditions réactionnelles sans solvant à haute température [Lautrette *et al.*,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



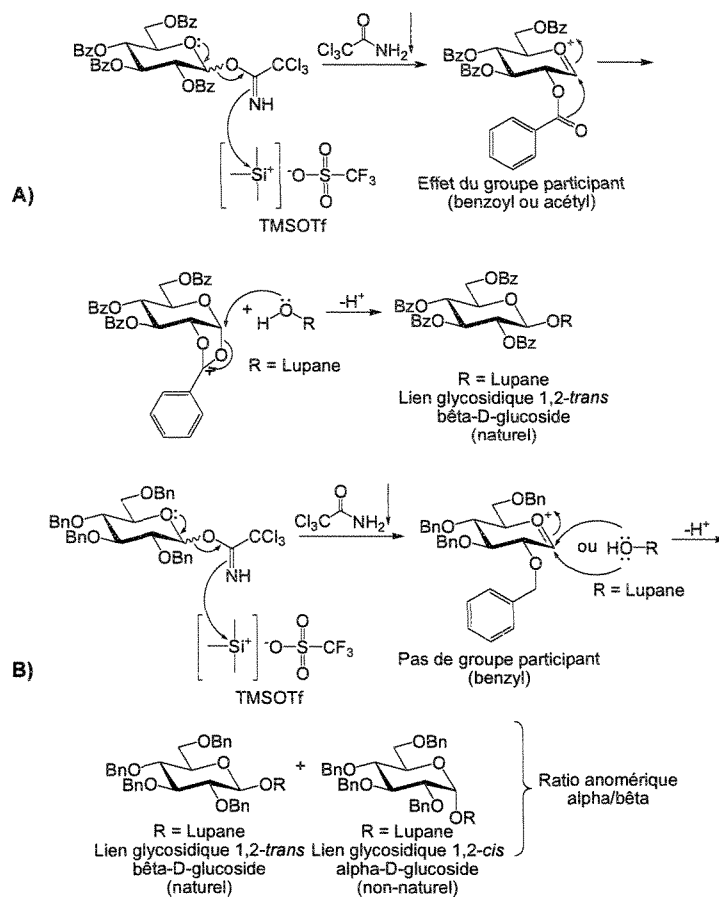
**Figure 43.** Synthèse du ribofuranoside de bétulinol (**201**) par glycosylation verte

#### 2.3.2.4. Groupe Pichette

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



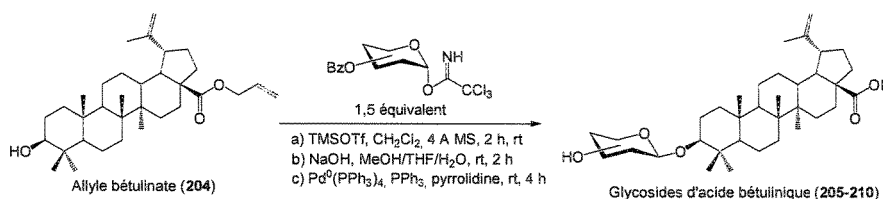
**Figure 44.** Sucres activés perbenzoylés utilisés pour la synthèse de monodesmosides



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



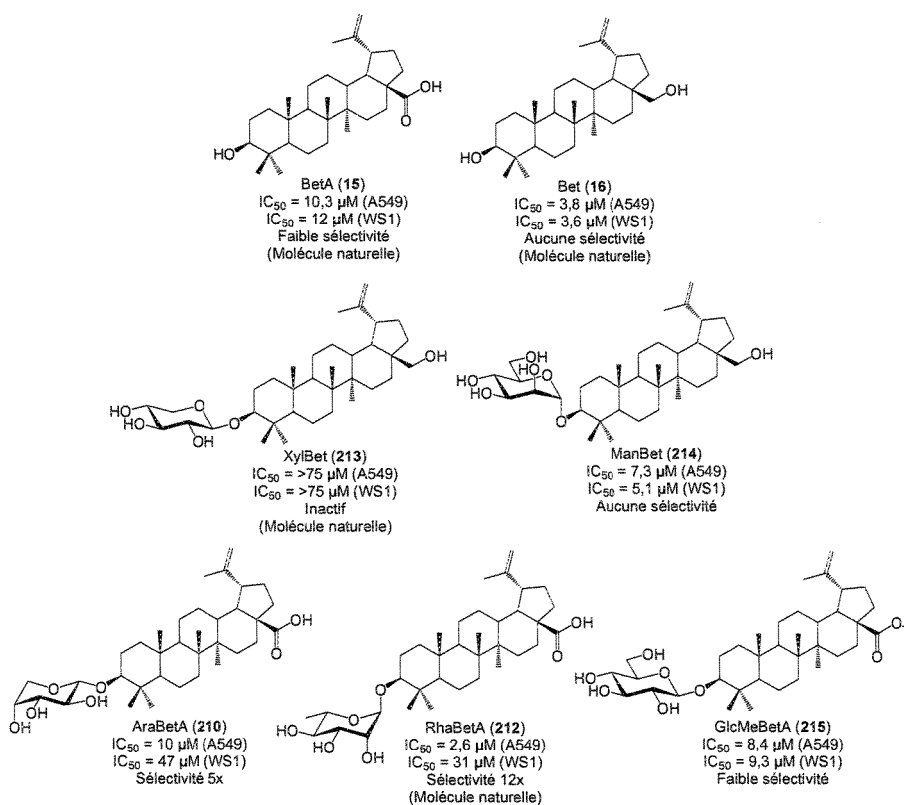
Ces sucres TCA ont été couplés avec différents accepteurs triterpéniques de type lupane (lupéol, bétulinol, acide bétulinique et bétulinate de méthyle) et germanicane (allobétulinol et oxoallobétulinol), dérivés de réarrangement (voir Annexe 2). Par exemple, les glycosides d'acide bétulinique (**205-210**)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



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

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

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



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