

CHAPITRE 2

REVUE DE LA LITTÉRATURE

2.1. LES SAPONINES TRITERPÉNIQUES

2.1.1. Généralités

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

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

2.1.2. Activités Biologiques

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

2.1.2.1. Activité Hémolytique

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

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

2.1.2.2. Activités Cytotoxique et Antitumorale

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

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

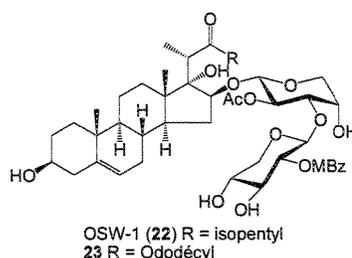


Figure 4. Structure d'OSW-1 (**22**) et d'un dérivé oxygéné (**23**)

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

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

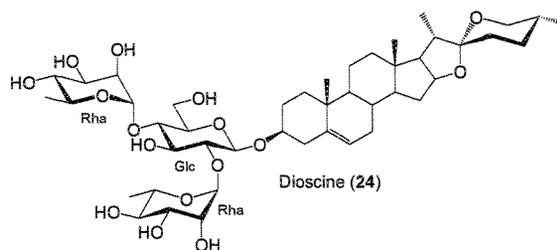


Figure 5. Structure de la dioscine (**24**), une saponine de la médecine traditionnelle orientale

2.1.3. Isolement de Saponines

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

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

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

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

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

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

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

2.1.4. Synthèse de Saponines

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

2.1.4.1. Synthèse de Monodesmosides

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

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

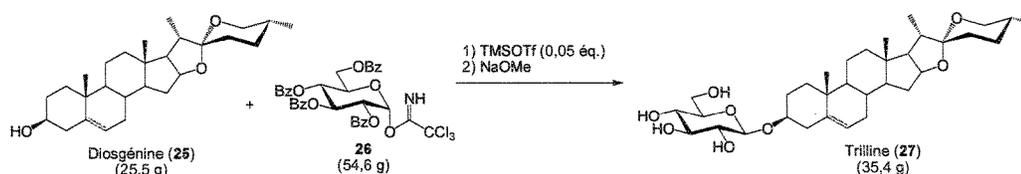


Figure 6. Synthèse pratique de la trilline (27)

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

2.1.4.1.1. Synthèse d'Arabinosides

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

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

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

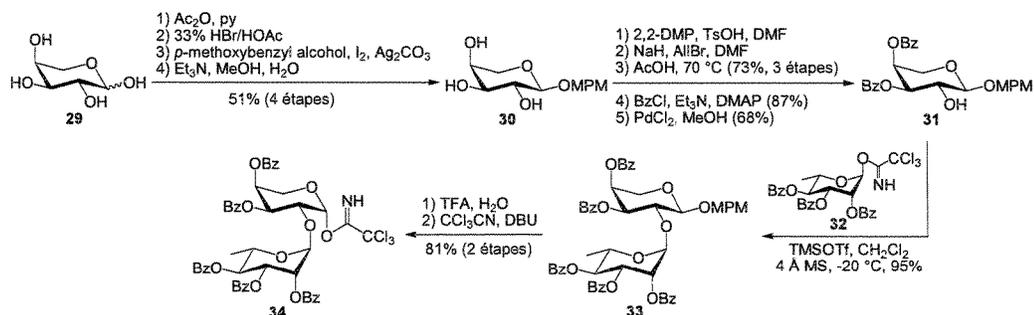


Figure 7. Synthèse du 2,3,4-tri-*O*-benzoyl- α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)-3,4-di-*O*-benzoyl- α -L-arabinopyranosyl trichloroacétimide (**34**)

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

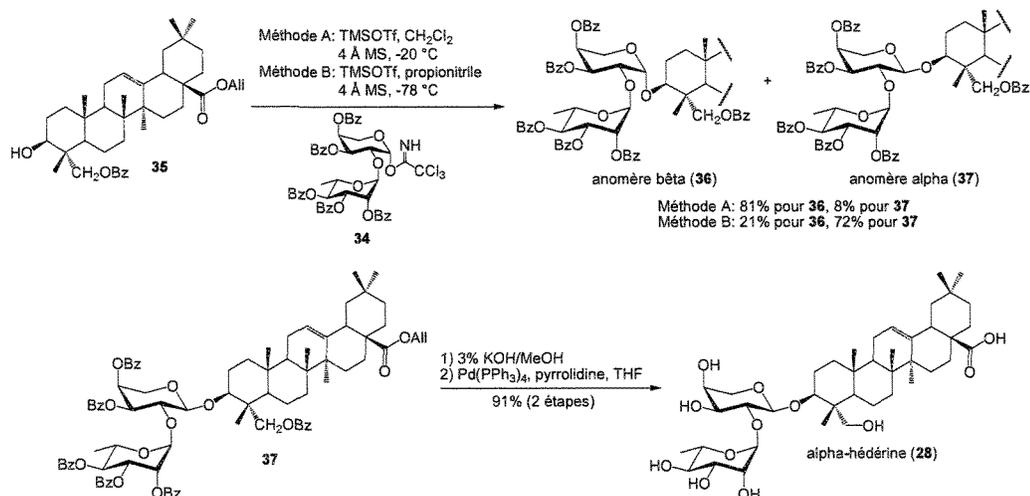


Figure 8. Synthèse de l' α -hédérine (28) selon une approche convergente

Un article publié en 2006 dans le journal *Carbohydrate Research* [Cheng *et al.*, 2006] décrit la synthèse de la β -hédérine (38), une saponine à génine acide oléanolique (20) contenant une section α -L-Rhap(1 \rightarrow 2)- α -L-Arap en C-3, qui exerce une activité anticancéreuse *in vitro* supérieure à l' α -hédérine (28) [Barthomeuf *et al.*, 2002]. Pour ce faire, les chercheurs ont utilisé une méthode linéaire dite par glycosylations successives (Figure 9). L'acide oléanolique C-28 benzylé (39) a été couplé avec le 2,3,4-tri-*O*-benzoyl- β -L-arabinopyranosyl trichloroacétimidate (40) en présence de TMSOTf pour donner l'arabinoside 41 (94%) qui a été subséquentement déprotégé (42, 97%). La protection des groupements hydroxyles en positions 3' et 4' du dérivé 42 suivie de la glycosylation avec le TCA 32 à basse température (-78 °C) avec BF₃•OEt₂ comme promoteur a résulté en la formation de la saponine protégée diglycosidique 44 (79%). Finalement, le clivage des groupements isopropylidène (98%), benzyle et benzoyles (86%, deux étapes) a mené à la formation de la β -hédérine (38) avec la configuration anomérique 1,2-*trans* désirée.

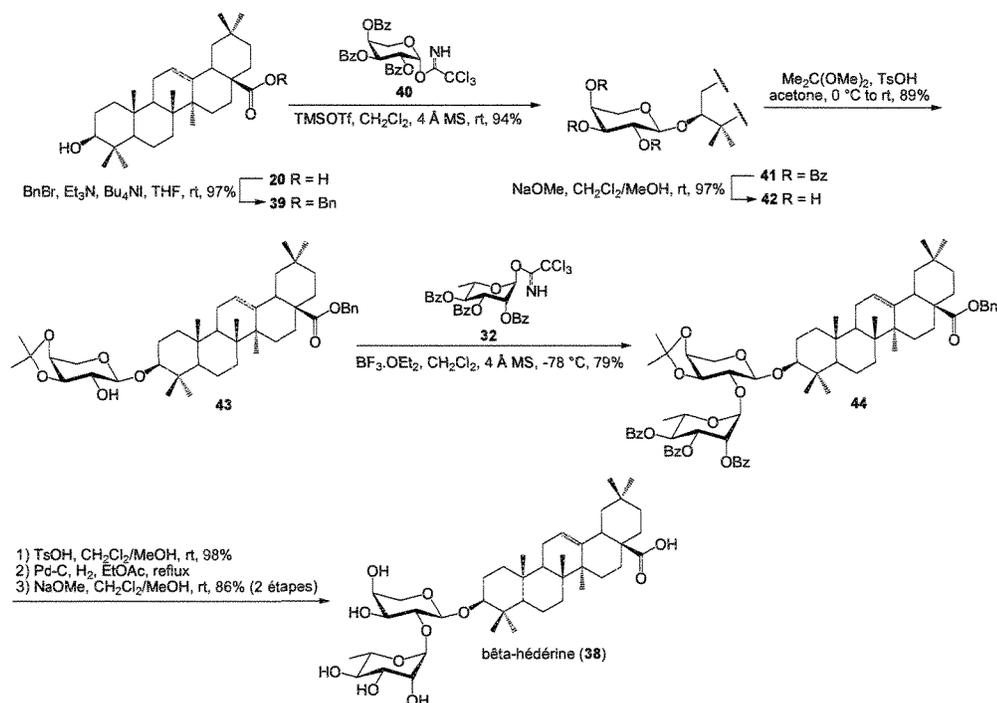


Figure 9. Synth\u00e8se de la β -h\u00e9d\u00e9rine (**38**) selon une approche lin\u00e9aire

\u00c0 partir du d\u00e9riv\u00e9 totalement prot\u00e9g\u00e9 **44**, ce m\u00eame groupe de recherche a entrepris la synth\u00e8se de l'h\u00e9d\u00e9racolchiside A_1 (**45**) (Figure 10). L'unique diff\u00e9rence structurale entre **45** et la β -h\u00e9d\u00e9rine (**38**) consiste en la pr\u00e9sence d'une section D-glucose en position 4' de l'arabinose. L'h\u00e9d\u00e9racolchiside A_1 (**45**) est reconnu pour sa forte activit\u00e9 anticanc\u00e9reuse [Barthomeuf *et al.*, 2002; Gerkens *et al.*, 2007] en lien avec sa capacit\u00e9 \u00e0 former des pores dans les membranes cellulaires [Debiton *et al.*, 2004; Mazzucchelli *et al.*, 2008]. La synth\u00e8se a donc d\u00e9but\u00e9 par le clivage de l'isopropylid\u00e8ne de la mol\u00e9cule **44** \u00e0 l'aide de TsOH pour fournir **46** (98%). Ensuite, une s\u00e9rie de protections-d\u00e9protections successives a men\u00e9 \u00e0 la formation de l'accepteur **47** dans un rendement global de 66% en quatre \u00e9tapes. La glycosylation de **47** avec le TCA **26** en pr\u00e9sence de TMSOTf a permis la formation de la saponine prot\u00e9g\u00e9e trisaccharidique **48** (71%). Il est \u00e0 noter qu'un large exc\u00e8s de TMSOTf (2,5 \u00e9q.) a d\u00f9 \u00eatre employ\u00e9 \u00e0 cette \u00e9tape afin d'obtenir un rendement satisfaisant. L'h\u00e9d\u00e9racolchiside A_1 (**45**) a finalement \u00e9t\u00e9 synth\u00e9tis\u00e9 par la d\u00e9protection des groupements benzyle et benzoyles de la mol\u00e9cule **48** (70%, deux \u00e9tapes). Au

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

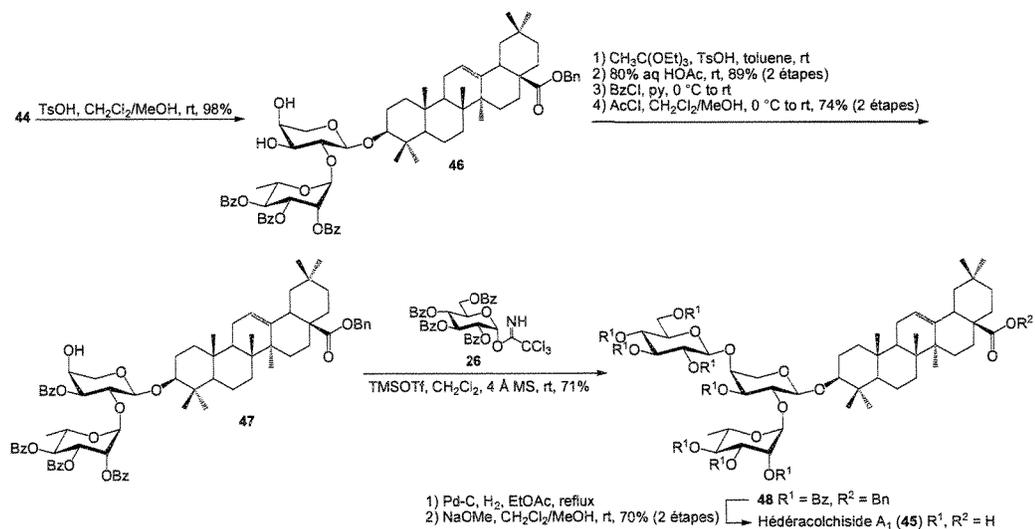


Figure 10. Synthèse de l'hédéracolchiside A₁ (**45**)

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

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

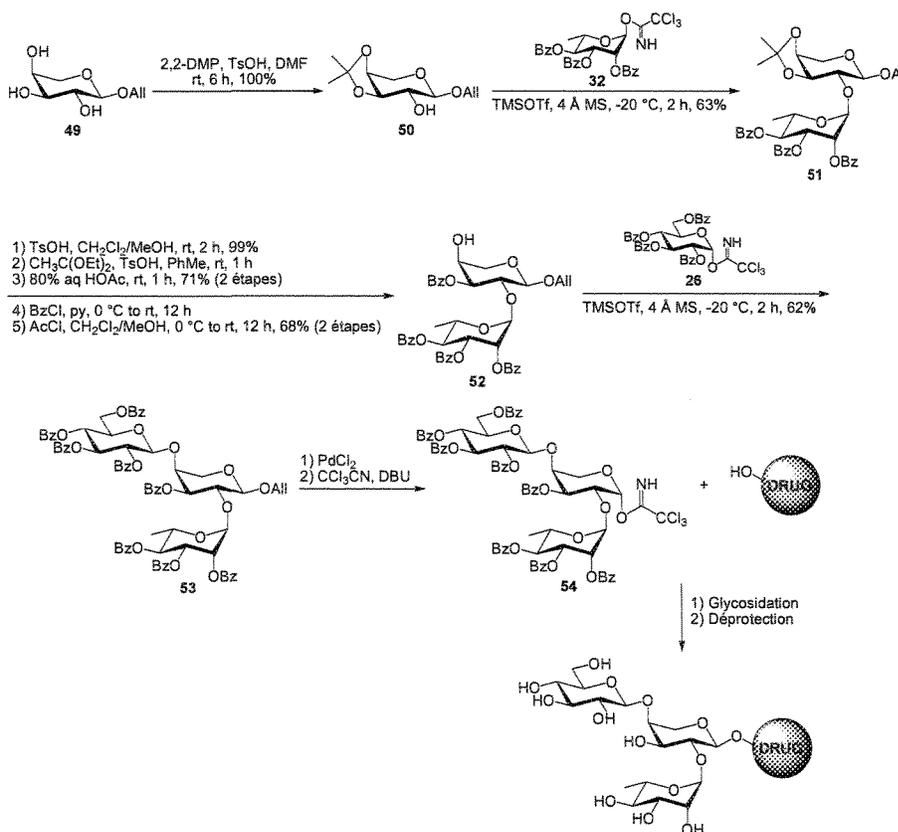


Figure 11. Synthèse de la section α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)-[β -D-glucopyranosyl-(1→4)]- α -L-arabinopyranoside (**54**)

2.1.4.1.2. Synthèse de Chacotriosides

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

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

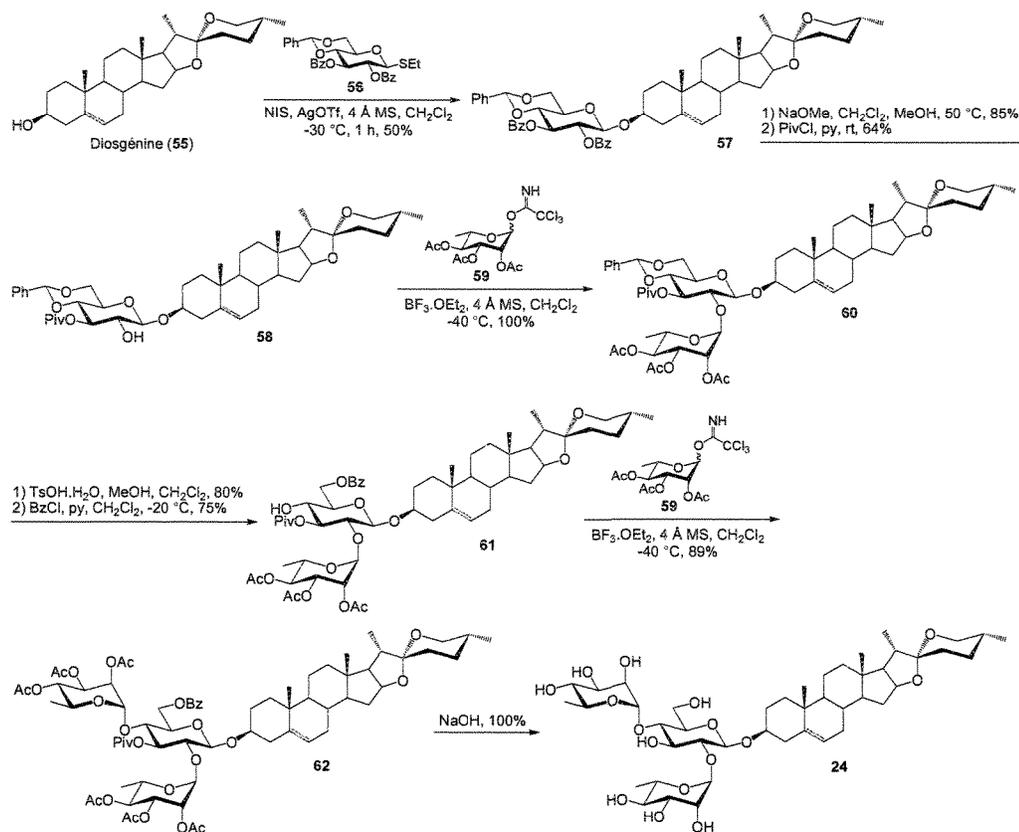


Figure 12. Première synthèse de la dioscine (**24**) selon une approche linéaire

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

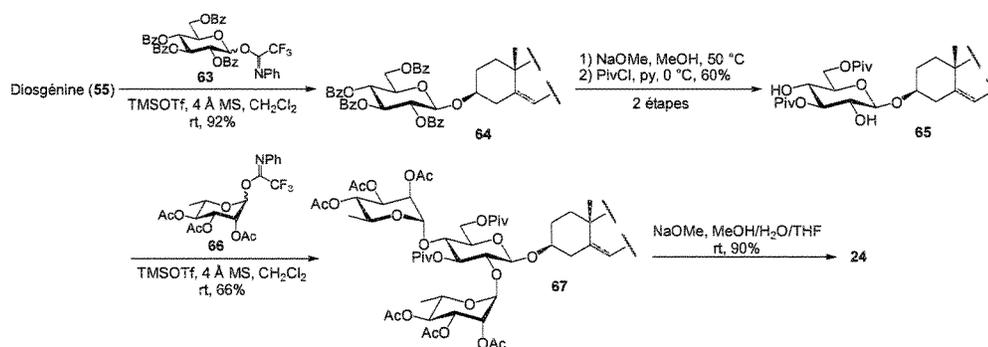


Figure 13. Seconde synthèse de la dioscine (**24**) selon une approche linéaire

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

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

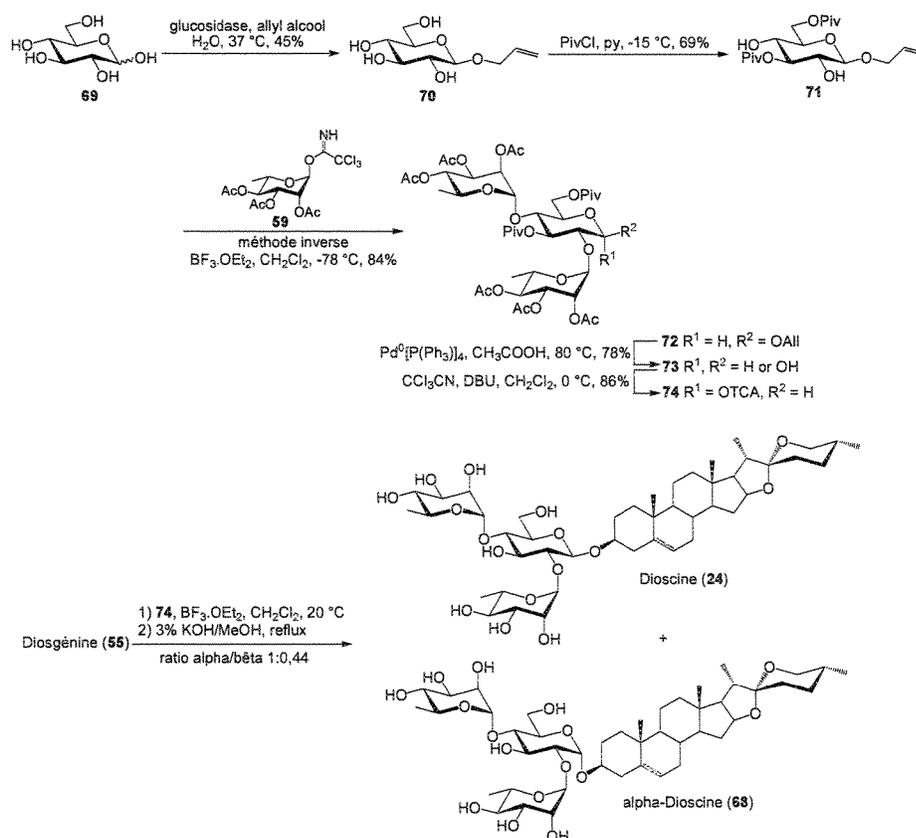


Figure 14. Synthèse de la dioscine (24) selon une approche convergente

2.1.4.2. Synthèse de Bidesmosides

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

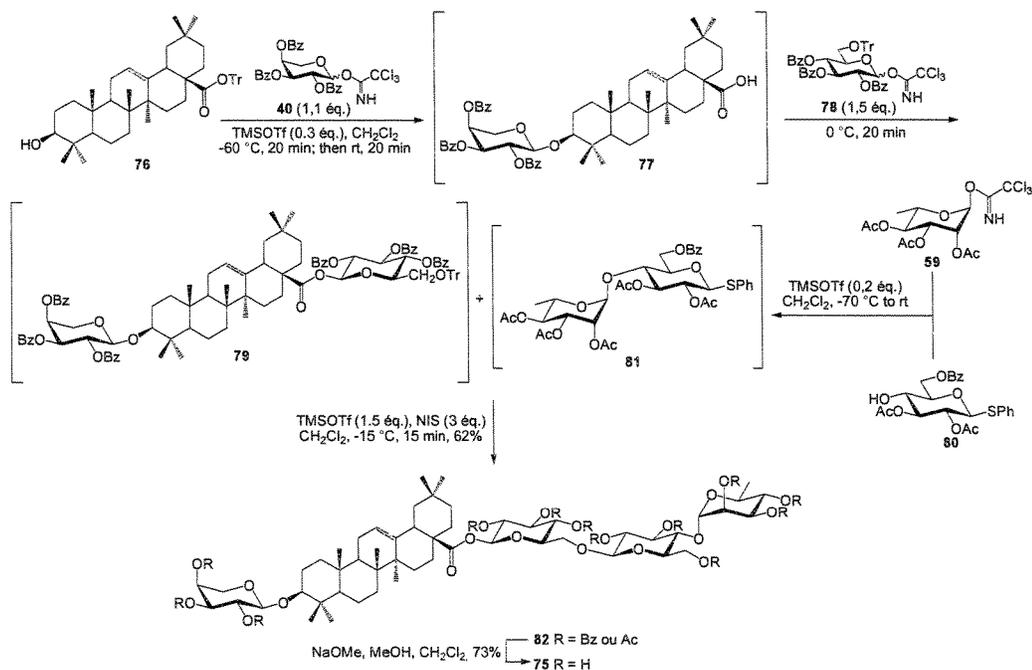


Figure 15. Synth\u00e8se d'une saponine bidesmosidique (**75**) par glycosylations successives

2.1.4.2.1. Synth\u00e8se d'Arabinosides Naturels

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

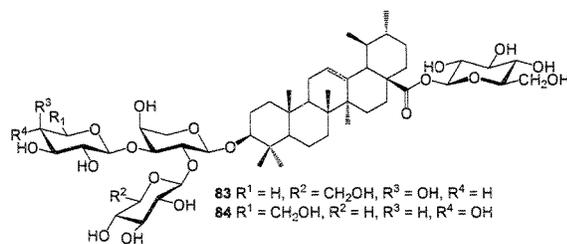


Figure 16. Saponines bidesmosidiques (**83** et **84**) \u00e0 g\u00e9nine de type acide ursolique

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

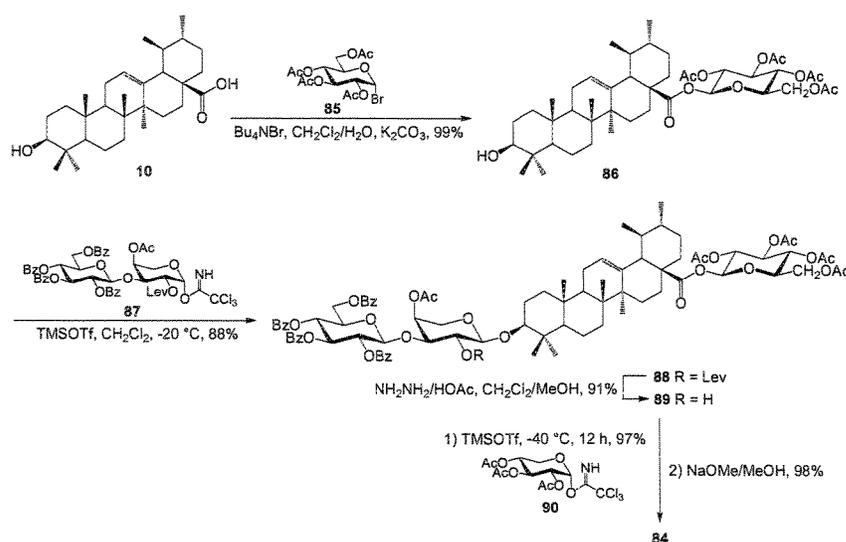


Figure 17. Synthèse d'une saponine bidesmosidique (**84**) à génine acide ursolique

2.1.4.2.2. Synthèse par Glycorandomisation

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

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

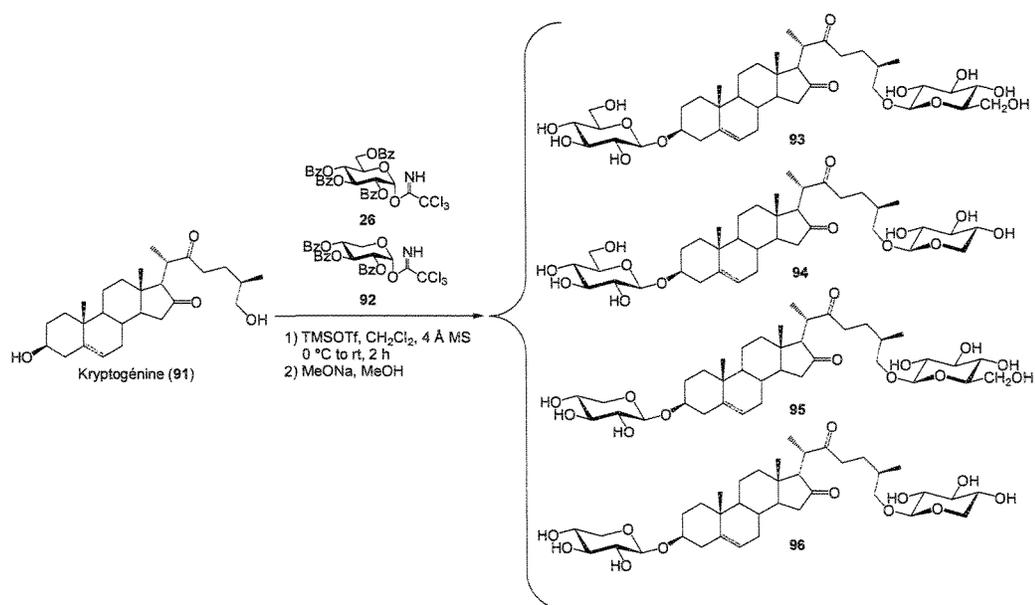


Figure 18. Synthèse de bidesmosides (**93-96**) par glycorandomisation

2.1.4.2.3. Synthèse de Bidesmosides Glucuronidés

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

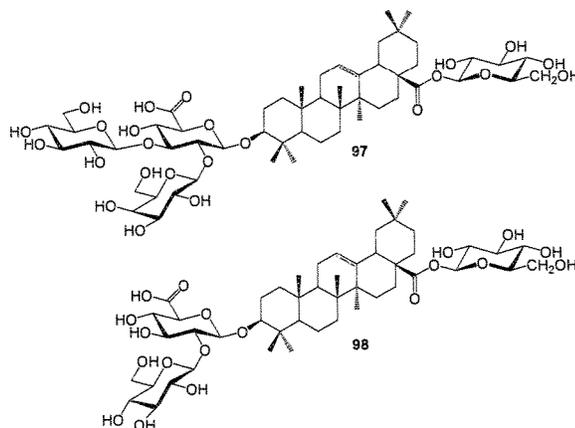


Figure 19. Saponines bidesmosidiques de type oléanane (**97** et **98**) contenant une section acide D-glucuronique

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

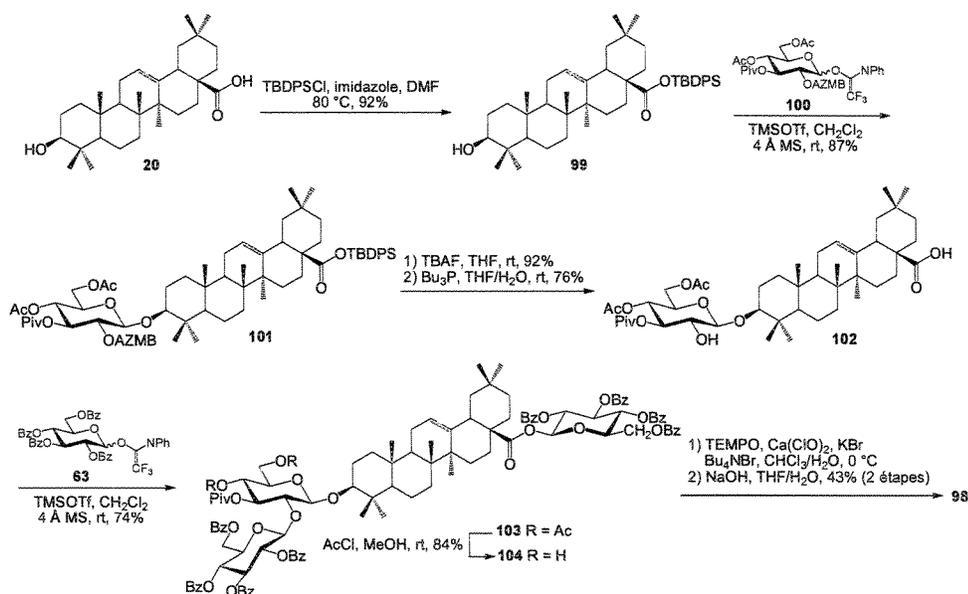


Figure 20. Synthèse d'un ginsenoside Ro (**98**) porteur d'une section acide D-glucuronique

2.1.4.2.4. Synthèse du Flaccidoside II

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

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

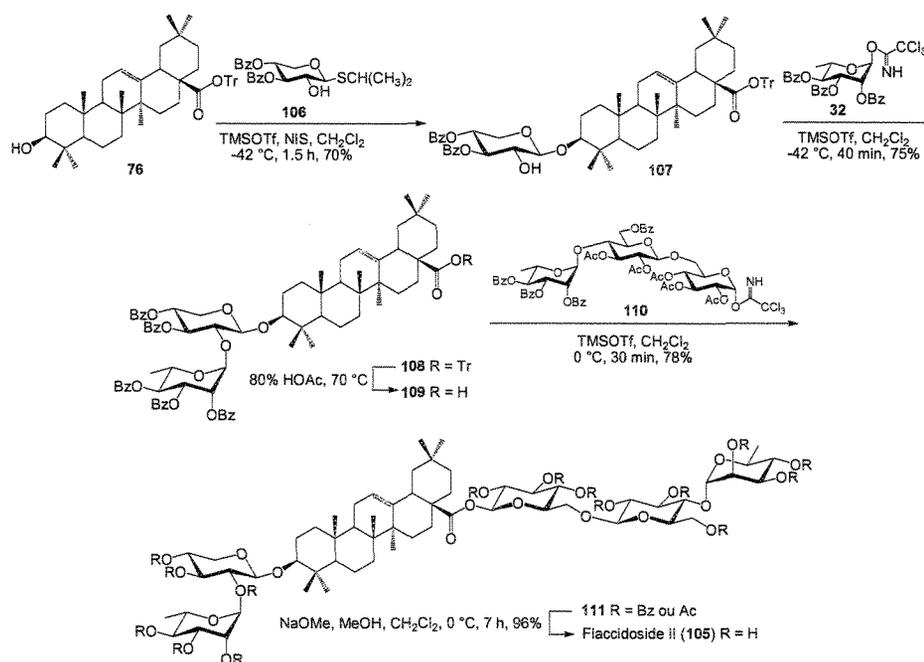


Figure 21. Synthèse du flaccidoside II (**105**) porteur d'une section osidique Rhap(1→4)Glc(1→6)Glc en C-28

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

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

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

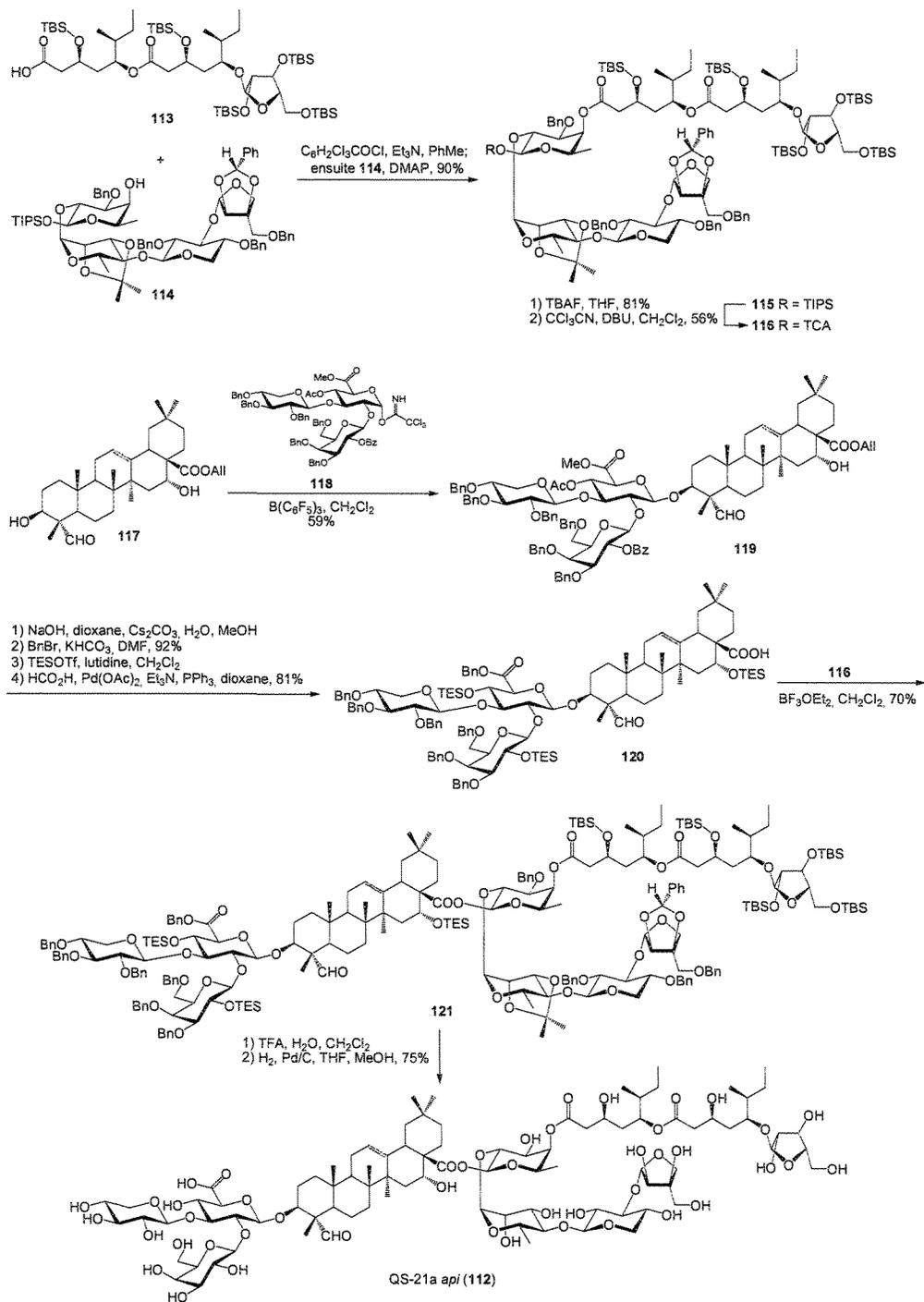


Figure 22. Synthèse totale convergente de l'adjuvant de vaccins QS-21A_{apti} (112)

2.1.4.2.6. Synthèse Totale du Lobatoside E

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

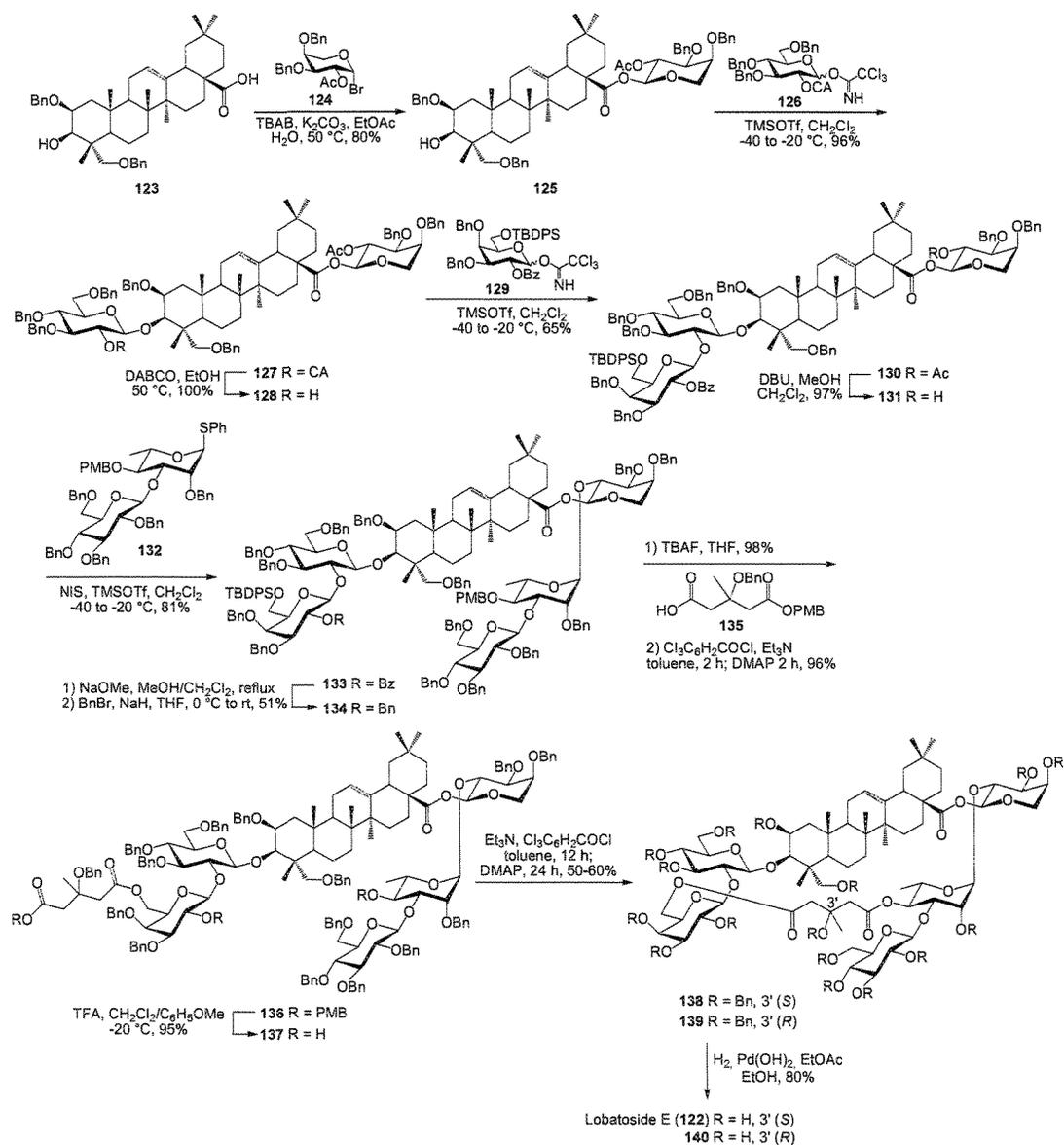


Figure 23. Synthèse totale du lobatoside E (122), un bidesmoside cyclique anticancéreux