

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

SYNTHÈSES DE BRASSINOSTÉROÏDES  
ET ÉTUDE DE LEUR POTENTIEL  
NEUROPROTECTEUR

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE EXTENSIONNÉE DE  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

PAR  
JIHANE ISMAILI

DÉCEMBRE 2012

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

## REMERCIEMENTS

En premier lieu, j'aimerais sincèrement remercier mon directeur de recherche, le professeur Benoit Daoust, pour son aide, sa grande disponibilité et ses multiples conseils tout au long de ce projet. L'encadrement du professeur Benoit Daoust a été rigoureux, stimulant et toujours positif. Merci d'avoir eu confiance en moi et en mes capacités de chimiste. Finalement, je vous remercie de m'avoir transmis votre grande passion de la chimie.

J'aimerais également remercier le groupe de recherche de Maria-Grazia Martinoli qui a effectué nos tests biologiques. Je remercie particulièrement Fanny Longpré qui m'a aidée à mieux comprendre le côté biologique de mon projet. Merci d'avoir pris le temps de m'expliquer les concepts de la neurobiologie.

Je voudrais également remercier les membres du personnel du Département de chimie-biologie pour leurs disponibilités, leurs compétences et leurs aides précieuses : Catarina Leote Franco Pio (commis senior aux études avancées), Lise Daneault (assistante administrative), Annie Girard (agente d'admission et d'inscription) et Jocelyn Bouchard (technicien de laboratoire).

Pour l'appui financier, je tiens à remercier Pharmaquam de m'avoir accordé une bourse d'études. Je tiens aussi à remercier la Bourse des programmes d'échanges internationaux d'étudiants de m'avoir donné la chance de faire un stage en France durant ma maîtrise. Cette expérience m'a grandement aidée sur le plan professionnel comme personnel.

Mes sincères remerciements pour tous mes amis qui m'ont soutenue et ont su me motiver, Nathalie, Laurent, Cynthia. Je vous remercie d'avoir fait de ces années mes plus belles années universitaires et de partager mon amour pour la chimie.

Je tiens aussi à remercier Amel Hadj Bourrasa de m'avoir trouvé un stage en France ainsi que pour tous les bons moments passés ensemble. Un grand merci au professeur Rachida Zerrouki pour m'avoir acceptée et accueillie en France pour mon stage. Merci de m'avoir transmis votre passion, de m'avoir si bien encadrée, de m'avoir fait découvrir d'autres nouvelles facettes de la recherche dans le domaine de la chimie et de m'avoir si bien intégrée au sein de votre équipe. Merci également de m'avoir soutenue et aidée à la réalisation de ce projet de maîtrise.

Je tiens également à remercier le professeur René Roy de m'avoir permis de venir dans son laboratoire afin d'effectuer les réactions sur l'ozonolyse. Je remercie aussi son assistant de recherche Chichi Shiao de m'avoir assistée lors de mes manipulations. Je remercie les professeurs Daniel Chapdelaine et Claude Spino d'avoir pris de leur temps afin d'évaluer mon travail.

Finalement, un merci chaleureux à ma famille, source inépuisable de courage et d'amour. Je réserve des remerciements particuliers à mes parents, Malika et Slimane qui m'ont toujours soutenue tout au long de ma vie. Je vous remercie d'être des parents extraordinaires. Vous serez toujours pour moi une source d'inspiration et de joie. Vous êtes et resterez toujours mes plus grandes idoles. Je vous aime.

*Je dédie ce travail à ma famille  
que j'aime plus que tout.*

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES .....	viii	
LISTE DES TABLEAUX .....	xi	
LISTE DES SPECTRES .....	xii	
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	xiv	
LISTE DES SYMBOLES .....	xvii	
RÉSUMÉ .....	xviii	
CHAPITRE I		
HISTORIQUE DE LA MALADIE DE PARKINSON ET INTRODUCTION AUX		
BRASSINOSTÉROÏDES .....		1
1.1	Maladie de Parkinson .....	1
1.1.1	Historique .....	1
1.1.2	La maladie .....	3
1.1.3	Hypothèses sur les causes de la mort des neurones dopaminergiques .....	5
1.2	Stress oxydant : Dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) .....	5
1.2.1	Définition .....	5
1.2.2	Antioxydants .....	7
1.3	Brassinostéroïdes .....	10
1.3.1	Historique .....	10
1.3.2	Caractéristiques structurales des brassinostéroïdes .....	11
1.3.3	Propriétés et applications des brassinostéroïdes .....	14
1.4	Objectifs du projet de recherche .....	15
1.4.1	Premier objectif .....	15
1.4.2	Second objectif .....	16

CHAPITRE II	
SYNTHÈSE DES BRASSINOSTÉROÏDES DE LA FAMILLE DES 29 CARBONES .....	18
2.1 Choix du produit de départ.....	18
2.2 Article scientifique (Full paper).....	20
Abstract.....	22
Introduction .....	23
Experimental .....	26
Results .....	37
Discussion.....	39
Acknowledgments.....	42
References.....	46
CHAPITRE III	
SYNTHÈSE DES PRÉCURSEURS DE BRASSINOSTÉROÏDES DE LA FAMILLE DES 27 ET 28 CARBONES .....	52
3.1 Rétrosynthèse .....	52
3.2 Synthèse de l'aldéhyde <b>14</b> .....	54
3.2.1 Dihydroxylation asymétrique du diène <b>23</b> menant au diol <b>22</b> .....	54
3.2.2 Protection de diol <b>22</b> sous forme de dioxolane <b>24</b> .....	57
3.2.3 Dihydroxylation du dioxolane <b>24</b> menant au composé <b>21</b> .....	59
3.2.4 Clivage oxydant des composés <b>21</b> (mélange diastéréoisomères) menant à l'aldéhyde <b>14</b> .....	61
3.3 Synthèse de l'aldéhyde <b>15</b> .....	63
3.3.1 Ozonolyse du composé <b>30</b> menant à l'aldéhyde <b>15</b> .....	64
3.4 Synthèse de l'aldéhyde <b>16</b> .....	67
3.4.1 Réarrangement <i>iso-stérol</i> du mésylate de stigmastérol <b>28</b> .....	68
3.4.2 Ozonolyse vs dihydroxylation et clivage oxydant menant à l'aldéhyde <b>16</b> .....	71
CHAPITRE IV	
NOUVELLES STRATÉGIES DE SYNTHÈSE DES CHAÎNES LATÉRALES CORRESPONDANT AUX BRASSINOSTÉROÏDES DE LA FAMILLE DES 27 ET 28 CARBONES .....	74
4.1 Rétrosynthèse .....	74

4.1.1	Rétrosynthèse de la chaîne latérale des BRs de la famille des 28 carbones.....	74
4.1.2	Rétrosynthèse de la chaîne latérale des BRs de la famille des 27 carbones.....	75
4.2	Synthèse de la chaîne latérale des BRs de la famille des 28 carbones .....	76
4.2.1	Préparation du dithioacétal <b>43</b> à partir de l'aldéhyde <b>16</b> .....	77
4.2.2	Protection du groupement hydroxyle du dithioacétal <b>43a</b> .....	80
4.2.3	Déthioacétalisation du dithioacétal protégé <b>46</b> menant à l'aldéhyde <b>38</b> .....	83
4.2.4	Synthèse de l'intermédiaire <b>36</b> en utilisant la chimie des métaux allyliques.....	86
4.3	Synthèse de la chaîne latérale des BRs de la famille des 27 carbones .....	96
4.3.1	Synthèse de l'intermédiaire <b>41</b> en utilisant la chimie des boranes allyliques à partir de l'aldéhyde <b>16</b> .....	97
4.4	Conclusion du deuxième objectif .....	103
	<b>CHAPITRE V</b> <b>CONCLUSION GÉNÉRALE</b> .....	106
	<b>CHAPITRE VI</b> <b>PARTIE EXPÉRIMENTALE</b> .....	109
6.1	Remarques générales.....	109
6.2	Préparation des molécules présentées au chapitre III (article) .....	110
6.2.1	Préparation du (22E, 24S)-3 $\alpha$ , 5-cyclo-stigmast-22-en-6-one ( <b>30</b> ) ..	110
6.2.2	Préparation du (22E, 24S)-stigmasta-2,22-dien-6-one ( <b>23</b> ) .....	112
6.2.3	Préparation du (22R, 23R, 24S)-2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ , 22,23-tetrahydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one ( <b>11</b> ) et son isomère 22S, 23S ( <b>13</b> ) .....	113
6.2.4	Préparation de l'homobrassinolide ( <b>12</b> ) .....	115
6.3	Préparation des molécules présentées au chapitre IV.....	116
6.3.1	Préparation du (22E, 24S)-2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one ( <b>22</b> ) .....	116
6.3.2	Préparation du (22E, 24S)-2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one, 2,3-acétonide ( <b>24</b> ) .....	117
6.3.3	Préparation du 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -dihydroxy-6-oxo-5 $\alpha$ -stigmastan-22-al 2,3-acétonide ( <b>14</b> ).....	118

6.3.4	Préparation du (20S)-3 $\alpha$ -5-cyclo-6-oxo-5 $\alpha$ -pregnane-20-carboxaldéhyde ( <b>15</b> ) .....	120
6.3.5	Préparation du i-stigmastéryl méthyl éther ( <b>31</b> ) .....	121
6.3.6	Préparation du (20S)-3 $\alpha$ -5-cyclo-6 $\beta$ -méthoxy-5 $\alpha$ -pregnane-20-carboxaldéhyde ( <b>16</b> ) .....	122
6.3.7	Préparation du (20S, 22R)-22-hydroxy-6 $\beta$ -méthoxy-3 $\alpha$ ,5-cyclo-24-nor-5 $\alpha$ -cholan-23-al triméthylénedithioacétal ( <b>43a</b> ) .....	123
6.3.8	Préparation du (20S, 22R)-22-acétoxy-6 $\beta$ -méthoxy-3 $\alpha$ ,5-cyclo-24-nor-5 $\alpha$ -cholan-23-al triméthylénedithioacétal ( <b>46</b> ) .....	124
6.3.9	Préparation du (20S, 22R)-22-acétoxy-6 $\beta$ -méthoxy-3 $\alpha$ ,5-cyclo-24-nor-5 $\alpha$ -cholan-23-al ( <b>38</b> ) .....	125
6.3.10	Préparation du (20S, 22R)-22-acétoxy-6 $\beta$ -méthoxy-3 $\alpha$ , 5-cyclo-24-nor-5 $\alpha$ -cholan-23-ol ( <b>47</b> ) .....	126
6.3.11	Préparation du composé disubstitué <b>49</b> .....	127
6.3.12	3-(2-méthoxy-éthoxyméthoxy)-propène ( <b>53</b> ) .....	128
ANNEXE A		
	SPECTRES RMN $^1$ H .....	130
ANNEXE B		
	SPECTRES RMN $^{13}$ C .....	148
RÉFÉRENCES .....		160

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Neuropathologie de la maladie de Parkinson. (A) normale, (B) maladie de Parkinson, (C) neurones dopaminergiques de la SNpc .....	4
1.2 Réactions métaboliques typiques du stress oxydant .....	6
1.3 Exemple d'antioxydants exogènes.....	9
1.4 Ressemblances structurales entre le brassinolide, la testostérone, l'estradiol et la castastérone.....	10
1.5 Quelques différences structurelles des brassinostéroïdes.....	13
1.6 Les deux brassinostéroïdes disponibles commercialement.....	15
1.7 Brassinostéroïdes et précurseurs cibles de la famille des 29 carbones.....	16
1.8 Aldéhydes <b>14</b> , <b>15</b> et <b>16</b> désirés permettant de reconstruire les chaînes latérales des familles à 27 et 28 carbones.....	17
2.1 Les produits de départ les plus utilisés dans la synthèse de BRs.....	19
3.1 Aldéhydes <b>14</b> , <b>15</b> et <b>16</b> désirés permettant de reconstruire les chaînes latérales des familles à 27 et 28 carbones .....	52
3.2 Plan de rétrosynthèse de l'aldéhyde <b>14</b> .....	53
3.3 Hypothèse sur la sélectivité en C-2, C-3 lors de la dihydroxylation du diène <b>21</b> .....	55

3.4	Section entre 3,4 et 4,1 ppm du RMN $^1\text{H}$ 200 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) de <b>22</b> avant (gauche) et après recristallisation (droite) .....	57
3.5	Spectre RMN $^1\text{H}$ 200 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) du dioxolane <b>24</b> .....	59
3.6	Spectre RMN $^1\text{H}$ 200 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) de l'aldéhyde <b>14</b> .....	63
3.7	Plan de la synthèse de l'aldéhyde <b>15</b> .....	64
3.8	Spectre RMN $^1\text{H}$ 200 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) de l'aldéhyde <b>15</b> .....	66
3.9	Plan de synthèse de l'aldéhyde <b>16</b> .....	67
3.10	Possibilité d'attaque par un nucléophile en C-3 et en C-6 sur le cation allylcarbinyle.....	69
3.11	Spectre RMN $^1\text{H}$ 200 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) du i-stigmasteryl méthyl éther ( <b>31</b> ) .....	70
3.12	Spectre RMN $^1\text{H}$ 200 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) de l'aldéhyde <b>16</b> .....	72
4.1	Plan de la synthèse la chaîne latérale des BRs de la famille des 28 carbones .....	77
4.2	Stéréochimie de l'addition de l'anion du dithiane .....	79
4.3	Spectre RMN $^1\text{H}$ 200 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) du diothioacétal <b>43a</b> .....	80
4.4	Spectre RMN $^1\text{H}$ 200 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) de <b>46</b> .....	83
4.5	Spectre RMN $^1\text{H}$ 200 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) de l'aldéhyde <b>38</b> .....	85
4.6	État de transition cyclique d'un aldéhyde avec l'allylstannane sans présence d'acide de Lewis .....	87
4.7	État de transition non cyclique de l'addition d'un groupement crotyle (E et Z) sur un aldéhyde en présence d'un acide de Lewis (A.L.) .....	87

4.8	États de transitions théoriques de l'alkylation de l'aldéhyde <u>38</u> menant à <u>36</u> .....	89
4.9	Spectre RMN $^1\text{H}$ 200 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) de l'alcool <u>47</u> .....	91
4.10	Spectre RMN $^1\text{H}$ 200 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) du composé diadduit <u>49</u> .....	94
4.11	Produit <u>48b</u> attendu en utilisant 1,05 éq d'allyltributylstannane et $\text{BF}_3\text{OEt}_2$ comme acide de Lewis .....	95
4.12	Plan de la synthèse de la chaîne latérale des BRs de la famille des 27 carbones .....	96
4.13	Types d'allylboranes .....	97
4.14	Mécanisme de l'allylboration énantiomérisélective à partir d'un allylborane E ...	99
4.15	Les allylboranes chiraux de Brown .....	100

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Dérivés réactifs de l'oxygène et leurs antioxydants endogènes correspondants .....	8
3.1 Dihydroxylation asymétrique du diène <u>23</u> menant au diol <u>22</u> .....	56
3.2 Protection de diol <u>22</u> sous forme de dioxolane <u>24</u> .....	58
3.3 Dihydroxylation du dioxolane <u>24</u> menant au composé <u>21</u> .....	60
3.4 Comparaison entre l'ozonolyse et le clivage oxydatif.....	71
4.1 Réactivité du dithiane avec l'aldéhyde <u>16</u> .....	79
4.2 Protection de la fonction hydroxyle du dithioacétal <u>53a</u> .....	81
4.3 Déthioacétalisation du dithioacétal protégé <u>46</u> .....	85
4.4 Réactivité de l'aldéhyde <u>38</u> avec d'allylstannanes en utilisant différents acides de Lewis.....	92
4.5 Protection de l'alcool allylique menant à l'éther allylique <u>53</u> .....	101
4.6 Réactivité des aldéhydes <u>14</u> , <u>15</u> et <u>16</u> avec l'allylborane de Brown <u>42</u> .....	102

## LISTE DES SPECTRES

Spectre	Page
A.1 (22E, 24S)-3 $\alpha$ , 5-cyclo-stigmast-22-en-6-one ( <b>30</b> ).....	130
A.2 (22E, 24S)-stigmasta-2,22-dién-6-one ( <b>23</b> ).....	131
A.3 22R, 23R-homocastastérone ( <b>11</b> ).....	132
A.4 22S, 22S-homocastastérone ( <b>13</b> ).....	133
A.5 22R-23R-homobrassinolide ( <b>12</b> ) .....	134
A.6 (22E, 24S)-2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one ( <b>22</b> ).....	135
A.7 (22E, 24S)-2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one, 2,3-acétonide ( <b>24</b> ).....	136
A.8 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -dihydroxy-6-oxo-5 $\alpha$ -stigmastan-22-al 2,3-acétonide ( <b>14</b> ) .....	137
A.9 (20S)-3 $\alpha$ -5-cyclo-6-oxo-5 $\alpha$ -pregnane-20-carboxaldéhyde ( <b>15</b> ).....	138
A.10 i-stigmasteryl méthyl éther ( <b>31</b> ).....	139
A.11 (20S)-3 $\alpha$ -5-cyclo-6 $\beta$ -méthoxy-5 $\alpha$ -pregnane-20-carboxaldéhyde ( <b>16</b> ) .....	140
A.12 (20S, 22R)-22-hydroxy-6 $\beta$ -méthoxy-3 $\alpha$ ,5-cyclo-24-nor-5 $\alpha$ -cholan-23-al triméthylènedithioacétal ( <b>43a</b> ) .....	141

A.13 (20S, 22R)-22-acétoxy-6 $\beta$ -méthoxy-3 $\alpha$ ,5-cyclo-24-nor-5 $\alpha$ -cholan-23-al triméthylènedithioacétal ( <b>46</b> ) .....	142
A.14 (20S, 22R)-22-acétoxy-6 $\beta$ -méthoxy-3 $\alpha$ ,5-cyclo-24-nor-5 $\alpha$ -cholan-23-al ( <b>38</b> ) .....	143
A.15 (20S, 22R)-22-acétoxy-6 $\beta$ -méthoxy-3 $\alpha$ , 5-cyclo-24-nor-5 $\alpha$ -cholan-23-ol ( <b>47</b> ) .....	144
A.16 Diadduit <b>49</b> .....	145
A.17 3-(2-méthoxy-éthoxyméthoxy)-propène ( <b>53</b> ) .....	146
B.1 22R, 23R-homocastastérone ( <b>11</b> ) .....	148
B.2 22S, 22S-homocastastérone ( <b>13</b> ) .....	149
B.3 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -dihydroxy-6-oxo-5 $\alpha$ -stigmastan-22-al 2,3-acétonide ( <b>14</b> ) .....	150
B.4 i-stigmasteryl méthyl éther ( <b>31</b> ) .....	151
B.5 (20S)-3 $\alpha$ -5-cyclo-6 $\beta$ -méthoxy-5 $\alpha$ -pregnane-20-carboxaldéhyde ( <b>16</b> ) .....	152
B.6 (20S, 22R)-22-hydroxy-6 $\beta$ -méthoxy-3 $\alpha$ ,5-cyclo-24-nor-5 $\alpha$ -cholan-23-al triméthylènedithioacétal ( <b>43a</b> ) .....	153
B.7 (20S, 22R)-22-acétoxy-6 $\beta$ -méthoxy-3 $\alpha$ ,5-cyclo-24-nor-5 $\alpha$ -cholan-23-al triméthylènedithioacétal ( <b>46</b> ) .....	154
B.9 (20S, 22R)-22-acétoxy-6 $\beta$ -méthoxy-3 $\alpha$ ,5-cyclo-24-nor-5 $\alpha$ -cholan-23-al ( <b>38</b> ) .....	155
B.10 (20S, 22R)-22-acétoxy-6 $\beta$ -méthoxy-3 $\alpha$ , 5-cyclo-24-nor-5 $\alpha$ -cholan-23-ol ( <b>47</b> ) .....	156
B.11 Diadduit <b>49</b> .....	157
B.12 3-(2-méthoxy-éthoxyméthoxy)-propène ( <b>53</b> ) .....	158

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

A.L.	Acide de Lewis
Ac	Acétone
ATP	Adénosine triphosphate
BaCO <sub>3</sub>	Carbonate de barium
BHE	Barrière hémato-encéphalique
Bz	Benzène
CAT	Catalase
CCM	Chromatographie sur couche mince
CHCl <sub>3</sub>	Chloroforme
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Dichlorométhane
CH(OMe) <sub>3</sub>	Triméthylorthoformate
CDCl <sub>3</sub>	Chloroforme deutéré
(CF <sub>3</sub> CO) <sub>2</sub> O	Anydride trifluoroacétique
CSA	Acide camphorsulfonique
CPG-SM	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
d	Doublet
DAT	Transporteur de la dopamine
dd	Doublet de doublet
DHQD	Hydroquinidine-4-chlorobenzoate
DMA	N,N-diméthylacétamide
DMF	Diméthylformamide
DMP	2,2-diméthoxypropane
d.s.	Diastéréosélection
ee	excès enantiomérique
EtOAc	Acétate d'éthyle
EtOH	Éthanol

GSH	Glutathion peroxydase
H <sub>2</sub>	Hydrogène moléculaire
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
H <sub>5</sub> IO <sub>6</sub>	Acide periodique
HBr	Bromure d'hydrogène
I <sub>2</sub>	Iode moléculaire
IR	Infrarouge
KIO <sub>4</sub>	periodate de potassium
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonate de potassium
K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	Hexacyanoferrate (III) de potassium
KHCO <sub>3</sub>	Hydrogénocarbonate de potassium
LD <sub>50</sub>	Dose létale 50
LDH	Lactate déshydrogénase
L-DOPA	Acide (S)-2-amino-3-(3,4-dihydroxyphényl)propanoïque
LiBr	Bromure de lithium
m	Multiplet
MCPBA	Acide 3-chloroperoxybenzoïque
MeOH	Méthanol
Me <sub>2</sub> S	Sulfure de diméthyle
MeSO <sub>4</sub> NH <sub>4</sub>	Méthanesulphonamide
MPP <sup>+</sup>	1-méthyl-4-phénylpyridinium
MsCl	Chlorure de méthanesulfonyle
n-BuLi	n-Butyllithium
N <sub>2</sub>	Azote gazeux
NaH	Hydrure de sodium
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonate de sodium
NaCl	Chlorure de sodium
NaIO <sub>4</sub>	Periodate de sodium
NBS	N-bromosuccinimide
NEt <sub>3</sub>	Triéthylamine
NGF	Facteur de croissance du nerf

NMO	N-Oxyde de N-méthylmorpholine
Nu	Nucléophile
O <sub>3</sub>	Ozone
OsO <sub>4</sub>	Tétroxyde d'osmium
Pd/C	Palladium sur charbon
ppm	Partie par million
Py	Pyridine
Py-HCl	Chlorhydrate de pyridine
p-TsOH	Acide p-toluenesulfonique
rdt	Rendement
Rf	Rapport frontal
RMN	Résonance magnétique nucléaire
DRO	Espèces oxygénées réactives
s	Singulet
sec-BuLi	Sec-Butyllithium
SEM	Erreur standard sur la moyenne
SMBR	Spectre de masse à basse résolution
SMHR	Spectre de masse à haute résolution
SNpc	Substantia nigra pars compacta
T <sub>éb</sub>	Température d'ébullition
T <sub>fus</sub>	Température de fusion
THF	Tétrahydrofurane
TMS	Groupement triméthylsilane
t.a.	Température ambiante

## LISTE DES SYMBOLES

°C	Degré Celsius
g	Gramme
Hz	Hertz
L	Litre
mg	Milligramme
mL	Millilitre
T	Température

## RÉSUMÉ

La maladie de Parkinson est une effroyable pathologie affectant plus de 130 000 canadiens. C'est la deuxième maladie neurodégénérative, après la maladie d'Alzheimer. Des études récentes montrent que de plus en plus d'indices semblent converger vers le stress oxydant comme un des facteurs responsables des processus complexes de cette neurodégénérescence. Certains antioxydants aptes à combattre ce stress oxydant pourraient s'avérer d'excellents neuroprotecteurs. De nombreuses études sur la capacité antioxydante de plusieurs stéroïdes de plantes et de diverses hormones dans des conditions de stress oxydant ont déjà été réalisées. Cependant, aucune étude de ce genre n'a été réalisée sur les brassinostéroïdes (BRs), des phytostérols présents dans plusieurs végétaux. L'étude du potentiel neuroprotecteur de ces molécules est pourtant fort intéressant car, d'une part, ce sont des stéroïdes de plantes dont certains membres sont déjà reconnus pour posséder l'activité recherchée et, d'autre part, parce qu'il serait possible de les intégrer à un régime alimentaire sain, étant donné qu'on les retrouve dans plusieurs végétaux du Québec. Un problème important se pose toutefois lorsque l'on veut étudier ces molécules, soit la question de leur obtention. L'extraction des brassinostéroïdes à partir de sources végétales est laborieuse et les quantités extraites sont souvent très faibles. Alors, la solution s'avère la synthèse. Au sein du laboratoire du Pr Benoit Daoust, M. Boisvert a été le premier à travailler sur ce projet. Il a réussi à synthétiser une variété de BRs de la famille des 29 carbones et leurs précurseurs. Ces derniers étaient aptes à contrer le stress oxydant causé par le MPP<sup>+</sup> (in vitro), une toxine reproduisant la neurodégénérescence caractéristique de la maladie de Parkinson. Ces résultats préliminaires encourageants, nous ont poussés à entreprendre la synthèse d'une plus grande variété de brassinostéroïdes. Nous espérons que la synthèse d'un plus grand nombre de brassinostéroïdes et que l'utilisation de tests biologiques plus poussés nous permettront de déterminer avec certitude si les brassinostéroïdes pourront un jour être utilisés dans la prévention de la maladie de Parkinson.

Mots clés : brassinostéroïdes, neuroprotection, synthèse asymétrique, maladie de Parkinson, chimie des stéroïdes.

## CHAPITRE I

### HISTORIQUE DE LA MALADIE DE PARKINSON ET INTRODUCTION AUX BRASSINOSTÉROÏDES

#### 1.1 Maladie de Parkinson

##### 1.1.1 Historique

En 1817, James Parkinson, un médecin anglais, publie une première description clinique d'une maladie qu'il appellera *paralysis agitans*<sup>(1)</sup>. Son ouvrage, *An Essay on the Shaking Palsy*, basé sur une description clinique des symptômes de six de ses patients, fut le premier écrit sur cette maladie. Cet ouvrage décrivait clairement et en détail le tremblement de repos caractéristique, la posture et la démarche anormale, la paralysie et la diminution de la force musculaire tous associés à la maladie de Parkinson, ainsi que l'évolution de cette maladie au fil du temps. James Parkinson espérait que son essai stimulerait les anatomistes et médecins de son époque à se pencher sur les questions des lésions pathologiques dans le cerveau. Il aura fallu attendre jusqu'en 1877 avec l'arrivée de Jean-Martin Charcot, considéré aujourd'hui comme le père de la neurologie, avant d'apercevoir des percées dans la compréhension de cette maladie. Il fit entre autres la distinction entre la rigidité, la faiblesse, la bradykinésie en plus de décrire certains symptômes additionnels de cette maladie. Il renomma la maladie lui donnant le nom de la maladie de Parkinson en l'hommage à James Parkinson<sup>(1)</sup>.

En 1912, Frederich Lewy introduit pour la première fois la notion qu'il appellera les corps de Lewy dans le noyau basal de Maynert, caractéristiques aux maladies dites neurodégénératives. Les corps de Lewy sont des dépôts anormaux de protéines dans les cellules du cerveau<sup>(1)</sup>. Konstantin Tretiakoff compléta, en 1919, la découverte de Lewy en rapportant que la *substantia nigra* est la principale partie du cerveau à être touchée chez les patients atteints de la maladie de Parkinson et que c'est à l'intérieur de cette partie que l'on peut observer ces corps de Lewy<sup>(1,2)</sup>.

La détermination de la voie biosynthétique impliquant la dopamine, un neurotransmetteur sécrété dans le *locus niger*, fut en grande partie réalisée grâce aux travaux d'Arvid Carlsson dans les années 50. Ses travaux ont essentiellement porté sur la détermination du rôle de la dopamine. Selon lui, le rôle de la dopamine n'était pas simplement d'être un précurseur de la norépinephrine. En 1959, il spécula lors du congrès international de pharmacologie que la dopamine serait en quelque sorte responsable de la maladie de Parkinson<sup>(3)</sup>.

Oleh Hornykiewicz publie en 1960 un article qui démontre pour la première fois une déplétion marquée de la dopamine dans le noyau caudé et le putamen des patients atteints par la maladie de Parkinson<sup>(3)</sup>. Six ans plus tard, il publie une revue majeure dans le domaine affirmant que la carence en dopamine est corrélée avec la plupart des symptômes touchant les fonctions motrices associées avec cette maladie<sup>(3)</sup>. Il considère la L-dopa (L-3,4-dihydroxyphénylalanine), un précurseur de la dopamine, comme traitement possible pour le Parkinson. Ce composé, une fois métabolisé en dopamine dans l'organisme, pourra venir combler la carence causée par la perte des neurones de la voie nigrostriée. Elle fut synthétisée pour la première fois en 1911 par Casimir Funk.

En 1967, George Cotzias fait une percée majeure dans la méthode d'administration de la L-Dopa qui est encore utilisée à nos jours. Il administrait de faibles doses du médicament à ses patients pour éviter les effets secondaires gastro-intestinaux, pour ensuite augmenter graduellement la dose quotidienne et éventuellement monter à

des concentrations plus élevées<sup>(3)</sup>. Les patients semblaient bien tolérer cette augmentation graduelle et commençaient à retrouver une qualité de vie suite à cette médication.

Bien que la découverte de la L-Dopa comme traitement contre la maladie de Parkinson fût révolutionnaire, la prise de cette médication d'une façon prolongée (plusieurs années) entraîna chez la plupart des patients le développement de mouvements involontaires nommés dyskinésie, qui sont difficiles à contrôler et altèrent de manière considérable leur qualité de vie<sup>(2)</sup>. Jusqu'à ce jour, la dyskinésie demeure un grand effet secondaire de cette médication.

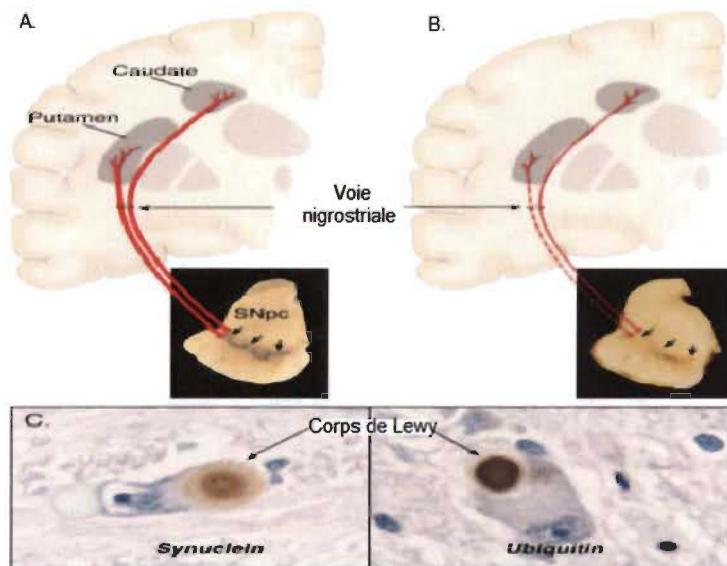
#### 1.1.2 La maladie

Selon les statistiques de santé Canada, près de 100 000 Canadiens étaient atteints de la maladie de Parkinson en 2003. Le taux de prévalence (nombre de personnes vivant avec la maladie à une période donnée) est de 100 à 200 pour 100 000 habitants, alors que le taux d'incidence (nombre de nouveaux cas diagnostiqués chaque année) s'élève à 10 à 20 pour 100 000 habitants. Quatre-vingt-cinq pour cent des cas diagnostiqués concerne des gens âgés de 65 ans et comme on prévoit que le pourcentage de la population appartenant à ce groupe d'âge s'accroîtra considérablement au cours des 30 prochaines années, passant de 11,6 % à 23,6 % de la population, l'incidence prévue de la maladie de Parkinson devrait croître de façon appréciable<sup>(4)</sup>.

La maladie de Parkinson est une neuropathologie progressive qui affecte principalement le mouvement volontaire et contrôlé<sup>(4)</sup>. Elle résulte, en premier lieu, en une perte de neurones dopaminergiques dans une partie du cerveau appelée le *substantia nigra pars compacta* (SNpc) qui mène à l'apparition de ces effets néfastes<sup>(2)</sup>. Elle se caractérise par plusieurs symptômes typiques<sup>(5)</sup> tels que la présence de tremblements involontaires au repos, une lenteur dans l'exécution de certains mouvements, l'apparition d'une certaine rigidité musculaire et peut même

entraîner certains problèmes dans la capacité du corps humain à maintenir une posture stable. Ces neurones sont responsables de la fabrication de la dopamine (un neurotransmetteur). La dopamine a plusieurs rôles à jouer dans l'organisme notamment dans l'exécution de mouvements de manière volontaire et dans le bon fonctionnement des fonctions cognitives du cerveau<sup>(5)</sup>.

La figure 1.1 (A) nous montre l'apparence de la voie normale nigrostriatal (en rouge). Elle est composée de neurones dopaminergiques dont les corps cellulaires sont situés dans le *substantia nigra pars compacta* (SNpc) et projette ses afférences vers le striatum qui innervent les neurones possédant les récepteurs dopaminergiques (putamen et caudate). Lors de l'apparition des symptômes reliés à la maladie de Parkinson, la dopamine du putamen est épuisée à 80 % et les neurones dopaminergiques de la SNpc à 60 % perdues<sup>(2)</sup> comme montré dans la figure 1.1 (B) par les neurones en pointillé rouge (voie nigrostriale). De plus, il est remarqué qu'il y a présence d'inclusion protéïnique intraneuronale appelée corps de Lewy (figure 1.1 (C)) dans les neurones dopaminergiques de la SNpc restantes<sup>(5)</sup>. Afin de pouvoir prévenir cette mort cellulaire, il faudrait comprendre comment elle se produit.



**Figure 1.1** Neuropathologie de la maladie de Parkinson. (A) normale, (B) maladie de Parkinson, (C) neurones dopaminergiques de la SNpc.

### 1.1.3 Hypothèses sur les causes de la mort des neurones dopaminergiques

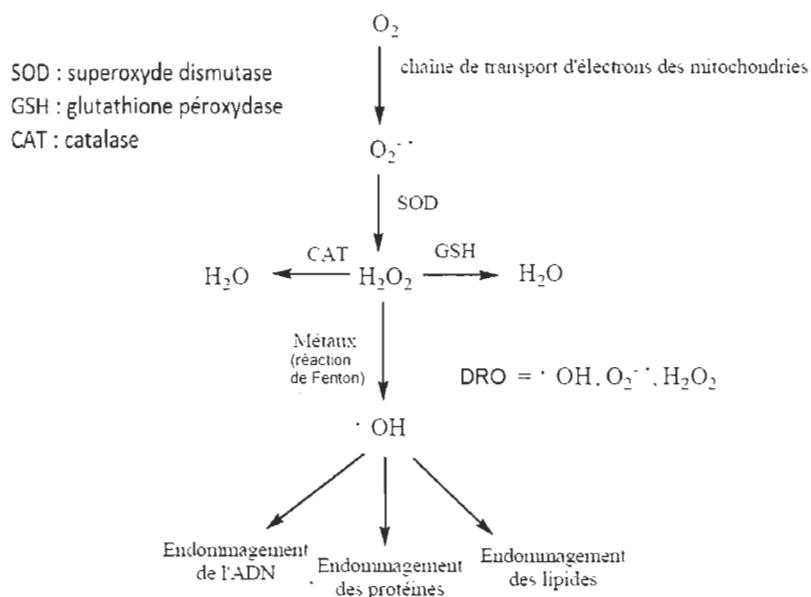
Jusqu'à présent, nous ignorons presque complètement comment commence et progresse la maladie de Parkinson. Des études neuropathologiques de la maladie de Parkinson liées à la neurodégénérescence suggèrent des indices possibles à la pathogenèse de la maladie. William Dauer et Serge Przedborski<sup>(2)</sup> résument très bien les trois grands facteurs qui pourraient être responsables de la perte des neurones dopaminergiques. Ainsi, la mortalité neuronale pourrait être causée soit par une défaillance de la respiration cellulaire au niveau des mitochondries, soit par des dommages cellulaires importants causés par le stress oxydant soit par l'agrégation anormale de protéines au niveau du cytoplasme des neurones. Notons aussi, toujours selon Dauer et Przedborski<sup>(2)</sup> que les 3 phénomènes sont toujours observés chez les sujets atteints de Parkinson. La grande question non élucidée est à savoir lequel (ou lesquels s'il y a lieu) déclenche l'apparition des autres processus de mortalité cellulaire. Bien qu'il existe plusieurs résultats expérimentaux prouvant que chacune des 3 hypothèses pourrait s'avérer exacte, nous n'examinerons que le cas du stress oxydant, car c'est ce phénomène sur lequel nos hypothèses de recherches se sont basées.

## 1.2 Stress oxydant : Dérivés réactifs de l'oxygène (DRO)

### 1.2.1 Définition

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre les processus biochimiques conduisant à la production dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) et ceux responsables de la suppression de ces DRO, dites des espèces antioxydantes<sup>(6)</sup>. Tous les organismes aérobiques produisent au moins un niveau minimal de DRO. La plupart de ces derniers provient de la production secondaire de l'ion superoxyde ( $O_2^{-\cdot}$ ) durant la réduction de molécules d'oxygène dans la mitochondrie<sup>(7)</sup>. Les études au cours des dernières décennies ont révélé l'implication généralisée du stress oxydant dans un certain nombre d'états pathologiques, notamment ceux qui

ont une incidence accrue avec l'âge<sup>(6)</sup> (exemples : Parkinson, Alzheimer, sclérose latérale amyotrophique). Le système nerveux central est particulièrement vulnérable face à ce stress oxydant, tenant compte du taux élevé d'utilisation de l'oxygène, la concentration relativement pauvre d'antioxydants classiques et de la haute teneur en lipides polyinsaturés qui sont vulnérables au DRO. Il est aussi vulnérable dû à une concentration élevée de métaux de transitions capables de catalyser la synthèse des DRO<sup>(6)</sup>. La figure 1.2 telle que présentée par Sayre<sup>(6)</sup> permet de mieux comprendre l'origine et les différents facteurs menant à la formation de DRO.



**Figure 1.2** Réactions métaboliques typiques du stress oxydant.

Toute la cascade d'évènements a pour origine les mitochondries. Près de 100 % de l'oxygène que nous respirons y est consommé dans les processus de respirations cellulaires afin de maintenir la survie de l'organisme. Cependant, il y aussi formation de DRO comme produits secondaires. La production mitochondriale de DRO survient en premier lieu par un radical anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) provenant d'une réaction secondaire lors de l'interception d'un électron par  $O_2$  dans la chaîne de transport d'électrons<sup>(6)</sup>. De plus,  $H_2O_2$ , produit par les oxydases telles que la superoxyde dismutase (SOD), peut entraîner une plus grande susceptibilité au

stress oxydant dans les tissus enrichis en ces enzymes<sup>(7)</sup>. Ce dernier, par la réaction de Fenton avec réduction des ions des métaux de transition (habituellement Fe(III) ou Cu(I)) peut être transformé en radical hydroxyle<sup>(6)</sup> ( $\cdot\text{OH}$ ). Ce radical est considéré comme le principal promoteur de dommages du stress oxydant en réagissant avec les biomacromolécules (ADN, protéines, lipides) de manière non discriminante (figure 1.2). Ces dénaturations sont généralement suffisantes pour engendrer la mortalité cellulaire. Il est toutefois à noter qu'en temps normal, les dommages causés par les DRO sont tenus en échec par une cascade antioxydante efficace, y compris les entités enzymatiques et non enzymatiques.

### 1.2.2 Antioxydants

Les antioxydants sont des composés riches en électrons, et donc peuvent en donner un ou plusieurs aux radicaux libres. En recevant cet électron, la réactivité de ce radical libre est neutralisée et le stress oxydant est interrompu. Les mécanismes de défense utilisant des antioxydants comprennent : i) l'élimination des espèces oxygénées réactives ou de leurs précurseurs, ii) l'inhibition de la formation de DRO, iii) la fixation d'ions métalliques nécessaires à la catalyse de la génération de DRO et iv) la régulation à la hausse des défenses antioxydantes endogènes<sup>(8)</sup>. Il existe deux catégories d'antioxydants : les antioxydants endogènes (produits par le corps) et les antioxydants exogènes (provenant de l'alimentation normale ou de suppléments alimentaires).

#### 1.2.2.1 Antioxydants endogènes

La cellule possède différentes enzymes permettant de réduire les agresseurs oxydants. La superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GSH) (figure 1.2) sont des enzymes antioxydantes, qui métabolisent les intermédiaires oxydants toxiques. Ils ont besoin de micronutriments comme cofacteurs tels que le sélénium, le fer, le cuivre, le zinc et le manganèse pour leur activité catalytique optimale et un mécanisme efficace de défense antioxydante<sup>(9)</sup>. Le

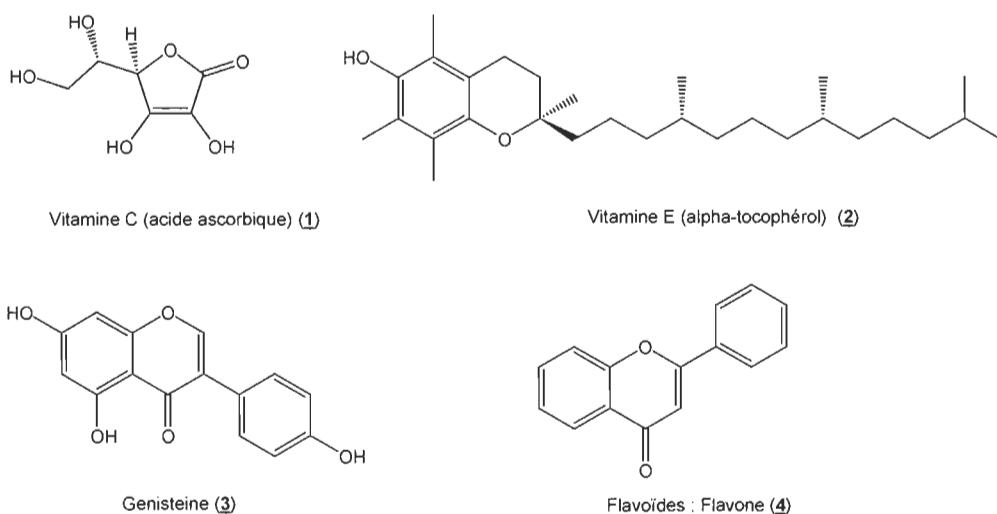
tableau 1.1 montre des exemples de plusieurs antioxydants endogènes réagissant de façon directe (trappeurs de radicaux libres) ou indirecte (ex. cofacteurs d'enzymes neutralisant des radicaux libres) afin de neutraliser les DRO. Malheureusement, ces derniers ne sont pas toujours suffisants afin de maintenir un équilibre adéquat pour l'élimination des DRO. Les antioxydants exogènes sont généralement nécessaires afin d'aider à neutraliser ce stress oxydant.

**Tableau 1.1**  
Dérivés réactifs de l'oxygène et leurs antioxydants endogènes correspondants

DRO	Antioxydants endogènes	
	Rôle direct	Rôle indirect
Radical hydroxyle	Glutathion peroxydase (cofacteur sélénium)	
Peroxyde lipidique	Glutathion peroxydase (cofacteur sélénium)	
Radical superoxyde	Superoxyde dismutase (cofacteur Cu/Zn/Mn)	Ceruloplasmine (cofacteur Cu) Metallothioneine (cofacteur Cu) Albumine (cofacteur Cu)
Peroxyde d'hydrogène	Catalase (cofacteur Fe)	Transferrine (cofacteur Fe) Ferritine (cofacteur Fe) Myoglobine (cofacteur Fe)
Pro-oxydant/ équilibre antioxydant	Thiols (GSH, acide lipoïque, N-acétyle cysteine) NADPH et NADH Ubiquinone	Bilirubine Acide urique

### 1.2.2.2 Antioxydants exogènes

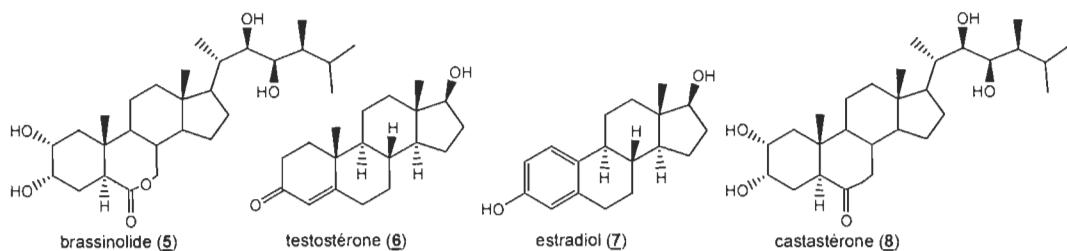
Lors des dernières années, les recherches sur les antioxydants naturels pour prévenir les maladies neurodégénératives se sont multipliées. Les vitamines C (1) et E (2) (figure 1.3) sont des antioxydants bien connus et largement utilisés pour traiter les patients<sup>(9)</sup>. Des études cliniques et sur des animaux suggèrent que la carence en vitamine E contribue à la neurodégénérence et l'apparition ou la progression de la maladie de Parkinson<sup>(10)</sup>. La vitamine C, quant à elle, est considérée comme le plus important antioxydant hydrosoluble dans les liquides extracellulaires, puisqu'il est capable de neutraliser les DRO dans la phase aqueuse avant que la peroxydation lipidique soit initiée<sup>(9)</sup>. La bêta-carotène et d'autres caroténoïdes ont aussi démontré une protection antioxydante aux tissus riches en lipides<sup>(9)</sup>. Un certain nombre d'autres antioxydants alimentaires existent au-delà des vitamines dites traditionnelles. La génisteine (3), les flavonoïdes (4) et les polyphénols du thé vert en sont des exemples<sup>(10)</sup>.



**Figure 1.3** Exemple d'antioxydants exogènes.

Certains chercheurs<sup>(11,12)</sup> ont même déjà démontré que certains estrogènes (hormones stéroïdiennes femelles) agissent en tant que neuroprotecteur dans des conditions de stress oxydant. De plus, il est aussi connu<sup>(13)</sup> que plusieurs stéroïdes

de plantes (phytostérols) sont efficaces pour neutraliser les radicaux libres, notamment les brassinostéroïdes. Ces derniers sont reconnus pour leurs potentiels antioxydants chez les plantes. Il a été démontré qu'ils induisent des réponses antioxydantes dans les tomates sous des conditions de stress. En 2000, une étude clinique<sup>(14)</sup> a été effectuée mettant en comparaison un groupe de patients atteints de la maladie de Parkinson prenant la L-dopa et un groupe mangeant la gourgane (*vicia faba*), qui est reconnue pour être riche en L-dopa. Cette étude a démontré que la consommation de *vicia faba* a un effet bénéfique chez les patients atteints de la maladie de Parkinson. Cependant, la concentration de L-dopa dans la gourgane ne serait pas suffisante pour expliquer l'amplitude des réponses observées. La *vicia faba* est une des plantes reconnues pour avoir le plus haut taux de concentration de brassinostéroïdes<sup>(15)</sup> (principalement le brassinolide (5)). C'est l'ensemble de ces indices qui nous ont poussés à concentrer nos efforts sur les brassinostéroïdes.



**Figure 1.4** Ressemblances structurales entre le brassinolide, la testostérone, l'estradiol et la castastérone.

### 1.3 Brassinostéroïdes

#### 1.3.1 Historique

La plupart des plantes possèdent la capacité de synthétiser une grande variété de stéroïdes. C'est Mitchell<sup>(16)</sup> qui fut le premier à étudier les brassinostéroïdes. En 1970, il réussit à isoler, grâce à une simple extraction à l'éther du pollen de *Brassica Napus L.*, un mélange de composés organiques aux propriétés surprenantes. À cause de leur origine, il donna le nom de « Brassins » aux mystérieux composants

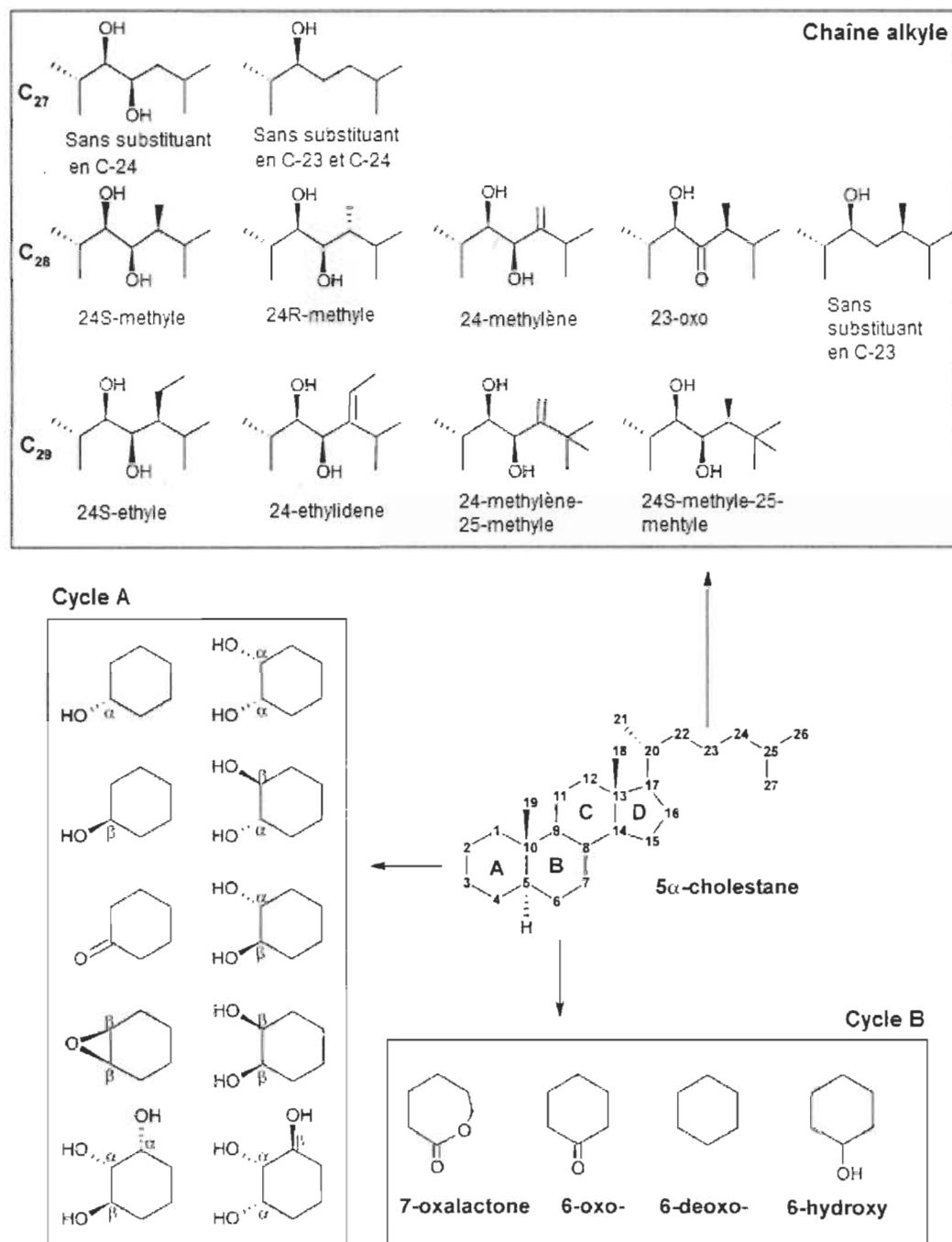
organiques du mélange. Pendant presque dix ans, les véritables structures des brassins de Mitchell sont demeurées indéterminées. Ce n'est qu'en 1979 que Grove<sup>(17)</sup> réussit à isoler et caractériser une nouvelle lactone stéroïdienne appelée brassinolide (5). Cette dernière fut récoltée du pollen de *Brassica Napus L.* qui avait été recueilli par les abeilles<sup>(15,18)</sup>. Trois ans plus tard, la castastérone (8), un précurseur biosynthétique du brassinolide, fut isolé par Yokata<sup>(19)</sup>.

Les brassinostéroïdes (BRs), molécules faisant partie de la famille des phytostérols, représentent la sixième classe d'hormones végétales s'inscrivant dans le grand règne végétal en plus des auxines, des gibberellines, des cytokinines, de l'acide abscissique et de l'éthylène<sup>(20)</sup>. Ces BRs sont des régulateurs de croissance des plantes, de la même façon dont les hormones de croissance aident aux développements du corps humain. Leurs effets physiologiques chez les plantes incluent des actions sur la balance hormonale, la synthèse de protéines et d'acides nucléiques, la croissance, et, plus intéressant encore, l'augmentation de la résistance à des facteurs environnementaux non favorables, au stress et aux maladies<sup>(15)</sup>. En 2007<sup>(21)</sup>, on dénombrait plus de 70 brassinostéroïdes isolés et caractérisés. Même si chacun des membres de cette grande famille est unique, il est toutefois possible d'obtenir un aperçu global de leurs différences structurales.

### 1.3.2 Caractéristiques structurales des brassinostéroïdes

Comme plusieurs autres stéroïdes les brassinostéroïdes sont classés en C<sub>27</sub>, C<sub>28</sub>, C<sub>29</sub> selon le nombre de carbones qu'ils possèdent (figure 1.5). Leurs différences se manifestent soit au niveau de la chaîne alkyle, soit au niveau du cycle A ou du cycle B<sup>(20)</sup>. Les variations sur les chaînes alkyles se retrouvent soit en C-23 (aucun groupement, un hydroxyle, ou un carbonyle), soit en C-24 (aucun groupement ou la présence d'éthyle, méthylène ou méthyle), soit en C-25 (t-Bu ou i-Pr) comme décrit dans la figure 1.5. De même, il existe plusieurs possibilités pour la configuration des alcools en C-2, C-3 et C-4 dans le cycle A. La figure 1.5 (cycle A) décrit la majorité de ces différences. En ce qui concerne l'oxydation du cycle B, les types de BRs sont

divisés en 7-oxalactone, 6-oxo, 6-désoxy (non oxydé) et 6-hydroxy. Yokota<sup>(23)</sup> démontra que les composés 6-oxo, en particulier, sont en réalité les précurseurs des lactones à 7 membres. Il prouva entre autres que la biosynthèse de telles molécules passe par une oxydation de type Baeyer-Villiger de façon à réaliser l'expansion de cycle. Même si ces cétones peuvent être considérées comme des précurseurs des brassinostéroïdes, il est généralement admis<sup>(22,23)</sup> qu'elles font tout de même partie de la famille des brassinostéroïdes, car d'une part elles possèdent la capacité d'accélérer la croissance des plantes et d'autres parts peuvent être isolées des plantes de la même manière que les brassinostéroïdes « classiques ». Un raisonnement identique s'applique aux dérivés 6-désoxy ne possédant pas de groupement carbonyle en C-6. Maintenant que nous connaissons les différentes structures possibles de ces composés, il serait approprié de connaître leurs champs d'application.



**Figure 1.5** Quelques différences structurelles des brassinostéroïdes.

### 1.3.3 Propriétés et applications des brassinostéroïdes

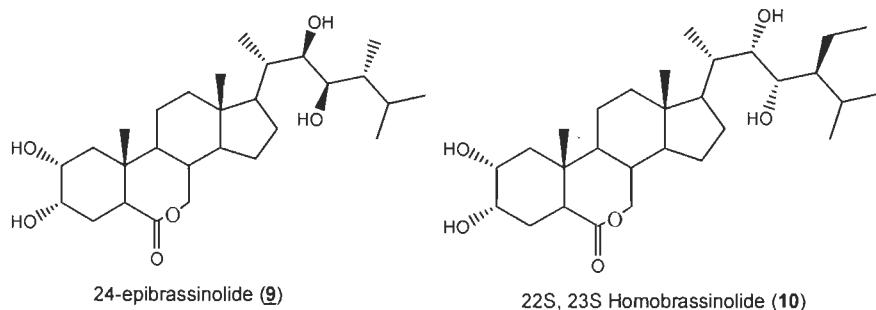
Depuis la découverte des brassinostéroïdes, plus de 2000 articles ont été publiés sur divers aspects de la recherche qui se fait sur ces composés. Durant les dernières décennies, les chercheurs ont réussi à démontrer le caractère hormonal surprenant des brassinostéroïdes en plus d'avoir mis au point, en détail, plusieurs modèles afin de prédire leur bioréactivité chez les plantes. Des études ont été aussi réalisées sur diverses autres propriétés des brassinostéroïdes, notamment leur capacité à stimuler la photosynthèse<sup>(24,25)</sup>. Ces hormones furent étudiées très largement dans le contexte de l'agroalimentaire, cependant très peu d'études ont été réalisées sur leur effet potentiel chez les mammifères. Quelques rares études ont démontré leurs propriétés anti-prolifératives<sup>(26-28)</sup> sur des cellules cancéreuses humaines ainsi que leur activité anti-virale<sup>(29-31)</sup>. Une de leurs propriétés fut particulièrement étudiée avec précision, soit leur non-toxicité. En effet, les chercheurs de la compagnie japonaise Nippon Kayaku<sup>(23)</sup> ont démontré que la LD<sub>50</sub> du 24-épibrassinolide chez la souris est de plus de 1,000 mg/kg ce qui en fait un composé très peu toxique. Ceci ouvre donc la porte à la réalisation de différentes études sur ces composés forts intéressants chez les mammifères.

Les résultats de nos recherches<sup>(32,33)</sup> suggèrent que les brassinostéroïdes ont des propriétés antioxydantes et anti-apoptotiques, et qu'ils jouent un rôle neuroprotecteur des neurones de mammifères en culture. À notre connaissance, nous sommes les premiers à étudier ces propriétés des brassinostéroïdes. Maintenant que nos hypothèses et leurs racines ont été bien définies, on se doit de formuler clairement les objectifs de notre projet de recherche.

## 1.4 Objectifs du projet de recherche

### 1.4.1 Premier objectif

À la section 1.3.1, nous avons rapporté que certains brassinostéroïdes se retrouvent dans le pollen de certaines plantes. Cependant, ils peuvent aussi se trouver dans plusieurs autres parties de la plante comme les feuilles et même dans les tissus végétaux. Cependant, un problème de taille se présente lorsque nous voulons obtenir ces molécules. Tout d'abord, seulement deux molécules sont facilement disponibles commercialement soit le 24-épibrassinolide (**9**) et le 22S, 23S-homobrassinolide (**10**) (figure 1.6).

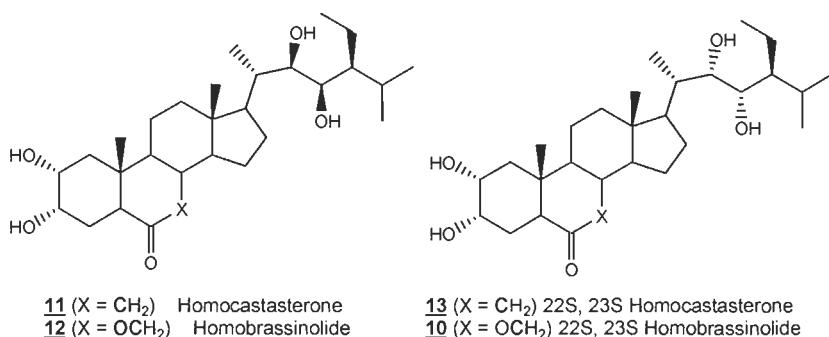


**Figure 1.6** Les deux brassinostéroïdes disponibles commercialement.

De plus, comme les expérimentations de Mitchell<sup>(16)</sup> et Grove<sup>(17)</sup> l'ont démontré, la concentration effective des brassinostéroïdes dans les plantes est relativement faible. Plus précisément, les valeurs se situent généralement entre 0,0001 µg à 6700 µg de brassinostéroïdes par kg de plante selon Bajguz<sup>(20)</sup>. Notons aussi que les procédures de purifications connues<sup>(34)</sup> à partir d'extraits de plantes sont relativement longues et laborieuses. Le meilleur moyen d'obtenir ces molécules est donc d'en réaliser leurs synthèses (ou hémisynthèse).

Ce projet de recherche a pour premier objectif la synthèse de deux brassinostéroïdes naturels (**11** et **12**) et leur isomère non naturel (**13** et **10**) de la famille des 29 carbones (figure 1.7). Nous allons également tenter d'optimiser les

rendements globaux existants dans la littérature quant à la synthèse de ces derniers. Finalement, le potentiel neuroprotecteur de ces brassinostéroïdes et de leurs précurseurs préparés sera évalué *in vitro* avec un modèle toxicologique de la maladie de Parkinson. Nous pourrons ainsi vérifier le potentiel de nos molécules à combattre le stress oxydant engendré par une toxine reproduisant le plus possible la neurodégénérescence caractéristique du Parkinson. Nous avons décidé de commencer par cette famille puisque celle-ci représente une suite logique des travaux antérieurs effectués dans notre laboratoire<sup>(35)</sup>.

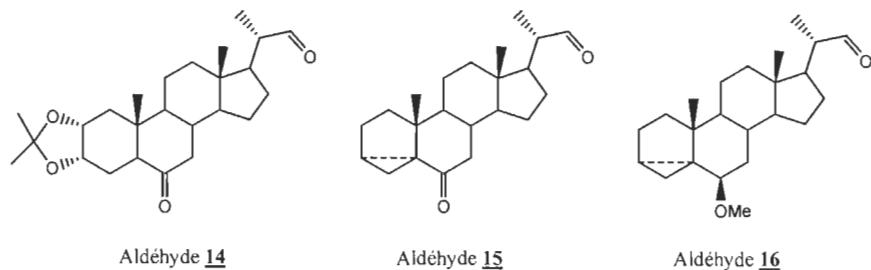


**Figure 1.7** Brassinostéroïdes et précurseurs cibles de la famille des 29 carbones.

#### 1.4.2 Second objectif

Les BRs des familles à 27 et 28 carbones représentent les familles les plus abondantes et les plus diversifiées chez les plantes. Malheureusement, ils sont aussi les plus difficiles à préparer. La difficulté de la synthèse de ces composés réside dans la préparation de la chaîne dihydroxylée de façon stéréosélective. Cette chaîne comporte entre 8 et 10 carbones et possède 4 centres asymétriques contigus. Dans cet ordre d'idée, le second objectif de ce projet de recherche sera de tenter de reconstruire les chaînes latérales des BRs de la famille des 27 et 28 carbones à l'aide de la chimie des métaux allyliques. Pour ce faire, nous avons décidé de préparer les aldéhydes **14**, **15** et **16** possédant un aldéhyde sur le carbone 22 ayant des niveaux de fonctionnalité différente des cycles A et B (figure 1.8). Ces derniers

nous permettront d'ajouter différents nucléophiles carbonés afin de reconstruire la chaîne alkyle appropriée pour ces familles.



**Figure 1.8** Aldéhydes 14, 15 et 16 désirés permettant de reconstruire les chaînes latérales des familles à 27 et 28 carbones.

La synthèse comporte aussi un atout important, soit la possibilité de tester l'activité de neuroprotection des intermédiaires synthétiques au fur et à mesure que les fonctions seront ajoutées. Ainsi, il sera possible de cibler laquelle de leurs fonctions contribue à l'activité biologique recherchée. Comme nous le verrons dans les chapitres II, III et IV, plusieurs chimistes ont déjà travaillé à la synthèse de ces produits naturels complexes, ainsi que leurs précurseurs, ce qui nous fournira une aide précieuse dans la préparation de ces hormones de plantes particulières.

## CHAPITRE II

### SYNTHÈSE DES BRASSINOSTÉROÏDES DE LA FAMILLE DES 29 CARBONES

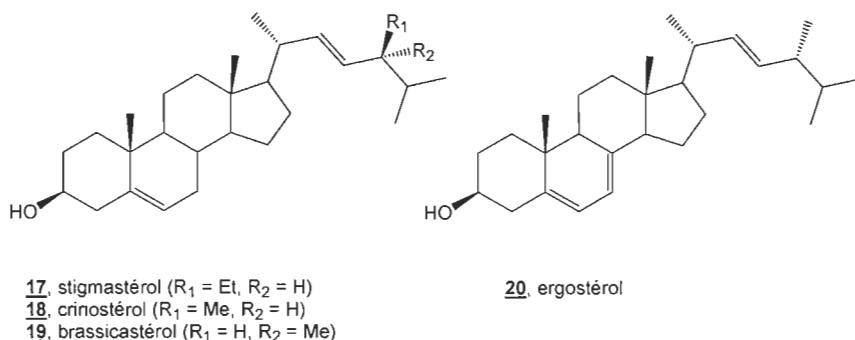
#### 2.1 Choix du produit de départ

Il existe deux approches conceptuellement différentes pour la synthèse des stéroïdes : la synthèse totale et la synthèse partielle (hémisynthèse). La première approche implique la synthèse de la molécule entière de stéroïdes à partir de précurseurs simples. La seconde approche repose sur la transformation d'un composé de départ qui possède déjà un fragment tétracylique spécifique aux stéroïdes.

Malgré le grand nombre de méthodes développées en chimie organique, la synthèse totale s'est avérée n'être abordable que pour la préparation de stéroïdes relativement simples. Cependant, cette approche est essentielle pour la recherche de nouveaux médicaments de type stéroïdien avec un squelette modifié. Cette dernière peut être aussi une opportunité pour l'élaboration de nouvelles méthodes de synthèse, mais elle est toutefois très rarement utilisée lors de la synthèse des BRs<sup>(12)</sup>.

En grande majorité, les BRs fabriqués par hémisynthèse impliquant l'introduction de groupes fonctionnels nécessaires sur le fragment tétracylique. Toutefois, le premier problème auquel nous faisons face est le choix de produit de départ. Il existe quelques règles à suivre quant au choix du produit de départ approprié.

Premièrement, il faudrait préférentiellement prendre un produit avec le même squelette carboné que le BR cible. En second lieu, il est important que le produit de départ ait des groupements fonctionnels qui puissent être transformés en des groupements caractéristiques des BRs. Finalement, une synthèse multiétape linéaire nécessite généralement une grande quantité de composé de départ. Le choix d'un produit facilement disponible et peu coûteux (si possible) devrait donc être pris en considération. Les produits de départ les plus utilisés<sup>(12)</sup> dans la synthèse de BRs sont présentés à la figure 2.1.



**Figure 2.1** Les produits de départ les plus utilisés dans la synthèse de BRs.

Ces composés de départ sont les plus appropriés pour l'hémisynthèse des BRs puisqu'ils possèdent une double liaison en C-22, C-23 permettant la dihydroxylation caractéristique importante des brassinostéroïdes. La présence de la double liaison donne également la possibilité de remplacer une partie de la chaîne latérale par un aldéhyde au carbone 22 (voir figure 1.8). Ce dernier permettra de reconstruire d'une manière stéréosélective la chaîne latérale appropriée pour l'obtention de BRs de la famille des 27 ou des 28 carbones désirés. Il serait intéressant de pouvoir commencer la synthèse des BRs de la famille des 28 carbones comme la castastérone (**8**) et le brassinolide (**5**) à partir du crinostérol (**18**) ou du brassicastérol (**19**), respectivement, puisque ces derniers possèdent le même squelette carboné que ces BRs. Cependant ces composés sont difficilement disponibles et très coûteux comparativement au stigmastérol (**17**) ou à l'ergostérol (**20**) (figure 2.1).

Nous venons ainsi de réduire nos possibilités de produit de départ à deux produits, soit le stigmastérol et l'ergostérol. Si nous comparons structurellement ces deux composés, nous pouvons constater que le stigmastérol possède déjà le même squelette carboné que les BRs de la famille des 29 carbones que nous voulons synthétiser, contrairement à l'ergostérol qui lui possède un squelette carboné des BRs à 28 carbones. De plus, la configuration du méthyle en C-24 n'est pas celle que nous désirons pour la synthèse de la castastérone (8) et le brassinolide (5). Finalement, la présence du diène en C-6, C-7 chez l'ergostérol (20) rend la transformation plus complexe. Pour toutes ces raisons, nous avons décidé de choisir le stigmastérol (17) comme produit de départ pour réaliser nos synthèses.

## 2.2 Article scientifique (Full paper)

### **Brassinosteroids and analogs as neuroprotectors: synthesis and structure-activity relationships**

**Jihane Ismaili, Martin Boisvert, Fanny Longpré, Julie Carange, Céline Le Gall,  
Maria-Grazia Martinoli and Benoit Daoust\***

Département de chimie-biologie, Groupe de recherche en neuroscience, Université du Québec à Trois-Rivières, 3351 boulevard des Forges, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7

\*benoit.daoust@uqtr.ca

**Keywords :** Brassinosteroids, Structure-activity relationship, Neuroprotection, MPP+, Dopaminergic cells, Parkinson's disease

**Steroids, 2012, 71, 91-99**

Received: August 4, 2011, Publised Online: Octobre 28, 2011.

Cet article de recherche porte sur la synthèse et la caractérisation de quelques brassinostéroïdes de la famille des 29 carbones (homocastastérone (**11**), homobrassinolide (**12**) et leurs précurseurs, ainsi qu'un brassinostéroïde non naturel (22S, 23S homocastastérone (**13**)). Ces derniers ont été utilisés afin de démontrer leur potentiel neuroprotecteur *in vitro* avec un modèle toxicologique de la maladie de Parkinson. Cet article montre également le travail d'optimisation effectué afin d'améliorer les rendements globaux existants dans la littérature quant à la synthèse de ces derniers. En conclusion, ce manuscrit nous permet de répondre au premier objectif de ce projet de recherche.

J'ai synthétisé et caractérisé 75 % des brassinostéroïdes et leurs précurseurs présentés dans cet article. J'ai également rédigé la partie expérimentale (chimique). Martin Boivert a synthétisé et caractérisé 25 % de ces composés. Fanny Longpré, Julie Carange et Céline Le Gall ont effectué les tests biologiques. Fanny Longpré (discussion partie biologique) et Pr Benoit Daoust (discussion partie chimique) ont rédigé l'article. Pr Maria-Grazia Martinoli a supervisé les tests biologiques.

Il est à noter que la numérotation des molécules présentée dans l'article ne suit pas la numérotation des molécules présentée dans ce mémoire.

**ABSTRACT**

We have demonstrated previously that the brassinosteroid (BR) 24-epibrassinolide exerts neuroprotective effects deriving from its antioxidative properties. In this study, we synthesized 2 natural BRs and 5 synthetic analogs and analyzed their neuroprotective actions in neuronal PC12 cells, against 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>), a neurotoxin known to induce oxidative stress and degenerescence of dopaminergic neurons characteristic of Parkinsonian brains. We also tested the neuroprotective potential of 2 commercially-available BRs. Our results disclosed that 6 of the 9 BRs and analogs tested protected neuronal PC12 cells against MPP<sup>+</sup> toxicity. In addition, our structure-activity study suggests that the steroid B-ring and lateral chain play an important role for their neuroprotective action.

## INTRODUCTION

BRs are highly oxygenated steroids isolated from several vegetables, including *Vicia faba* seeds and pollen [1-3]. To date, about 60 natural BRs have been identified, such as 24-epibrassinolide (**1**) and homocastasterone (**2a**) (Fig. 1), both oxygenated in positions 2, 3, 6, 22 and 23 [4]. Several BR non-natural analogs, such as 22S, 23S-homocastasterone (**2 b**) and 22S, 23S-homobrassinolide (**3**) (Fig. 1), have been synthesized [5,6]. Owing to their peculiar structural features, their extremely low abundance in natural sources and potent biological activity [7], BRs have been the subject of numerous synthetic efforts [5,6,8-10]. Their 4 contiguous chiral centers (C-20, C-22, C-23 and C-24) represent major challenges in the synthesis of these steroids. The methods developed by McMorris et al. [5], Mori et al. [6] and Brosa et al. [8] are especially efficient and versatile, allowing the swift preparation of a variety of 29-carbon BRs. All these protocols use stigmasterol as the starting product, and their synthetic scheme can be summarized in 2 main reaction sequences : i) transformation of the homoallylic alcohol functionality of stigmasterol into 2,3,6- and 3,6-oxygenated moieties, and ii) standard osmylation of the 22, 23-alkene, resulting in 22, 23-dihydroxylated steroidal side-chains.

BRs are being studied intensively to understand their role in plant metabolism. Their main physiological effects in plants include regulation of hormonal balance, activation of protein and nucleic acid synthesis, enzyme activity, growth promotion, and, most interestingly, increased resistance to unfavorable environmental factors, stress and diseases (for review see [7]). BRs have also been reported to exert anti-oxidative actions [11-17]. Exogenous application of natural BRs, such as 24-epibrassinolide (**1**), to plants enhances activities of the enzymatic antioxidants superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase, reducing lipid peroxidation [11-15]. Oral administration of homobrassinolide evokes anti-oxidative outcomes in mammals [16]. Recently, we determined that 24-epibrassinolide (**1**) modulates SOD, CAT and glutathione peroxidase (GPx) in mammalian cells [17].

Several neurodegenerative diseases, e.g. Parkinson's disease (PD), are associated with oxidative stress [18]. PD is characterized by the selective degeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons, resulting in dopamine (DA) depletion [19]. Numerous studies have demonstrated that, in *post mortem* samples of *substantia nigra pars compacta*, DAergic neurons exhibit markers of oxidative stress, such as lipid peroxidation, DNA oxidative damage, and carbonyl modifications of soluble proteins [20,21]. L-3,4-Dihydroxyphenylalanine (L-dopa), the amino acid precursor of DA, is nowadays the most effective symptomatic treatment of PD [22]. Clinical reports indicate that consumption of *Vicia faba* beans and seedlings, which contain L-dopa [23,24], has beneficial effects on PD patients [25,26]. However, the concentration of L-dopa in *Vicia faba* is not sufficient to explain the magnitude of the responses observed in PD patients [26]. Thus, it raises the possibility that other compounds in *Vicia faba* may complement the effect of L-dopa. It is known that *Vicia faba* contains BRs such as 24-epibrassinolide (**1**), castasterone and brassinolide [1-3]. Recently, we established that 24-epibrassinolide (**1**) is neuroprotective of nerve growth factor (NGF)-differentiated PC12 (neuronal) cells against MPP<sup>+</sup>-induced toxicity [17]. MPP<sup>+</sup> is the active metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), a toxin serving extensively to reproduce PD in animal models [27]. This neurotoxin is known to act as an *in vitro* and *in vivo* oxidant [28]. MPP<sup>+</sup> is selectively taken up by DAergic neurons via high-affinity DA transporters expressed in NGF-differentiated PC12 cells [29,30]. The neurotoxin is actively transported into mitochondria where it interferes with mitochondrial respiration through complex I inhibition [31-33]. It evokes elevated levels of reactive oxygen species (ROS) in MPP<sup>+</sup>-treated neuronal cells [34-36] and neuronal cell death by apoptosis [37,38]. We recently reported that 24-epibrassinolide (**1**) modulates SOD, CAT and GPx activities and reduces MPP<sup>+</sup>-induced apoptosis and intracellular ROS in neuronal PC12 cells [17].

The aim of the present investigation study was to evaluate the neuroprotective effects of natural BRs and synthetic analogs and provide new insights into their structure-activity relationships as neuroprotective molecules in a well-known *in vitro*

model of PD, NGF-differentiated PC12 cells [29,39]. We followed the protocol of Brosa et al. to prepare BRs for this study [8]. This strategy was particularly well-suited for our work since it allowed us to freely functionalize steroid A and B rings as well as C20-C29 side-chain. We were, therefore, able to synthesize 7 BRs with different levels of oxygenation. We demonstrated that some of these molecules were neuroprotective against MPP+-evoked toxicity. Structure-activity analysis revealed the importance of lateral chain and B ring functionalization for neuroprotection. We also noted that BR hydroxyl group configurations were not crucial for neuroprotection. Overall, our findings clearly indicate that BRs and analogs are new protective molecules against MPP+-induced toxicity. Therefore, they might be regarded as novel candidates to investigate the outcomes of complementary and/or preventive therapies in neurodegenerative diseases.

## EXPERIMENTAL

### 2.1. General

All reagents, including 24-epibrassinolide (**1**) and 22S, 23S-homobrassinolide (**3**), were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada) unless noted otherwise. All solvents (Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) were ACS-certified, distilled and dried prior to use. Reactions requiring anhydrous conditions were conducted under positive nitrogen atmosphere in oven-dried glassware, and reaction flasks were fitted with rubber septa for the introduction of substrates and reagents via standard syringe techniques. Flash chromatography was performed on Merck silica gel 60 on Siliaflash P60 (0.040-0.063 mm, Silicycle, Quebec, QC, Canada) under compressed air pressure. Analytical thin-layer chromatography (TLC) was carried out on pre-coated (0.25 mm) Merck silica gel F54 plates (VWR, Ville Mont-Royal, Qc, Canada) or on silica gel 60 (0.25 mm, Silicycle, Quebec, QC, Canada) and developed with an acid solution of ammonium phosphomolybdate.  $^1\text{H}$ -NMR spectra were recorded on a Varian 200 MHz NMR spectrometer with  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta$  = 7.26 ppm) as reference.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra were traced at 50.3 MHz with  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta$  = 77.1 ppm) as reference. For acetate **9**, NMR spectra were charted on a Varian 600-MHz spectrometer. The data reflect the following: chemical shift in ppm, multiplicity (d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, br = broad, dd = doublet of doublets, dt = doublet of triplets, td = triplet of doublets), number of protons, coupling constants in Hertz and assignation (if possible). IR spectra were recorded by Nicolet Impact 420 spectrophotometer. Low resolution mass spectra (LRMS) were recorded on an Agilent Technologies GC system 6890N and mass detector 5973 with helium as carrier gas. High resolution mass spectra (HRMS) were measured in the electrospray (ESI) mode on an HPLC 1200 system with a TOF 6210 detector from Agilent Technologies. Melting points (mp) were recorded on an Electrothermal apparatus and were uncorrected. If compounds were recrystallized prior to determination of their melting points, the re-crystallization solvent is indicated in brackets.

## 2.2. (22*E*, 24*S*)-3*α*,5-cyclo-stigmast-22-en-6-one (**5**)

Compound **5** was prepared in 3 steps from stigmasterol (**4**) according to Brosa's method [8]. Under N<sub>2</sub> atmosphere and anhydrous conditions, 5.25 g (12.1 mmol) of stigmasterol (**4**) 95% (Acros Organics, Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada) were dissolved in 60 mL of toluene. To this solution, 13.0 mL (93.1 mmol, 7.7 eq) of triethylamine were added with a syringe. The mixture was then cooled to 0 °C and 2.8 mL (36.1 mmol, 3.0 eq) of MeSO<sub>2</sub>Cl were included drop-wise over 10 min. After stirring at 0 °C for 1.5 h, the resulting yellow solution was diluted with water and extracted with toluene (3X). The organic layers were washed with saturated aq. NaHCO<sub>3</sub> (2X) and brine, then dried over MgSO<sub>4</sub>. Evaporation of the solvent provided 5.84 g (97%) of the mesylate. This step was repeated several times, and the yields obtained were 95-97%. <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR data on the crude compound were consistent with data in the literature [8].

4.30 g (8.78 mmol) of mesylate were suspended in 80 mL of water and 240 mL of acetone. 1.09 g (13.2 mmol, 1.2 eq) of KHCO<sub>3</sub> was then added and the suspension was heated under reflux for 6 h to achieve i-sterol rearrangement. The solution was allowed to reach room temperature and extracted with EtOAc (3X). The organic layers were washed with water, saturated aq. NaHCO<sub>3</sub> and brine, then dried over MgSO<sub>4</sub>. Evaporation of the solvent provided 3.34 g (93%) of yellow oil. This step was repeated several times and the yields obtained were 87-93%. Note that the <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR data on the crude compound were consistent with data in the literature [8].

3.16 g (7.65 mmol) of crude alcohol were dissolved in 80 mL of acetone. The solution was stirred and cooled to 0 °C in an ice bath. Jones reagent (8N-CrO<sub>3</sub>: 5.33 g of CrO<sub>3</sub> were dissolved in 4.4 mL of concentrate H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, then water was added to obtain a 20 mL solution) was included dropwise until the mixture became reddish (~ 3 mL). The reaction was stirred at 0 °C for 5 min. and the solvent was removed under reduced pressure. The green residue was diluted with water and extracted with EtOAc (3X). The organic layers were combined, washed with

saturated aq.  $\text{NaHCO}_3$  (2X) and brine, then dried over  $\text{MgSO}_4$ . Evaporation of the solvent provided 2.82 g (83%) of pure **5**. This step was repeated several times, and the yields obtained were 78-83%. **mp** lit. 98-99  $^{\circ}\text{C}$  [8] exp. (EtOH) 95-97  $^{\circ}\text{C}$ .  **$^1\text{H-NMR}$**  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 5.16 (dd, 1H,  $J=8$  and 15 Hz, H-22), 5.08 (dd, 1H,  $J=8$  and 15 Hz, H-23), 2.42 (1H, dd,  $J=8$  and 14 Hz, H-7 $\alpha$ ), 2.10-1.10 (m, 25H), 1.03 (s, 3H, H-19), 1.02 (d, 3H,  $J=6$  Hz, H-21), 0.98-0.78 (m, 9H), 0.73 (s, 3H, H-18).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 210.1 (C-6), 138.3 (C-22), 129.7 (C-23), 57.7, 56.1, 51.5, 47.0, 46.5, 46.3, 45.0, 42.8, 40.7, 39.8, 35.6, 35.0, 33.7, 32.1, 29.1, 26.1, 25.6, 24.4, 23.1, 21.4, 21.3, 19.9, 19.2, 12.5, 12.4, 11.9. **IR** (KBr,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ )) 2943, 2856, 1685, 1478, 1369, 1298, 1167, 966, 922. **LRMS** ( $m/z$ , relative intensity) 410 ( $\text{M}^+$ ) (100), 392 (10), 367 (70), 298 (70), 271 (75). Note that  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C-NMR}$  data on this compound were consistent with data in the literature [8].

### 2.3. (22*E*, 24*S*)-*stigmasta*-2,22-dien-6-one (**6**)

Under inert atmosphere, a mixture of pentacyclic ketone **5** (4.88 g, 11.87 mmol), pyridinium chloride (0.51 g, 5.94 mmol, 0.50 eq), dry LiBr (0.69 g, 5.94 mmol, 0.50 eq) and dimethylacetamide (DMA, 50 mL) was heated under reflux conditions for 4 h. The reaction was then cooled to 0  $^{\circ}\text{C}$  to initiate crystallization. The pure product was collected by filtration. The filtrate was also cooled to 0  $^{\circ}\text{C}$  to induce further crystallization, and the product was again filtered. This step was repeated 2 more times until no crystallization was apparent. 4.67 g (96%) of pure **6** was obtained. **mp** lit. 110-111  $^{\circ}\text{C}$  [8] exp. (EtOH) 111-112  $^{\circ}\text{C}$ .  **$^1\text{H-NMR}$**  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 5.66-5.58 (m, 2H, H-2 and H-3), 5.13 (dd, 1H,  $J=8$  and 15 Hz, H-22), 5.07 (dd, 1H,  $J=8$  and 15 Hz, H-23), 2.40-1.20 (m, 26 H), 1.04 (d, 1H,  $J=7$  Hz, H-21), 1.02-0.80 (m, 9H), 0.71 (s, 3H, H-19), 0.69 (s, 3H, H-18).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 212.4 (C-6), 138.3 (C-22), 129.8 (C-23), 125.2 and 124.8 (C-2 and C-3), 57.1, 56.1, 54.1, 53.7, 51.5, 47.3, 42.9, 40.7, 40.3, 39.6, 37.9, 32.1, 29.0, 25.6, 24.2, 22.0, 21.4, 21.3, 19.2, 13.7, 12.5, 12.4. **IR** (KBr,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ )) 2961, 2863, 1710, 1460, 1389, 965. **LRMS** ( $m/z$ , relative intensity) 410 ( $\text{M}^+$ ) (100), 395 (80), 367 (25), 297

(25), 269 (30). Note that the <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR data on this purified compound were consistent with data in the literature [5,8].

#### 2.4. General procedure for preparation of compounds **2a** and **2b**

0.62 g (1.52 mmol) of diène **6** was dissolved in 30 mL of t-BuOH/H<sub>2</sub>O (1:1). To this solution was added 1.26 g (9.10 mmol, 6.00 eq) of K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 3.00 g (9.10 mmol, 6.00 eq) of K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 0.14 g (0.30 mmol, 0.20 eq) of dihydroquinidine-4-chlorobenzoate (DHQD), 0.29 g (3.00 mmol, 2.00 eq) of methanesulfonamide and 0.60 mL (0.06 mmol, 0.04 eq) of a 2.5% OsO<sub>4</sub> solution in *t*-butanol. The mixture was stirred at room temperature for 6 days. 1.20 g of NaHSO<sub>3</sub> was then added and the reaction was stirred for another 18 h at room temperature. t-BuOH was removed under reduced pressure, and the residue was extracted with EtOAc (6X). Combined organic layers were washed with water, 0.25 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3X) and brine, then dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel CH<sub>3</sub>Cl/EtOH (0 → 6%) to provide the 2 desired compounds, **2a** and **2b**.

##### 2.4.1. (22*R*, 23*R*)-homocastasterone (**2a**)

81.9 mg (13.4%). TLC: CHCl<sub>3</sub>/EtOH (9:1) R<sub>f</sub>=0.21. **mp** lit. 227-230 °C [40] exp. 223-225 °C. **<sup>1</sup>H-NMR** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 4.05 (m, 1H, H-3), 3.66-3.82 (m, 2H), 3.59 (d, 1H, J=9 Hz), 2.69 (dd, 1H, J=3.5 and 12.5 Hz, H-5), 2.3 (dd, 1H, J=4.3 and 12.9 Hz), 0.9-2.2 (m), 0.76 (s, 3H, H-19), 0.68 (s, 3H, H-18). **<sup>13</sup>C-NMR** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 211.9 (C-6), 74.5 and 72.7 (C-22 and C-23), 68.4 and 68.3 (C-2 and C-3), 56.5, 53.6, 52.5, 50.7, 46.7, 46.3, 42.8, 42.6, 40.2, 39.4, 37.7, 36.9, 30.9, 28.8, 27.6, 26.3, 23.8, 21.2, 19.4, 18.8, 13.6, 13.4, 11.9, 11.9. **IR** (neat, ν (cm<sup>-1</sup>)) 3493, 3447, 2965, 2940, 2862, 1699. **HRMS** calculated for C<sub>29</sub>H<sub>51</sub>O<sub>5</sub> (MH<sup>+</sup>): 479.3737; found 479.3723. Note that the <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR data on this purified compound were consistent with data in the literature [5].

#### 2.4.2. (22S, 23S)-homocastasterone (**2b**)

71.2 mg (11.5%). TLC:  $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$  (9:1)  $R_f$ =0.29. **mp** lit. 204-207 °C [5] exp. 206-208 °C. **<sup>1</sup>H-NMR** (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 4.05 (m, 1H, H-3), 3.72-3.82 (m, 1H), 3.58-3.62 (m, 2H, H-22 and H-23), 2.68 (dd, 1H,  $J$ =3.5 and 12.5 Hz, H-5), 2.3 (dd, 1H,  $J$ =4.3 and 12.9 Hz), 0.9-2.2 (m), 0.76 (s, 3H, H-19), 0.70 (s, 3H, H-18). **<sup>13</sup>C-NMR** (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 211.9 (C-6), 72.2 and 70.6 (C-22 and C-23), 68.4 and 68.3 (C-2 and C-3), 56.3, 53.7, 52.6, 50.7, 49.6, 46.7, 43.5, 42.5, 42.3, 40.2, 39.4, 37.6, 27.8, 26.9, 26.3, 24.2, 21.7, 21.2, 18.6, 17.7, 14.5, 14.1, 13.5, 11.9. **IR** (neat,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>)) 3361, 2948, 2869, 1713. **HRMS** calculated for  $\text{C}_{29}\text{H}_{51}\text{O}_5$  ( $\text{MH}^+$ ): 479.3737; found 479.3723. Note that the <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C- NMR data on this purified compound were consistent with data in the literature [5].

#### 2.5. (22E, 24S)-2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -stigmast-22-en-6-one (**7**)

0.25 g (0.61 mmol) of diène **6** was suspended in 7.5 mL of acetone/water (9:1) containing 0.18 g (1.52 mmol, 2.50 eq) of 4-methylmorpholine N-oxide (NMO). After the addition of 0.20 mL of a 2.5%  $\text{OsO}_4$  solution in t-butanol (0.02 mmol, 0.03 eq), the suspension was stirred at room temperature for 12 h. Solid sodium bisulfite was then added in excess to destroy the remaining  $\text{OsO}_4$  and stirred at room temperature for 5 h. The resulting mixture was diluted with water and extracted with  $\text{EtOAc}$  (3X). The organic layers were washed successively with 5%  $\text{NaHSO}_3$  (2X), saturated aq.  $\text{NaHCO}_3$  (2X) and brine (2X), then dried over  $\text{MgSO}_4$ . Evaporation of the solvent gave 217 mg of a yellow solid which was first purified by flash chromatography on silica gel ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  2%) and then recrystallized from  $\text{EtOH}$  to obtain 160 mg of pure **7** (60%) as white filaments. **mp** lit. 238-240 °C [41] exp. ( $\text{EtOH}$ ) 237-239 °C. **<sup>1</sup>H-NMR** (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 5.13 (dd, 1H,  $J$ =8 and 15 Hz, H-22), 5.07 (dd, 1H,  $J$ =8 and 15 Hz, H-23), 4.04 (m, 1H, H-3 $\beta$ ), 3.75 (m, 1H, H-2 $\beta$ ), 2.65 (dd, 1H,  $J$ =3 and 13 Hz, H-5), 2.31 (dd, 1H,  $J$ =4 and 13 Hz), 2.20-1.10 (m, 24H), 1.03 (d, 3H,  $J$ =6 Hz, H-21), 0.74-0.86 (m, 9H), 0.75 (s, 3H, H-19), 0.68 (s, 3H, H-18). **<sup>13</sup>C-NMR** (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 212.3 (C-6), 138.2 (C-22), 129.9 (C-23), 68.6 and 68.5 (C-2 and

C-3), 57.0, 56.1, 54.0, 51.5, 50.9, 47.0, 43.1, 42.8, 40.6, 40.5, 39.6, 37.9, 32.1, 28.9, 26.5, 25.6, 24.2, 21.4, 21.3, 19.2, 13.8, 12.5. **IR** (KBr,  $\nu$  (cm $^{-1}$ )) 3384, 2954, 2856, 1712, 1451, 1374, 1048, 966. **LRMS** (*m/z* relative intensity) (TMS derivative) 573 (M $^+$ -CH $_3$ ) (30), 498 (15), 471 (100), 382 (30). **HRMS** calculated for C<sub>29</sub>H<sub>49</sub>O<sub>3</sub> (MH $^+$ ): 445.3682; found 445.3676. Note that the <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C- NMR data on this purified compound were consistent with data in the literature [41].

## 2.6. *Homobrassinolide (8)*

A solution of homocastasterone **2a** (0.106 g, 0.22 mmol) in CHCl<sub>3</sub> (10 mL) was added drop-wise to a stirred solution of peroxytrifluoroacetic acid (0.22 mmol, 10 eq) [prepared from 30% aq. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.26 mL, 0.22 mmol) and (CF<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O (1.58 mL, 1.85 mmol, 5 eq) in CHCl<sub>3</sub> (5 mL) at 0 °C]. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h, diluted with CHCl<sub>3</sub> (10 mL), and the resulting solution was washed with H<sub>2</sub>O, saturated aq. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2X), saturated NaHSO<sub>3</sub> (2X) and brine, then dried over MgSO<sub>4</sub>. Evaporation of the solvent gave a colourless solid which was recrystallized from EtOAc to obtain 22R,23R-homobrassinolide **8** (70 mg, 65%) **mp** lit. 249-251 °C [40] exp. (EtOH) 245-247 °C. **<sup>1</sup>H-NMR** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 4.05 (m, 3H), 3.71 (m, 2H), 3.57 (d, 1H,  $J$ =8.6 Hz), 3.12 (dd, 1H,  $J$ =5.1 and 12.1 Hz), 0.87-2.2 (m), 0.71 (s, 3H, H-18). **<sup>13</sup>C-NMR** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm) 176.2 (C-6), 74.4 and 72.8 (C-22 and C-23), 70.4 and 68.1 (C2 and C-3), 68.1 (C-7), 58.2, 52.5, 51.3, 46.3, 42.5, 41.5, 40.9, 39.6, 39.2, 38.3, 36.9, 31.0, 28.8, 27.6, 24.7, 22.2, 21.2, 19.4, 18.8, 15.5, 13.5, 11.9, 11.7. **IR** (neat,  $\nu$  (cm $^{-1}$ )) 3436, 2965, 2933, 2837, 1695. **HRMS** calculated for C<sub>29</sub>H<sub>51</sub>O<sub>6</sub> (MH $^+$ ): 495.3686; found 495.3674. Note that the <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR data on this purified compound were consistent with data in the literature [5].

## 2.7. *(22E, 24S)-3β-acetoxy-5α-stigmastan-22-en-6-one (9)*

1.80 g (4.38 mmol, 1.00 eq) of pentacyclic ketone **5** were added to 90 mL of glacial acetic acid. After complete dissolution, 8.8 mL of aqueous 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> were

added. The heterogeneous solution was refluxed for 2 h. The solution was then cooled to room temperature, diluted with water and extracted with EtOAc (4X). The organic layers were combined, washed with water (6X), saturated NaHCO<sub>3</sub> (2X) and brine (2X). After evaporation of the solvent, the yellow crude product was dissolved in 20 mL of pyridine. 1.85 mL of acetic anhydride and 18 mg of 4-dimethylaminopyridine (DMAP) were then added. After stirring at room temperature for 3 h, the orange mixture was diluted with water and extracted with EtOAc (4X). The organic layers were combined and washed with water (3X), saturated NaHCO<sub>3</sub> (2X) and brine (2X). The solution was then dried over MgSO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum to obtain 1.56 g of **9** (74%) as white crystals. **mp** lit. 146-147 °C [42] exp. 142-144 °C. **<sup>1</sup>H-NMR** (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 5.13 (dd, 1H, J=8 and 15 Hz, H-22), 5.03 (dd, 1H, J=8 and 15 Hz, H-23), 4.66 (m, 1H, H-3α), 2.31 (dd, J=5 and 13 Hz, 1H, H-5), 2.25 (dd, J=3 and 13 Hz, 1H, H-7), 2.02 (s, 3H, H-31), 2.03-1.10 (m, 27H), 1.01 (d, J=6 Hz, 3H, H-21), 0.80 (t, J=7 Hz, 3H, H-29), 0.78 (d, J=7 Hz, 3H), 0.77 (s, 3H, H-19), 0.68 (s, 3H, H-18). **<sup>13</sup>C-NMR** (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 211.2 (C-6), 170.6 (C-30), 137.9 (C-22), 129.6 (C-23), 72.8 (C-3), 56.8, 56.5, 55.9, 51.2, 46.6, 42.8, 40.9, 40.4, 39.3, 37.9, 36.4, 31.8, 28.7, 26.8, 26.1, 25.4, 24.0, 21.4, 21.3, 21.1(2), 19.0, 13.0, 12.2(2). **<sup>1</sup>H-NOESY** (a correlation was observed between H-5α (2.31 ppm) and H-3α (4.66 ppm)). **IR** (KBr, ν (cm<sup>-1</sup>)) 2941, 2876, 1741, 1708, 1478, 1361, 1244, 1023, 960. **LRMS** (*m/z*, relative intensity) 470 (M<sup>+</sup>) (70), 410 (60), 367 (80), 329 (100), 271 (95). **HRMS** calculated for C<sub>31</sub>H<sub>50</sub>O<sub>3</sub>Na (M+Na)<sup>+</sup>: 493.3653; found 493.3652.

## 2.8. (22*E*, 24*S*)-3β-hydroxy-5α-stigmastan-22-en-6-one (**10**)

525 mg (1.12 mmol) of acetate **9** were suspended in 45 mL of MeOH. To this suspension were added 2.25 g (5% w/v) of KOH, and the mixture was stirred at room temperature for 2 h. The resulting clear solution was concentrated under vacuum. The yellowish crude product was diluted with water and extracted with EtOAc (3X). The organic layers were combined and washed with water (3X), saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl (2X) and brine (2X). The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub> and

concentrated under vacuum to afford 447 mg of a yellowish solid. This crude product was filtered over a silica gel pad to eliminate coloured impurities with  $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$  (96:4) as eluent. 425 mg of **10** (89%) were isolated as white crystals. **mp** lit. 146-147  $^{\circ}\text{C}$  [42] exp. ( $\text{EtOH}$ ) 153-155  $^{\circ}\text{C}$ .  **$^1\text{H-NMR}$**  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 5.14 (dd, 1H,  $J=8$  and 15 Hz, H-22), 5.04 (dd, 1H,  $J=8$  and 15 Hz, H-23), 3.58 (m, 1H, H-3 $\alpha$ ), 2.30 (dd,  $J=5$  and 13 Hz, 1H, H-5), 2.23 (dd,  $J=3$  and 13 Hz, 1H, H-7), 2.10-1.10 (m, 28H), 1.03 (d,  $J=6$  Hz, 3H, H-21), 0.88-0.74 (m, 9H), 0.66 (s, 3H, H-18).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 211.2 (C-6), 138.2 (C-22), 129.8 (C-23), 70.9 (C-3), 57.1, 57.0, 56.1, 54.2, 51.5, 47.0, 43.1, 41.2, 40.6, 39.6, 38.1, 36.9, 32.1, 30.9, 30.3, 29.0, 25.6, 24.3, 21.7, 21.4, 21.3, 19.2, 13.4, 12.5, 12.4. **IR** (KBr,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ )) 3411, 2946, 2867, 1708, 1459, 1383, 1062, 968. **LRMS** ( $m/z$ , relative intensity) 428 ( $\text{M}^+$ ) (80), 410 (25), 385 (30), 367 (60), 316 (85), 287 (100). **HRMS** calculated for  $\text{C}_{29}\text{H}_{49}\text{O}_2$  ( $\text{MH}^+$ ): 429.3737; found 429.3727.

## 2.9. *(22E, 24S)-3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-22-en-6-one (11)*

Under inert atmosphere, in a 50-mL round-bottomed flask, 400 mg (0.93 mmol) of alcohol **10** was mixed with 978 mg (3.73 mmol, 4.00 eq) of  $\text{Ph}_3\text{P}$  and 0.623 g (3.73 mmol, 4.00 eq) of p-nitrobenzoic acid. To this solid mixture were added 20 mL of anhydrous THF with a syringe. The solution was cooled to 0  $^{\circ}\text{C}$ , and 0.75 mL (3.73 mmol, 4.00 eq) of diethyl azodicarboxylate (DEAD) was added drop-wise over 15 min. The orange reaction mixture was stirred at 0  $^{\circ}\text{C}$  for 20 min and at room temperature for 24 h. The solution was then diluted with water and extracted with  $\text{CHCl}_3$  (3X). The organic layers were combined and washed with water (3X), saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$  (2X) and brine (2X). The organic layer was dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and concentrated under vacuum. The crude product was purified by flash chromatography on silica gel with  $\text{CHCl}_3$  as eluent. 328 mg of nitrobenzoate (61% crude) were obtained as a yellowish solid.  **$^1\text{H-NMR}$**  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 8.30 (d, 2H,  $J=9$  Hz), 8.21 (d, 2H,  $J=9$  Hz), 5.42 (m, 1H, H-3 $\beta$ ), 2.64 (dd, 1H,  $J=4$  and 12 Hz, H-5), 2.32 (dd, 1H,  $J=3$  and 13 Hz), 2.10-1.10 (m, 28H), 1.02 (d, 3H,  $J=6$  Hz, H-21), 0.83-0.75 (m, 9H), 0.70 (s, 3H, H-18).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm)

211.6 (C-6), 164.0, 150.7, 138.2 (C-22), 136.4, 130.8(2), 129.9 (C-23), 123.8(2), 71.2 (C-3), 57.1, 56.2, 54.3, 53.1, 47.0, 43.1, 41.6, 40.7, 39.6, 38.2, 32.9, 32.1, 29.0, 25.6, 25.3, 24.2, 21.4, 21.3, 19.2, 12.7, 12.5.

320 mg (0.55 mmol) of crude nitrobenzoate was suspended in 30 mL of MeOH. 0.375 g (1.25% w/v) of NaOH was added to this suspension. The mixture was stirred at room temperature for 14 h. The yellow solution was concentrated under vacuum, diluted with water and extracted with EtOAc (3X). The combined organic layers were washed with water (3X), saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl (2X) and brine (2X). The organic layer was then dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under vacuum. The yellow solid obtained (227 mg) was purified by flash chromatography with CHCl<sub>3</sub>/MeOH 1% as eluent. 196 mg of **11** (49% over 2 steps) were isolated as white powder. **mp** exp. (EtOH) 194-196 °C. **<sup>1</sup>H-NMR** (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 5.14 (dd, 1H, J=8 and 15 Hz, H-22), 5.04 (dd, 1H, J=8 and 15 Hz, H-23), 4.17 (m, 1H, H-3β), 2.68 (m, 1H, H-5), 2.25 (dd, J=3 and 13 Hz, 1H), 2.08-1.08 (m, 28 H), 1.03 (d, J=6 Hz, 3H, H-21), 0.98-0.72 (m, 9H), 0.68 (s, 3H, H-18). **<sup>13</sup>C-NMR** (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 213.0 (C-6), 138.3 (C-22), 129.8 (C-23), 65.7 (C-3), 57.2, 56.1, 54.1, 51.9, 51.5, 47.1, 43.1, 41.8, 40.6, 39.6, 38.2, 32.1, 31.9, 29.0, 28.4, 27.9, 25.6, 24.2, 21.4, 21.3, 19.2, 12.5, 12.4. **IR** (KBr, ν (cm<sup>-1</sup>)) 3290, 2941, 2869, 1707, 1465, 1000, 966. **LRMS** (m/z, relative intensity) 428 (M<sup>+</sup>) (20), 410 (80), 367 (60), 316 (55), 271 (100). **HRMS** calculated for C<sub>29</sub>H<sub>49</sub>O<sub>2</sub> (MH<sup>+</sup>): 429.3733; found 429.3727.

#### 2.10. (24S)-3β-hydroxy-5α-stigmastan-6-one (**12**)

100 mg (0.23 mmol) of sterol **10** were dissolved in 2.5 mL of EtOAc. 20 mg of Pd/C 10% were added to this solution. The reaction flask was equipped with a rubber septum, and hydrogen gas was bubbled directly into the solution for 5 min. The solution was stirred for 3 h under hydrogen atmosphere at room temperature. The preceding step (5 min of bubbling, followed by 3 h of stirring) was repeated twice and stirred for another 14 h under hydrogen atmosphere. The reaction mixture was

filtered through Celite. The filtrate was washed twice with water and twice with brine. The organic layer was dried over  $\text{MgSO}_4$ , and concentrated under vacuum. 95 mg of an amorphous solid were obtained. This solid was purified by flash chromatography with  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  gradient (0 → 6%) as eluent to provide 65 mg of **12** (65%) as a white solid. **mp** 118-120 °C. **<sup>1</sup>H-NMR** (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 3.57 (m, 1H, H-3 $\alpha$ ), 2.38 (dd, 1H,  $J$ =5 and 13 Hz, H-5), 2.20-0.82 (m, 45H), 0.68 (s, 3H, H-18). **<sup>13</sup>C-NMR** (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 211.2 (C-6), 70.9 (C-3), 57.0(2), 56.2, 54.2, 47.0, 46.0, 43.2, 41.2, 39.7, 38.1, 36.9, 36.3, 34.1, 30.9, 30.3, 29.4, 28.3, 26.3, 24.2, 23.3, 21.7, 20.0, 19.2, 18.9, 13.4, 12.2(2). **IR** (KBr,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 2395, 2354, 1716, 1531, 1416, 1052, 927. **HRMS** calculated for  $\text{C}_{29}\text{H}_{51}\text{O}_2$  ( $\text{MH}^+$ ): 431.3889; found 431.3887.

### 2.11. *Cell culture and treatments*

PC12 cells were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD) and maintained in a controlled environment at 37 °C and 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere. They were grown in RPMI-1640 medium supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), 10% horse serum and gentamicin (50  $\mu\text{g/mL}$ ). The culture medium was changed every 2 days, and the cells were seeded at a cellular density of 25,000 cells/cm<sup>2</sup>. Neuronal differentiation was induced for 4 days with 50 ng/mL of NGF in RPMI-1640 medium supplemented with 1% FBS. To examine the effect of commercially available BRs (**1** and **3**), synthesized natural BRs (**2a** and **8**) and analogs (**2b**, **7**, **10**, **11** and **12**) on MPP<sup>+</sup>-induced cellular death, neuronal PC12 cells were pre-treated with BRs ( $10^{-9}$  M), analogs ( $10^{-9}$  M) or vehicle (culture medium) for 3 h and exposed to MPP<sup>+</sup> 5 mM for 24 h while maintaining BR or analog concentration at  $10^{-9}$  M. After dose-response experiments, the final concentration of  $10^{-9}$  M 24-epibrassinolide (**1**) was chosen in our previous study as the lowest dose capable of rescuing cells from MPP<sup>+</sup>-induced cellular death [17]. For comparative purposes, we worked with the same concentration for all BRs and analogs used in this study. All experiments were performed in phenol red-free medium and charcoal-stripped serum to remove steroids.

## 2.12. Cytotoxicity measurements

Cytotoxicity was evaluated by colorimetric assay based on the measurement of lactate dehydrogenase (LDH) activity released from damaged cells into the supernatant [43]. LDH is a stable cytoplasmic enzyme present in all cells. It is rapidly released into cell culture supernatant upon damage of the plasma membrane. The amount of enzyme activity detected in culture supernatant correlates with the portion of lysed cells [44,45]. NGF-differentiated PC12 cells were grown and treated in collagen-coated 96-well plates. Then, 100 µL of LDH substrate mixture was added to 50 µL of cell-free supernatant, as described elsewhere [46]. The plate was incubated, protected from light, for 20 min. Absorbance was measured at wavelength 490 nm on a microplate reader (Thermolab System, Franklin, MA). Total cellular LDH was determined by lysing the cells with 1% Triton X-100 (high control); the assay medium served as a low control and was subtracted from all absorbance measurements:

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{(\text{Experimental value} - \text{Low control})}{(\text{High control} - \text{Low control})} \times 100$$

## 2.13. Statistical analysis

Significant differences between groups were determined by 1-way ANOVA, followed by Tukey's post-hoc analysis with the GraphPad InStat program, version 3.06, for Windows© (San Diego, CA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). All data, at the 95% confidence interval, are expressed as means ± standard error of the mean (SEM) from 3 independent experiments. Asterisks indicate statistical differences between the treatment and respective control condition (\*p<0.05, \*\*p<0.01 and \*\*\*p<0,001); full circles show statistical differences between the treatment and MPP+ condition (•p<0.01 and ••p<0,001).

## RESULTS

### 3.1. Chemistry

Seven brassinosteroids and analogs were prepared according to the synthetic pathway depicted in Scheme 1. The common starting material for all these compounds was ketone **5** (see Scheme 1), easily prepared from stigmasterol (**4**) with the modified protocol of Brosa et al. [8]. Ketone **5** was then reacted with lithium bromide and pyridinium chloride in refluxing DMA to produce dienone **6** [47]. This reaction consists of acid-catalyzed bromide opening of the 3-membered ring, followed by HBr elimination. We altered the protocol of Brosa et al. slightly to improve the efficiency of their method. Indeed, when preparing dienone **6** from stigmasterol (**4**) (with an overall yield of 56% over 4 steps), Brosa et al. performed 2 laborious time-consuming chromatographic purifications. We eliminated both chromatographic purifications and obtain pure dienone **6** with only simple crystallization in the last step. The overall yield for these 4 steps was also improved to 72%. To form natural 22R, 23R-homocastasterone (**2a**), we treated compound **6** with Sharpless' asymmetric dihydroxylation mixture ( $\text{OsO}_4$ ,  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{MeSO}_2\text{NH}_2$ , DHQD)[5,48]. A 1:1 mixture of natural **2a** and non-natural **2b** was obtained. Separation by flash chromatography yielded pure 22R, 23R-homocastasterone (**2a**) (13% overall yield) and 22S, 23S-homocastasterone (**2b**) (11% overall yield). 22R, 23R-homobrassinolide (**8**) was synthesized by Baeyer-Villiger oxidation of **2a** with peroxytrifluoroacetic acid to provide a mixture of 7-oxalactone and 6-oxalactone in a 9:1 ratio from which pure 22R, 23R-homobrassinolide (**8**) was isolated by re-crystallization from EtOAc with 65% yield.

We also prepared diol **7** devoid of any OH at positions 22 and 23. Comparing neuroprotective activity of **7** with **2a** and **2b** allowed us to evaluate the importance of oxygenation at positions 22 and 23. Dihydroxylation of dienone **6** with  $\text{OsO}_4$  / NMO at room temperature for 12 h generated a 10:1 mixture of 2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ -diol **7** / 2 $\beta$ ,3 $\beta$ -diol. Purification by flash chromatography gave pure compound **7** with 60% yield.

We then moved on to synthesize analogs of the 3-deoxy (homotesterone) family. Aqueous acetic acid opening of ketone **5** first gave a 2.5:1 mixture of **9** and **10**. Treatment of this crude mixture with DMAP, pyridine and Ac<sub>2</sub>O produced **9** with 75% yield. Hydrolysis of **9** under basic conditions yielded alcohol **10** with 89% yield. Note that direct opening of ketone **5** in aqueous basic or acidic conditions (without the presence of any other nucleophiles) did not cleanly lead to the desired alcohol **10**. Yields were low and separation was cumbersome. Compound **10** was then taken to prepare 2 other BRs (see Scheme 1). First, the hydroxy group at position 3 was epimerized under standard Mitsunobu conditions [49,50], eliciting 3 $\alpha$  steroid **11** with 49% yield. Second, alcohol **10** was cleanly hydrogenated (Pd/C, H<sub>2</sub>, EtOAc) to compound **12** (65% yield).

### 3.2. Cytotoxicity measurements

The ability of BRs and analogs to reverse MPP<sup>+</sup>-induced cytotoxicity was investigated by LDH colorimetric assay [35,51]. BRs and analogs, when used alone, did not cause significant cell death of neuronal PC12 cells compared to the control condition (Ctrl, 0.0 $\pm$ 0.6%) except for analog **3** (11.7 $\pm$ 4.4%, Fig. 2B). Treatment with MPP<sup>+</sup> for 24 h induced 28.8 $\pm$ 1.6% cell mortality (Fig. 2A). When neuronal PC12 cells received compounds **1**, **2 b**, **2a**, **7**, **11** or **10**, cell mortality was significantly reduced (8.5 $\pm$ 2.4%; 9.7 $\pm$ 2.2%; 13.1 $\pm$ 2.3%; 11.9 $\pm$ 1.5%; 14.6 $\pm$ 2.0 and 11.2 $\pm$ 3.6%, respectively) 3 h prior to MPP<sup>+</sup>. Analog **3**, BR **8** and analog **12** did not significantly obviate MPP<sup>+</sup>-induced cell death (24.2 $\pm$ 3.6%; 22.2 $\pm$ 3.5% and 24.7 $\pm$ 3.1%, respectively).

## DISCUSSION

Since BRs are present in a large number of plants, animals, including humans, consume BRs in their daily diet. 24-Epibrassinolide (**1**) is found, for example, in *Vicia faba* [2], and homocastasterone (**2a**) is contained, among others, in Chinese cabbage *Brassica campestris* [52,53], rice *Oryza sativa* [52], rye *Secale cereale* [54], and green tea *Thea sinensis* [52,53]. Our recent study demonstrated the powerful neuroprotective properties of the natural BR 24-epibrassinolide (**1**) against MPP+-induced oxidative stress and apoptosis [17]. In the present paper, we report that another natural BR, homocastasterone (**2a**), and several analogs (**2b**, **7**, **11**, and **10**) have neuroprotective potential at a nanomolar concentration ( $10^{-9}$  M).

The BRs and analogs we investigated, when used alone at nanomolar concentration ( $10^{-9}$  M), did not cause significant cell death in neuronal PC12 cells except for analog 22S, 23S-homobrassinolide (**3**). BRs, such as 24-epibrassinolide (**1**) and homocastasterone (**2a**), were found, at micromolar concentrations, to inhibit growth and elicit the apoptosis of several human cancer cell lines without affecting the growth of normal cells [55]. Yu et al. observed the micromolar toxicity of 22S, 23S-homobrassinolide (**3**), 22R, 23R-homobrassinolide (**8**), 22S, 23S-homocastasterone (**2b**) and 22R, 23R-homocastasterone (**2a**) on human cancer cell lines with the (22R, 23R) isomer shown to be significantly more toxic than the (22S, 23S) isomer [56]. Our study discerned slight toxicity of the (22S, 23S) isomer of homobrassinolide (**3**) at nanomolar concentration in neuronal PC12 but not with the (22R,23R) isomer (Fig. 2B).

Strong as our results are with 9 BRs and analogs, we discuss here the influence of functionalization and stereochemistry of these phytosterols on neuroprotection. First, we noted that oxygenation of the B ring greatly influenced BRs neuroprotection against MPP+ toxicity. Indeed, while ketones **2a** and **2b** possessed neuroprotective activity, lactones **3** and **8** did not present any (Fig. 2A). Compound **1**, differing by only 1 carbon at position 24 (ethyl vs methyl) from **3** and **8**,

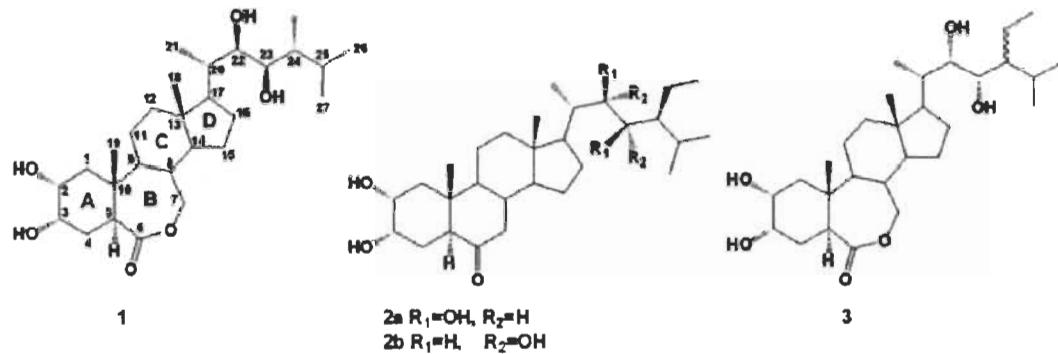
displayed neuroprotection (Fig. 2A). Therefore, a lactone in the B ring does not completely obviate neuroprotection against MPP<sup>+</sup> toxicity. Second, stereochemistry at positions 22 and 23 did not influence the neuroprotective effect of homocastasterone. Indeed, natural homocasterone **2a** and non-natural analog **2b** showed similar activity. Third, the impact of lateral chain oxygenation on neuroprotection was studied with unsaturated compound **7** in which positions 22 and 23 were not hydroxylated. Neuroprotection similar to hydroxylated BRs **2a** and **2b** was observed (Fig. 2A). Analog **10**, which is unsaturated in 22 and 23, manifested neuroprotection while its saturated counterpart **12** was inactive (Fig. 2A). Neuroprotection seems to be dependent on the presence of hydroxyl groups or unsaturation at positions 22 and 23. Fourth, we analyzed the effect of hydroxylation of the A ring in positions 2 and 3. Comparison of neuroprotection by analogs **7** and **11** demonstrated that the hydroxyl group in position 2 was not important for neuroprotection against MPP<sup>+</sup>-induced toxicity. Stereochemistry at position 3 did not influence neuroprotection, as observed by comparing neuroprotection of analog **11** (3S isomer) with analog **10** (3R isomer).

BRs should be regarded as interesting molecules for the prevention or treatment of neurodegenerative disease. In this study, several natural BRs and analogs were found to protect neuronal cells against MPP<sup>+</sup>-induced toxicity. In previous experiments, we associated neuroprotection by 24-epibrassinolide (**1**) against MPP<sup>+</sup>-induced toxicity with antioxidative and anti-apoptotic properties [17]. Also, recent animal and human studies have shown that phytosterols get through the blood-brain-barrier (BBB) and accumulate in the brain [57-59]. Whether this affects neurocognitive functioning and mental well-being in humans was assessed in hypercholesterolemic individuals, and it was determined that long-term (85 weeks) use of plant sterols or stanols (2.5 g/d) has no impact on neurocognitive functioning or mood [60]. Muthuraman et al. reported that homobrassinolide modulated gene expression in the rat brain, indicating that phytosterol from the BR family or metabolites might pass through the BBB [61]. Finally, BRs have an interesting safety profile. 24-Epibrassinolide (**1**) innocuity was investigated in mice and rats. Acute

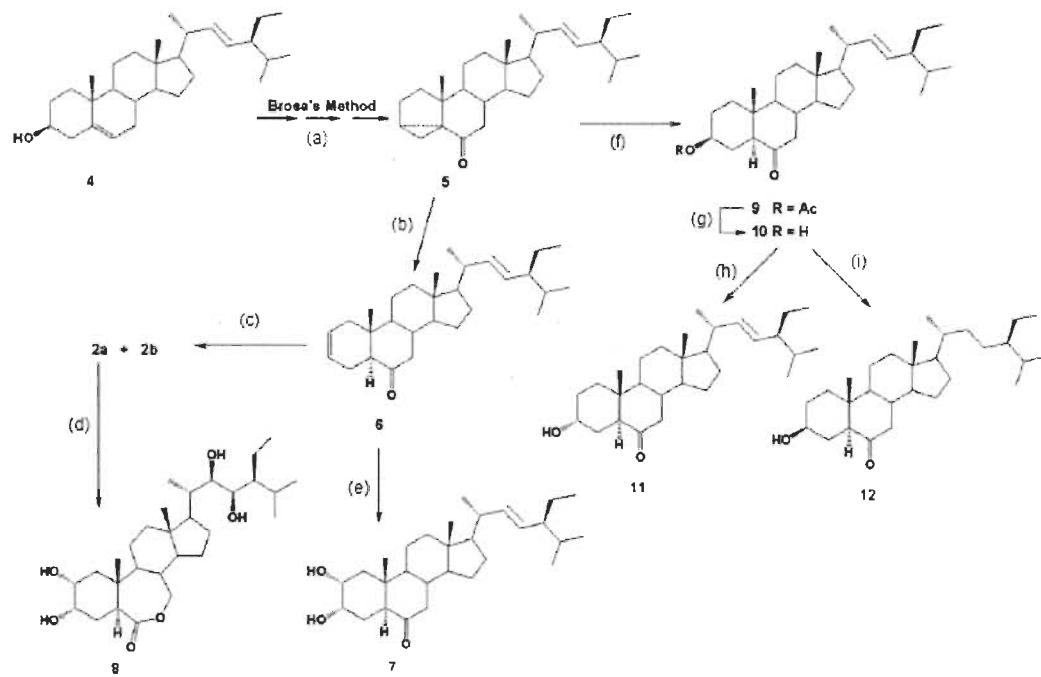
toxicity (LD50) was more than 1,000 mg/kg for mice by oral administration, and more than 2,000 mg/kg for rats both orally and dermally [7,62]. The teratogenic potential of homobrassinolide **8** was evaluated in Wistar rats and it was concluded that **8** is non-teratogenic at doses as high as 1,000 mg/kg [63]. With our results demonstrating the neuroprotective effect of BRs on neuronal cell cultures and studies showing possible passage of BRs through the BBB with their interesting safety profile, these compounds should thus be regarded as novel molecules in complementary and/or preventive therapies of neurodegenerative diseases and should be assessed in animal models of such disorders.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

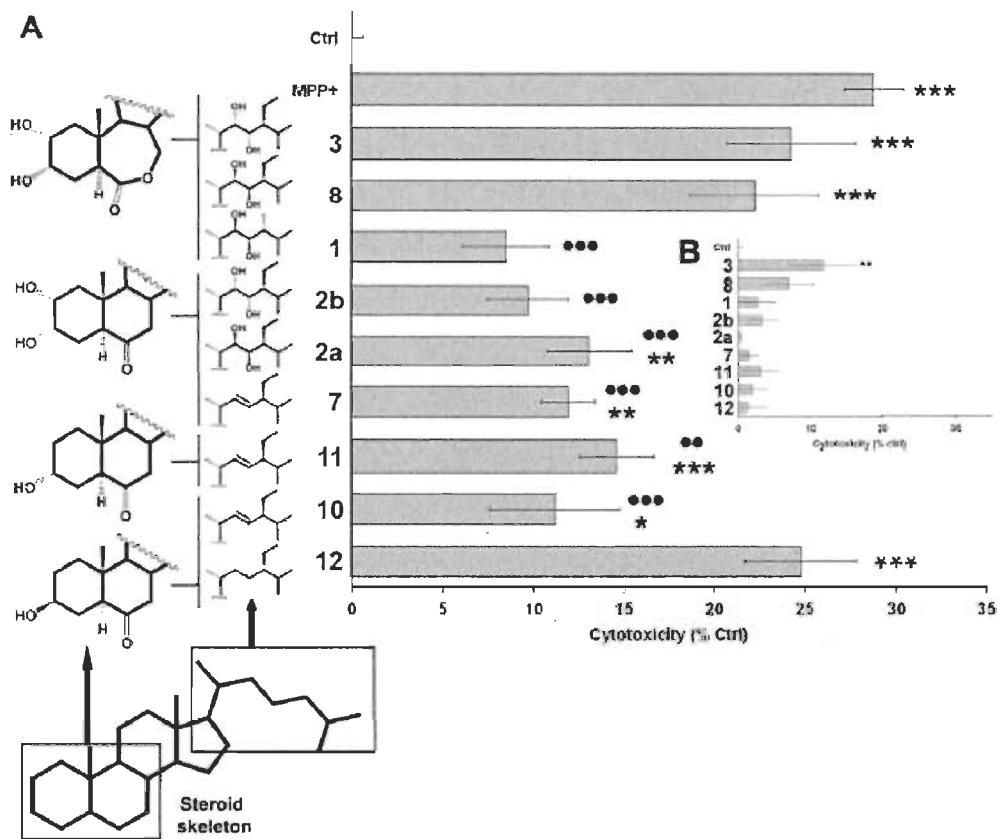
Financial support from Fonds Québécois de la recherche sur la nature et les technologies (FQRNT) is acknowledged. We are thankful to Isabelle Rheault from Université du Québec à Montréal for performing the HRMS.



**Fig.1.** Structure of 24-epibrassinolide (1), homocastasterone (2), and 22S, 23S-homobrassinolide (3).



**Scheme 1.** Reagents and conditions: (a)  $\text{MeSO}_2\text{Cl}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , toluene,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , 1.5 h;  $\text{KHCO}_3$ , acetone/ $\text{H}_2\text{O}$  3:1, reflux, 6 h; Jones' reagent, acetone,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , 5 min. (b)  $\text{Pyr}\cdot\text{HCl}$ ,  $\text{LiBr}$ , DMA, reflux, 4 h. (c)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ,  $\text{OsO}_4$  cat., DHQD,  $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{NH}_2$ ,  $\text{t-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$  1:1, rt, 6 days. (d)  $\text{CF}_3\text{CO}_3\text{H}$ ,  $\text{CHCl}_3$ , rt, 2 h. (e) NMO,  $\text{OsO}_4$  cat., acetone/ $\text{H}_2\text{O}$  9:1, rt, 12 h. (f)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{AcOH}$ , reflux, 2 h;  $\text{Ac}_2\text{O}$ , pyridine, DMAP, rt, 3 h. (g)  $\text{KOH}$ ,  $\text{MeOH}$ , rt, 2 h. (h)  $\text{Ph}_3\text{P}$ ,  $\text{p-nitrobenzoic acid}$ ,  $\text{DEAD}$ ,  $\text{THF}$ , rt, 24 h;  $\text{NaOH}$ ,  $\text{MeOH}$ , rt, 14 h. (i)  $\text{H}_2$ ,  $\text{Pd/C}$  10 %,  $\text{EtOAc}$ , rt, 14 h.



**Fig 2.** Cytotoxicity measurement in neuronal PC12 cells by colorimetric assay based on LDH activity. The absorbance value obtained for the untreated control was subtracted from all other values, as described in the Experimental section. The data are expressed as percentages of values of untreated control cells and are means  $\pm$  SEM n=3. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs Ctrl and •p<0.01, ••p<0.001 vs MPP+. (A) Effect of BPs or analogs against MPP+-induced cytotoxicity. Neuronal cells were pre-treated with BPs, analogs (10-9 M) or vehicle for 3 h and then exposed to MPP+ (5 mM) or not for 24 h. (B) Neurotoxicity of BPs or analogs alone in neuronal PC12 cells. Neuronal cells were treated with BPs or analogs (10-9 M) or vehicle for 27 h.

## REFERENCES

- [1] Park K-H, Yokota T, Sakurai A, Takahashi N. Occurrence of castasterone, brassinolide and methyl 4-chloroindole-3-acetate in immature *Vicia faba* seeds. *Agric Biol Chem* 1987;51:3081-6.
- [2] Ikekawa N, Nishiyama F, Fujimoto Y. Identification of 24-epibrassinolide in bee pollen of the broad bean, *Vicia faba* L. *Chem Pharm Bull* 1988;36:405-7.
- [3] Gamoh K, Omote K, Okamoto N, Takatsuto S. High-performance liquid chromatography of brassinosteroids in plants with derivatization using 9-phenanthreneboronic acid. *J Chromatogr* 1989;469:424-8.
- [4] Bajguz A, Tretyn A. The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants. *Phytochemistry* 2003;62:1027-46.
- [5] McMorris TC, Patil PA, Chavez RG, Baker ME, Clouse SD. Synthesis and biological activity of 28-homobrassinolide and analogs. *Phytochemistry* 1994;36:585-9.
- [6] Mori K, Sakakibara M, Ichikawa Y, Ueda H, Okada K, Umemura T, et al. Synthesis of (22S, 23S)-homobrassinolide and brassinolide from stigmasterol. *Tetrahedron* 1982;38:2099-109.
- [7] Khrapach V, Zhabinskii V, De Groot A. Twenty years of brassinosteroids: steroid plant hormones warrant better crops for the XXI century. *Ann Bot* 2000;86:441-7.
- [8] Brosa C, Nusimovich S, Peracaula R. Synthesis of new brassinosteroids with potential activity as antiecdysteroids. *Steroids* 1994;59:463-7.
- [9] Khrapach VA, Zhabinskii VN, de Groot AE (1999) *Brassinosteroids: a new class of plant hormones*. Academic Press, San Diego, CA.
- [10] Clutter HG, Yokota T, Adam G (1991) *Brassinosteroids: chemistry, bioactivity and applications*. American Chemical Society, Washington, DC.
- [11] Mazorra LM, Núñez M, Hechavarria M, Coll F, Sánchez-Blanco MJ. Influence of brassinosteroids on antioxidant enzymes activity in tomato under different temperatures. *Biol Plant* 2002;45:593-6.
- [12] Ali B, Hayat S, Fariduddin Q, Ahmad A. 24-Epibrassinolide protects against the stress generated by salinity and nickel in *Brassica juncea*. *Chemosphere* 2008;72:1387-92.

- [13] Özdemir F, Bor M, Demiral T, Türkan I. Effects of 24-epibrassinolide on seed germination, seedling growth, lipid peroxidation, proline content and antioxidative system of rice (*Oryza sativa* L.) under salinity stress. *Plant Growth Regul* 2004;42:203-11.
- [14] Hayat S, Ali B, Hasan SA, Ahmad A. Brassinosteroid enhanced the level of antioxidants under cadmium stress in *brassica juncea*. *Environ Exp Bot* 2007;60:33-41.
- [15] Arora N, Bhardwaj R, Sharma P, Arora HK. 28-homobrassinolide alleviates oxidative stress in salt-treated maize (*Zea mays* L.) plants. *Braz J Plant Physiol* 2008;20:153-7.
- [16] Muthuraman P, Sri Kumar K. A comparative effect of homobrassinolide and giberellic acid on lipid peroxidation and antioxidant defense in alloxan induced diabetic male albino rats. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2009;24:1122-7.
- [17] Carange J, Longpre F, Daoust B, Martinoli MG. 24-Epibrassinolide, a phytosterol from the brassinosteroid family, protects dopaminergic cells against MPP<sup>+</sup>-induced oxidative stress and apoptosis. *J Toxicology* 2011;In press.
- [18] Mariani E, Polidori MC, Cherubini A, Mecocci P. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J Chromatogr B* 2005;827:65-75.
- [19] Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 2003;39:889-909.
- [20] Olanow CW. The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease - 2007. *Mov Disord* 2007;22 Suppl 17:S335-42.
- [21] Zhou C, Huang Y, Przedborski S. Oxidative stress in Parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1147:93-104.
- [22] LeWitt PA. Levodopa therapeutics for Parkinson's disease: new developments. *Parkinsonism Relat Disord* 2009;15 Suppl 1:S31-4.
- [23] Rabey JM, Vered Y, Shabtai H, Graff E, Harsat A, Korczyn AD. Broad bean (*Vicia faba*) consumption and Parkinson's disease. *Adv Neurol* 1993;60:681-4.
- [24] Farina E, Piu P, Strinna L. [Extraction of L-DOPA from *Vicia faba* L. and other plants of the leguminous genera]. *Boll Soc Ital Biol Sper* 1974;50:508-11.

- [25] Raguthu L, Varanese S, Flancbaum L, Tayler E, Di Rocco A. Fava beans and Parkinson's disease: useful 'natural supplement' or useless risk? *Eur J Neurol* 2009;16:e171.
- [26] Apaydin H, Ertan S, Ozekmekci S. Broad bean (*Vicia faba*) - a natural source of L-dopa - prolongs "on" periods in patients with Parkinson's disease who have "on-off" fluctuations. *Mov Disord* 2000;15:164-6.
- [27] Heikkila RE, Hess A, Duvoisin RC. Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice. *Science* 1984;224:1451-3.
- [28] Wong SS, Li RH, Stadlin A. Oxidative stress induced by MPTP and MPP(+): selective vulnerability of cultured mouse astrocytes. *Brain Res* 1999;836:237-44.
- [29] Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976;73:2424-8.
- [30] Kadota T, Yamaai T, Saito Y, Akita Y, Kawashima S, Moroi K, et al. Expression of dopamine transporter at the tips of growing neurites of PC12 cells. *J Histochem Cytochem* 1996;44:989-96.
- [31] Mizuno Y, Sone N, Saitoh T. Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-methyl-4-phenylpyridinium ion on activities of the enzymes in the electron transport system in mouse brain. *J Neurochem* 1987;48:1787-93.
- [32] Schober A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res* 2004;318:215-24.
- [33] Przedborski S, Tieu K, Perier C, Vila M. MPTP as a mitochondrial neurotoxic model of Parkinson's disease. *J Bioenerg Biomembr* 2004;36:375-9.
- [34] Cassarino DS, Fall CP, Swerdlow RH, Smith TS, Halvorsen EM, Miller SW, et al. Elevated reactive oxygen species and antioxidant enzyme activities in animal and cellular models of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1997;1362:77-86.
- [35] Lahaie-Collins V, Bournival J, Plouffe M, Carange J, Martinoli MG. Sesamin modulates tyrosine hydroxylase, superoxide dismutase, catalase, inducible NO synthase and interleukin-6 expression in dopaminergic cells under MPP-induced oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev* 2008;1:54-62.
- [36] Thomas B, Saravanan KS, Mohanakumar KP. In vitro and in vivo evidences that antioxidant action contributes to the neuroprotective effects of the neuronal nitric oxide synthase and monoamine oxidase-B inhibitor, 7-nitroindazole. *Neurochem Int* 2008;52:990-1001.

- [37] Hartley A, Stone JM, Heron C, Cooper JM, Schapira AH. Complex I inhibitors induce dose-dependent apoptosis in PC12 cells: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 1994;63:1987-90.
- [38] Shang T, Kotamraju S, Kalivendi SV, Hillard CJ, Kalyanaraman B. 1-Methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptosis in cerebellar granule neurons is mediated by transferrin receptor iron-dependent depletion of tetrahydrobiopterin and neuronal nitric-oxide synthase-derived superoxide. *J Biol Chem* 2004;279:19099-112.
- [39] Ryu EJ, Angelastro JM, Greene LA. Analysis of gene expression changes in a cellular model of Parkinson disease. *Neurobiol Dis* 2005;18:54-74.
- [40] Sakakibara M, Mori K. Facile synthesis of (22R, 23R)-homobrassinolide. *Agric Biol Chem* 1982;46:2769-79.
- [41] McMorris TC, Chavez RG, Patil PA. Improved synthesis of brassinolide. *J Chem Soc Perkin Trans 1* 1996:295-302.
- [42] Ramirez JA, Teme Centurion OM, Gros EG, Galagovsky LR. Synthesis and bioactivity evaluation of brassinosteroid analogs. *Steroids* 2000;65:329-37.
- [43] Korzeniewski C, Callewaert DM. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1983;64:313-20.
- [44] Martin A, Clynes M. Acid phosphatase: endpoint for in vitro toxicity tests. *In Vitro Cell Dev Biol* 1991;27A:183-4.
- [45] Decker T, Lohmann-Matthes ML. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods* 1988;115:61-9.
- [46] Gelinas S, Martinoli MG. Neuroprotective effect of estradiol and phytoestrogens on MPP+-induced cytotoxicity in neuronal PC12 cells. *J Neurosci Res* 2002;70:90-6.
- [47] Takatsuto S, Ikekawa N. Remote substituent effect on the regioselectivity in the Baeyer-Villiger oxidation of 5-alpha-cholestane-6-one derivatives. *Tetrahedron Lett* 1983;24:917-20.
- [48] Sharpless KB, Amberg W, Bennani YL, Crispino GA, Hartung J, Jeong K-S, et al. The osmium-catalyzed asymmetric dihydroxylation: a new ligand class and a process improvement. *J Org Chem* 1992;57:2768-71.

- [49] Mitsunobu O, Yamada M, Mukaiyama T. Preparation of esters of phosphoric acid by the reaction of trivalent phosphorus compounds with diethyl azodicarboxylate in the presence of alcohols. *Bull Chem Soc Japan* 1967;40:2380-2.
- [50] Martin S, Dodge JA. Efficacious modification of the Mitsunobu reaction for inversions of sterically hindered secondary alcohols. *Tetrahedron lett* 1991;32:3017-20.
- [51] Bournival J, Quessy P, Martinoli MG. Protective effects of resveratrol and quercetin against MPP(+) -induced oxidative stress act by modulating markers of apoptotic death in dopaminergic neurons. *Cell Mol Neurobiol* 2009;29:1169-80.
- [52] Ikekawa N, Takatsuto S, Kitsuwa T, Saito H, Morishita T, Abe H. Analysis of natural brassinosteroids by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 1984;290:289-302.
- [53] Abe H, Morishita T, Uchiyama M, Takatsuto S, Ikekawa N, Ikeda M, et al. Occurrence of three new brassinosteroids: brassinone, (24S)-24-ethylbrassinone and 28-norbrassinolide, in higher plants. *Experientia* 1983;39:351-3.
- [54] Schmidt J, Spengler B, Yokota T, Nakayama M, Takatsuto S, Voigt B, et al. Secasterone, the first naturally occurring 2,3-epoxybrassinosteroid from Secale cereale. *Phytochemistry* 1995;38:1095-7.
- [55] Malikova J, Swaczynova J, Kolar Z, Strnad M. Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids. *Phytochemistry* 2008;69:418-26.
- [56] Misharin AY, Mehtiev AR, Zhabinskii VN, Khripach VA, Timofeev VP, Tkachev YV. Toxicity of (22R,23R)-22,23-dihydroxystigmastane derivatives to cultured cancer cells. *Steroids* 75:287-94.
- [57] Jansen PJ, Lütjohann D, Abildayeva K, Vanmierlo T, Plösch T, Plat J, et al. Dietary plant sterols accumulate in the brain. *Biochim Biophys Acta* 2006;1761:445-53.
- [58] Fricke CB, Schroder M, Poulsen M, von Bergmann K, Wester I, Knudsen I, et al. Increased plant sterol and stanol levels in brain of Watanabe rabbits fed rapeseed oil derived plant sterol or stanol esters. *Br J Nutr* 2007;98:890-9.
- [59] Heverin M, Bogdanovic N, Lütjohann D, Bayer T, Pikuleva I, Bretillon L, et al. Changes in the levels of cerebral and extracerebral sterols in the brain of patients with Alzheimer's disease. *J Lipid Res* 2006;45:186-93.

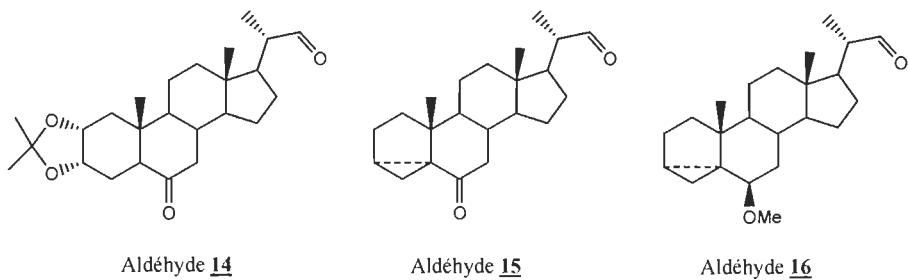
- [60] Schiepers OJ, de Groot RH, van Boxtel MP, Jolles J, de Jong A, Lütjohann D, et al. Consuming functional foods enriched with plant sterol or stanol esters for 85 weeks does not affect neurocognitive functioning or mood in statin-treated hypercholesterolemic individuals. *J Nutr* 2009;139:1368-73.
- [61] Muthuraman P, Srikumar K. Induction of hexokinase I expression in normal and diabetic rats by a brassinosteroid isoform. *Eur J Pharm Sci* 2010;41:1-9.
- [62] Ikekawa N, Zhao Y-J. Application of 24-epibrassinolide in agriculture. *ACS Symposium Series* 1991;474:280-91.
- [63] Murkunde YV, Murthy PB. Developmental toxicity of homobrassinolide in Wistar rats. *Int J Toxicol* 2010;29:517-22.

## CHAPITRE III

### SYNTHÈSE DES PRÉCURSEURS DE BRASSINOSTÉROÏDES DE LA FAMILLE DES 27 ET 28 CARBONES

#### 3.1 Rétrosynthèse

Nous venons de voir, au chapitre précédent, la synthèse des molécules de la famille des 29 carbones. Nous allons maintenant nous attarder sur la synthèse des aldéhydes 14, 15 et 16 (figure 3.1) qui nous permettront, suite à l'ajout de différents nucléophiles carbonés, la reconstruction des chaînes latérales des familles à 27 et 28 carbones (objectif 2). Nous allons dans un premier temps montrer la rétrosynthèse de l'aldéhyde 14. La synthèse des aldéhydes 15 et 16 sera discutée dans la section 3.3 et 3.4.

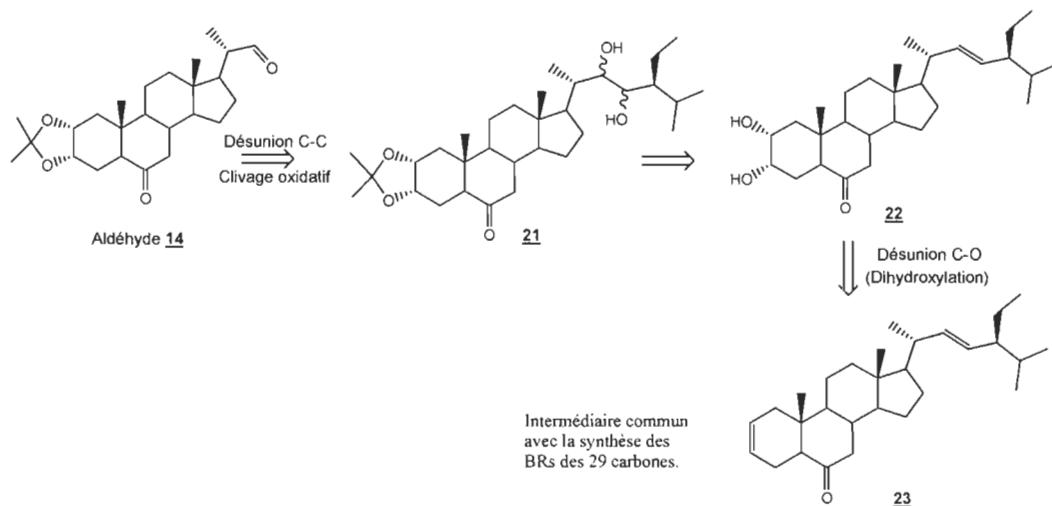


**Figure 3.1** Aldéhydes 14, 15 et 16 désirés permettant de reconstruire les chaînes latérales des familles à 27 et 28 carbones.

Nous avons opté pour ces trois aldéhydes puisque chacun offre des avantages. Les aldéhydes 15 et 16 peuvent être synthétisés en seulement 3 à 4 étapes; ce qui nous

permet de procéder plus rapidement aux tests de réactivité appropriés afin de construire la chaîne latérale. Cependant, ils nécessiteront plus tard la transformation des cycles A et B afin d'obtenir des BRs. L'aldéhyde **14**, quant à lui, possède déjà les fonctionnalités requises dans les cycles A et B, mais il est aussi plus laborieux à synthétiser.

Nous avons démontré au chapitre II (section 2.1) que l'utilisation du stigmastérol (**17**) comme produit de départ est le meilleur choix afin de réaliser nos synthèses. La figure 3.2 montre un schéma global de la rétrosynthèse de l'aldéhyde **14**.



**Figure 3.2** Plan de rétrosynthèse de l'aldéhyde **14**.

Nous pouvons remarquer que par clivage oxydant de la chaîne latérale de **21**, nous pouvons obtenir l'aldéhyde **14** désiré. Ce dernier contient deux fonctions diols en C-2, C-3 et en C-22, C-23. Afin de cliver sélectivement le diol en C-22, C-23, il faudrait donc protéger le diol en C-2, C-3 afin qu'il ne soit pas touché. Ceci serait possible seulement en dihydroxylant sélectivement<sup>(36)</sup> en C-2, C-3 sans toucher la double liaison en C-22, C-23. La rétrosynthèse nous amène donc au composé **23** qui se retrouve aussi comme intermédiaire lors de la synthèse de la famille des 29 carbones (chapitre II, article).

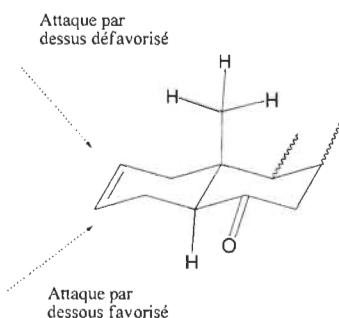
### 3.2 Synthèse de l'aldéhyde 14

#### 3.2.1 Dihydroxylation asymétrique du diène 23 menant au diol 22

Nous avons vu au chapitre II (article) que lorsque le diène 23 est traité avec du tétr oxyde d'osmium activé, nous obtenons au bout de 7 jours l'homocastastérone (11), ainsi que de le 22S, 23S homocastastérone (13) possédant quatre groupements hydroxy en position C-2, C-3, C-22 et C-23. Nous pourrions penser qu'en dihydroxylant sélectivement en C-2, C-3, nous pourrions obtenir le diol 22 désiré. Ceci est possible grâce aux travaux de plusieurs chercheurs, notamment M. C. Noe<sup>(36)</sup>. Il rapporta que la réaction des alcènes vis-à-vis de la dihydroxylation dépend de leur environnement chimique. Or, ces deux insaturations (en C-2, C-3 et en C-22, C-23) sont dans des environnements chimiques très différents. L'une est dans un cycle à 6 membres et l'autre est sur une chaîne ramifiée encombrée. Il serait donc logique de croire que la réactivité de chacun de ces deux alcènes soit très différente. D'ailleurs, lors du suivi de la double dihydroxylation de 23 par CCM, nous avions remarqué que dès le premier jour, tout le produit de départ était consommé pour donner en grande partie un seul produit ayant un  $R_f = 0,48$ . Après une analyse de ce dernier par RMN  $^1H$ , il s'est avéré que c'était bel et bien le diol 22. Ainsi, même si la double dihydroxylation nécessite 7 jours de réaction, la dihydroxylation du lien en C-2, C3 ne requiert qu'une seule journée. Il semble donc possible d'éviter la double dihydroxylation. Dans cette optique, la diminution du temps de réaction semblerait être un élément crucial afin d'éviter l'oxydation du lien C-22, C-23. De plus, nous pouvons aussi considérer de faire la réaction sans l'ajout d'auxiliaire chiral dans le milieu réactionnel. En effet, il est connu que ce dernier permet d'insérer une stéréosélection, mais également d'activer l'osmium. L'activation accrue de l'osmium pourrait augmenter sa réactivité face à l'alcène en C-22, C-23, ce que nous essayons d'éviter. Notons aussi que selon McMorris<sup>(37)</sup>, l'auxiliaire chiral n'est pas requis pour obtenir la bonne stéréochimie des alcools du diol 22.

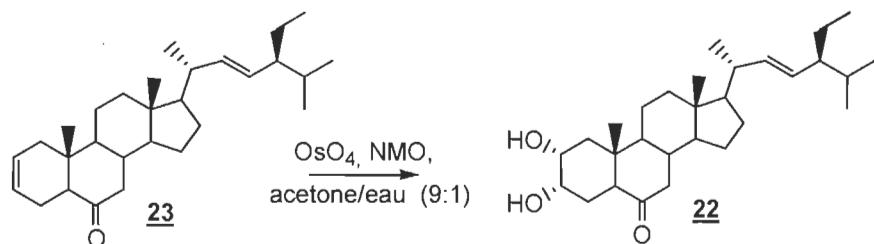
En effet, nous avions remarqué que le problème de stéréosélectivité ne se faisait ressentir qu'en C-22 et C-23, la stéréochimie en C-2 et C-3 étant bien celle désirée

(confirmé avec la littérature<sup>(37)</sup>). La raison de cette stéréochimie contrôlée en C-2 et C-3 est probablement le résultat d'un effet stérique présent sur le diène **23** (figure 3.3). Nous observons que le méthyle en C-10 bloque la face du dessus de la molécule, il est alors probable que OsO<sub>4</sub> s'approche du diène par la face du dessous.



**Figure 3.3** Hypothèse sur la sélectivité en C-2, C-3 lors de la dihydroxylation du diène **21**.

C'est en considérant ces facteurs que nous avons décidé de lancer la réaction dans les conditions de dihydroxylation de McMoris<sup>(37)</sup> en utilisant le NMO comme co-oxydant (schéma 3.1). Le tableau 3.1 montre un résumé des essais réalisés à cette fin.



**Schéma 3.1**

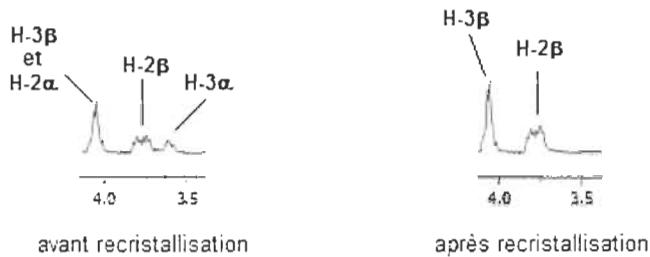
**Tableau 3.1**  
Dihydroxylation asymétrique du diène **23** menant au diol **22**

Essai	Temps (heures)	Rendement après recristallisation
1	12	25 % (EtOH)
2	24	35 % (EtOH)
3	24	66 % (MeOH)

Conditions opératoires : OsO<sub>4</sub> (0.03 éq)/ NMO (2.5 éq); t.a.; acétone/eau (9 : 1).

Nous avons donc dissous notre diène **23** dans un mélange acétone/eau (9 : 1), et ajouté l'OsO<sub>4</sub> et le co-oxydant (NMO). En suivant la réaction par CCM, nous avons remarqué qu'après 12 h à température ambiante (t.a) nous avons réussi à dihydroxyler sélectivement le lien en C-2, C-3 (tableau 3.1 essai 1). Nous avons ensuite remarqué que le rendement pouvait être amélioré en laissant la réaction pendant 24 h à température ambiante (tableau 3.1, essai 2). Suite à quelques modifications au niveau de la recristallisation nous avons pu obtenir le diol **22** avec un rendement de 66 % (tableau 3.1, essai 3).

Malgré qu'en CCM nous n'observions qu'une seule tache, le RMN <sup>1</sup>H semblait nous indiquer qu'il y avait un mélange de produits. La figure 3.4 montre la section du RMN <sup>1</sup>H entre 3,4 et 4,1 ppm, région des hydrogènes sur les carbones porteurs des OH en position C-2 et C-3 de notre diol **22**. Nous pouvons remarquer dans l'agrandissement de gauche la présence d'un petit pic à 3,6 ppm. Ce dernier proviendrait probablement du H-3 $\alpha$  de l'isomère 2 $\beta$ , 3 $\beta$  du diol, selon les données de la littérature<sup>(37)</sup>. De plus, l'intégration du multiplet à 4,05 ppm ne correspondait pas à celle d'un proton, mais bien à plus qu'un proton. En nous référant encore une fois aux données de la littérature<sup>(37)</sup>, nous avons pu identifier ces deux protons comme étant le H-2 $\alpha$  et le H-3 $\beta$ .



**Figure 3.4** Section entre 3,4 et 4,1 ppm du RMN  $^1\text{H}$  200 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) de 22 avant (gauche) et après recristallisation (droite).

Même si le mélange était inséparable par chromatographie éclair, nous avons éventuellement réussi à purifier l'isomère désiré en recristallisant le mélange dans l'éthanol absolu. La figure 3.4 (droite) permet d'apprécier la disparition des signaux de l'isomère non désiré ( $\text{H-2}\alpha$  et  $\text{H-3}\alpha$ ). La recristallisation peut cependant s'avérer problématique, car lors de quelques essais nous avons eu recours à plusieurs recristallisations successives afin d'obtenir un produit pur. Néanmoins, cette technique nous a permis d'obtenir le diol 22 requis pour les étapes subséquentes avec un rendement global de 66 %.

### 3.2.2 Protection de diol 22 sous forme de dioxolane 24

Une fois le diol 22 obtenu, nous avons procédé à sa protection sous forme de dioxolane 24 (schéma 3.2). Nous nous rappellerons que cette protection est nécessaire, car nous allons réaliser un clivage oxydant plus tard dans notre synthèse qui serait néfaste pour les groupements hydroxyles libres en position 2 et 3. Le tableau 3.2 nous montre un résumé des essais réalisés à cette fin.

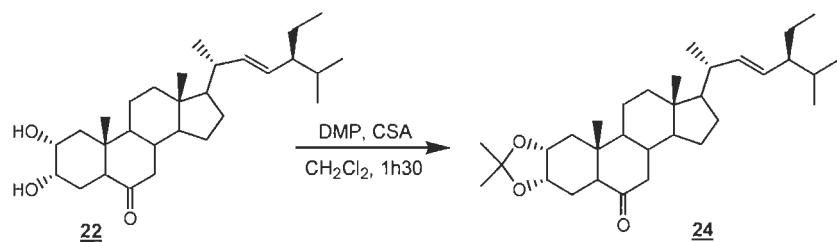


Schéma 3.2

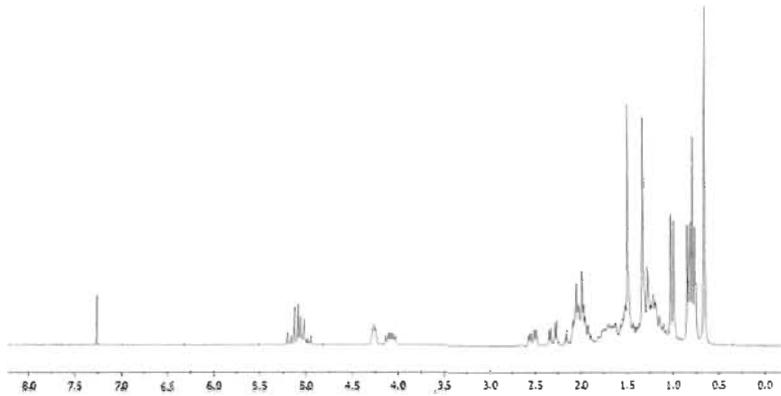
**Tableau 3.2**  
Protection de diol 22 sous forme de dioxolane 24

Essai	Quantité du diol <u>22</u>	Rendement
1	50 mg (0,11 mmol)	56-64 %
2	70 mg (0,16 mmol)	69-73 %
3	700 mg (1,6 mmol)	96 %

Condition opératoire : DMP (12.4 éq)/ CSA (0.01 éq); t.a., 1 h 30.

La transformation est simple et rapide. Il suffit de faire réagir 22 avec le 2,2-diméthoxypropane (DMP) en présence d'un catalyseur acide (nous avons utilisé l'acide camphorsulfonique) pendant 1 h 30 afin d'obtenir le dioxolane 24. Lorsque l'essai est réalisé sur de faibles quantités, les rendements sont moyens comme le montre les essais 1 et 2 du tableau 3.2. L'essai 3, réalisé sur 700 mg conduit à un bon rendement (96%) comparable à celui obtenu par McMorris<sup>(37)</sup> (98 %).

La figure 3.5 montre le spectre RMN <sup>1</sup>H du dioxolane 24. Nous pouvons constater un très léger déblindage des deux protons H-2 et H-3, passant de 3,75 et 4,05 ppm à 4,08 et 4,25 ppm respectivement. Cette différence est conforme aux données de la littérature<sup>(37)</sup> pour la transformation du diol 22 en dioxolane 24.



**Figure 3.5** Spectre RMN  $^1\text{H}$  200 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) du dioxolane 24.

### 3.2.3 Dihydroxylation du dioxolane 24 menant au composé 21

Une fois le dioxolane 24 obtenu, nous avons procédé à la dihydroxylation afin d'obtenir notre composé 21 requis pour le clivage oxydant. Nous avons vu, au chapitre II (article) que la dihydroxylation de la double liaison en C-22, C-23 requiert beaucoup de temps. Heureusement, dans le cas présent la stéréosélectivité n'est pas importante, puisque les deux diastéréoisomères peuvent subir un clivage oxydant nous permettant d'obtenir l'aldéhyde 14.

McMorris<sup>(37)</sup> réalisa cette dihydroxylation avec les conditions classiques de dihydroxylation en utilisant le NMO comme co-oxydant. Cependant, il ajoute une solution de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  pour assurer un pH stable légèrement basique. Ce milieu, en plus d'augmenter la vitesse de la réaction de la dihydroxylation, empêche la déprotection de l'acétonide qui pourrait se produire en milieu acide. Le méthanesulphonamide ( $\text{MeSO}_2\text{NH}_2$ ) qui, rappelons-le, peut considérablement accélérer l'hydrolyse de l'ester osmique (IV) est également ajouté au mélange réactionnel<sup>(38,39)</sup>. De plus, McMorris a établi que les conditions expérimentales optimales étaient obtenues en chauffant le mélange réactionnel à 40 °C pendant 7 jours, conduisant à un rendement de 85 % des deux diastéréoisomères. Finalement, il a réussi à

augmenter le rendement de la réaction à 98 % en utilisant le  $\text{NaHCO}_3$  à la place du  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , obtenant ainsi le mélange de 22S, 23S-diol et 22R, 23R-diol désiré.

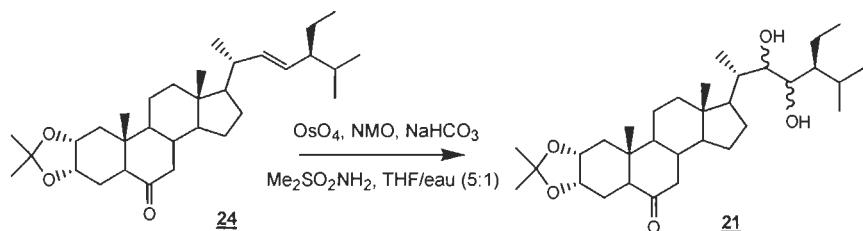


Schéma 3.3

Tableau 3.3  
Dihydroxylation du dioxolane 24 menant au composé 21

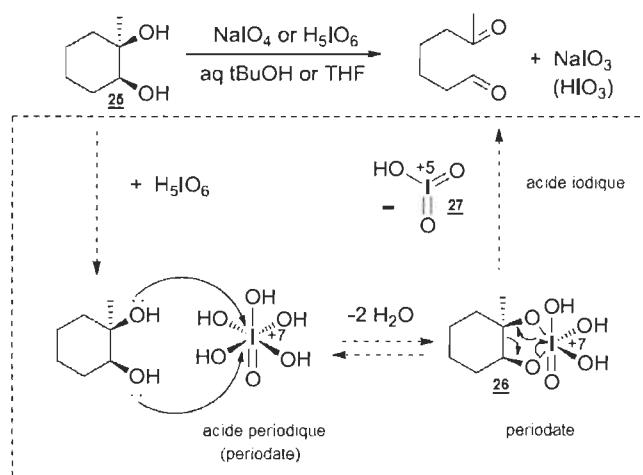
Essai	Température (°C)	Temps réaction (temps neutralisation)	Rendement
1	40 °C	7 jours (5 h)	52 %
2	40 °C	8 jours (5 h)	72 %
3	40 °C	8 jours (12 h)	85 %

Nous avons donc décidé d'utiliser les conditions de McMorris<sup>(37)</sup> (schéma 3.3). Ainsi, lorsque le dioxolane 24 fut traité dans les conditions décrites ci-dessus, une disparition quasi complète du produit de départ fut observée en CCM après 7 jours (tableau 3.3, essai 1). En effet, nous observons l'apparition de deux tâches ( $R_f = 0,3$  et  $0,2$ ) qui représentent respectivement, les deux diastéréoisomères 22S, 23S-diol et 22R, 23R-diol (composé 21). Le rendement a pu être augmenté à 72 % lorsque la réaction est laissée pendant 8 jours à 40 °C au lieu de 7 jours (tableau 3.3, essai 2). Finalement, un rendement de 85 % a pu être obtenu en augmentant à 12 h le temps nécessaire pour neutraliser le milieu réactionnel (tableau 3.3, essai 3) comparativement à 5 h pour les essais 1 et 2. Le produit brut est utilisé directement pour le clivage oxydant. Notons que dans la protection du diol en C-2 et C-3 a bel et bien résisté aux conditions expérimentales nous permettant ainsi de cliver le diol en C-22 et C-23.

### 3.2.4 Clavage oxydant des composés **21** (mélange diastéréoisomères) menant à l'aldéhyde **14**

Une fois les composés **21** (mélange de diastéréoisomères) obtenus, nous serions à une étape près d'obtenir l'aldéhyde **14**. Il serait néanmoins pertinent de comprendre dans un premier temps, le mécanisme du clavage oxydant.

Nous pouvons constater dans le schéma 3.4 que les diols vicinaux (par exemple **25**) peuvent être clivés par un periodate, soit  $\text{NaIO}_4$  ou  $\text{H}_5\text{IO}_6$  ( $\text{HIO}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$ ). Lors de cette réaction, un alcool tertiaire devient une cétone, un alcool secondaire devient un aldéhyde et un alcool primaire forme une molécule de formaldéhyde. La réaction s'effectue en une seule étape, passant par un periodate (**26**) comme intermédiaire. Lors de cette réaction, l'iode subit une réduction passant de l'état d'oxydation (VII) à l'iodate (V) **27**.



**Schéma 3.4**

Les conditions classiques pour cette réaction (schéma 3.4) devraient alors nous permettre de former l'aldéhyde **14** en traitant **21** avec un periodate, soit  $\text{NaIO}_4$  ou  $\text{H}_5\text{IO}_6$ . Néanmoins, la molécule comporte quelques particularités. McMorris<sup>(37)</sup> rapporta que des tentatives visant à cliver le composé **21** à l'aide du  $\text{NaIO}_4$  dans

l'acétone avaient échoué. Ceci pourrait être expliqué par le fait que le periodate de sodium ( $\text{NaIO}_4$ ) ou le periodate de potassium ( $\text{KIO}_4$ ) sont difficilement solubles dans des solvants organiques. Il effectua alors le clivage à l'aide de l'acide périodique ( $\text{H}_5\text{IO}_6$ ) dans le tétrahydrofurane (THF), et il réussit à obtenir le produit désiré rapidement. Cependant, il a observé que dans ces conditions, il y a une perte considérable du groupement protecteur 2,3-acétonide suivi par une réaction ultérieure du diol en C-2, C-3. Il a constaté alors que l'ajout d'un équivalent de pyridine permettait d'éviter la déprotection du diol en C-2 et C-3.

Ainsi, en tenant compte des problèmes discutés ci-dessus, nous avons pris en considération les ajustements mis au point par McMorris<sup>(37)</sup> afin de réaliser le clivage. Les composés 21 furent traités avec l'acide périodique ( $\text{H}_5\text{IO}_6$ ), le bicarbonate de sodium ( $\text{NaHCO}_3$ ) et un équivalent de pyridine à température ambiante. Le tout a été mis sous atmosphère d'azote dans le THF pendant 24 h (schéma 3.5). Nous avons obtenu des rendements 52 à 56 % de l'aldéhyde 14 après purification par chromatographie éclair. Nous sommes cependant loin du rendement de 82 % observé par McMorris. Malheureusement, nous n'avons pas eu assez de temps et de produit pour optimiser le rendement.

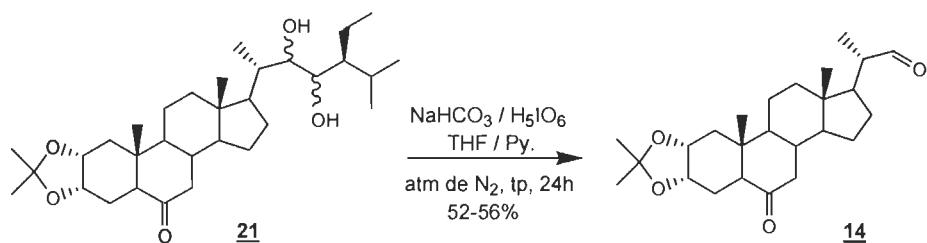
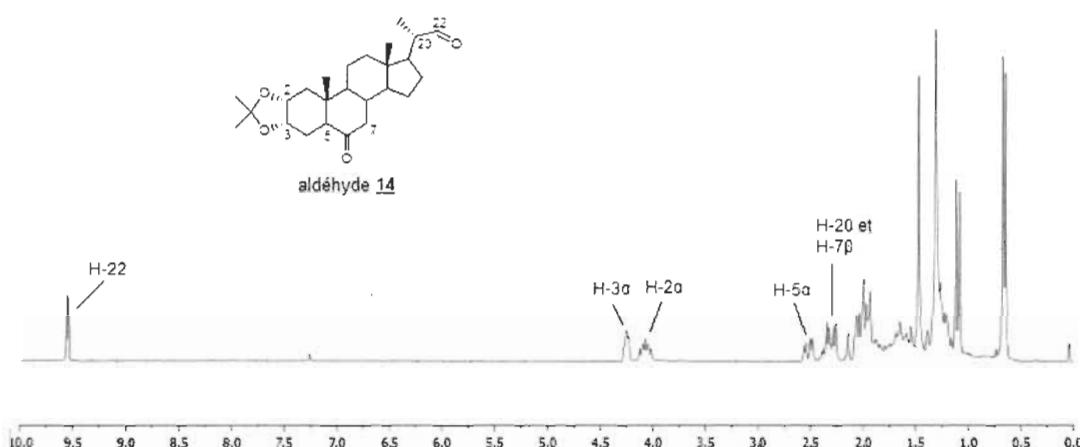


Schéma 3.5

La figure 3.6 montre le spectre RMN  $^1\text{H}$  de l'aldéhyde 14. Nous avons constaté l'apparition d'un nouveau signal à 9,55 ppm caractéristique de l'hydrogène H-22 de l'aldéhyde. Ce dernier se présente sous forme d'un doublet puisqu'il est couplé au proton H-20 avec une constante de couplage de 3 Hz, ce qui est typique d'un couplage entre un aldéhyde et un proton voisin<sup>(40)</sup>. Nous avons aussi observé une

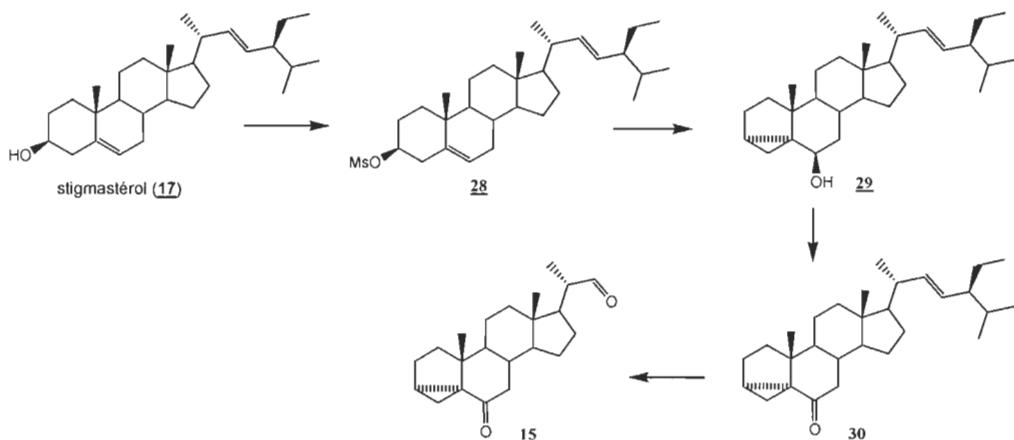
différence au niveau de l'intégration du multiplet à 2,3 ppm. Ce dernier intègre maintenant pour deux protons soit le H-20 et un des deux protons en C-7. Cela n'est guère surprenant puisque l'hydrogène en C-20 est maintenant en  $\alpha$  d'un aldéhyde, il devient alors plus déblindé. Le deuxième proton observé correspondrait au proton H-7 $\beta$ , selon les données de la littérature<sup>(37)</sup>. De plus, le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  montre l'apparition d'un nouveau signal à 205 ppm, qui représenterait le carbone C-22 de l'aldéhyde. Donc nous sommes bien en présence de l'aldéhyde **14**.



**Figure 3.6** Spectre RMN  $^1\text{H}$  200 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) de l'aldéhyde **14**.

### 3.3 Synthèse de l'aldéhyde **15**

Comme nous l'avions mentionné à la section 3.1, l'aldéhyde **15** peut être obtenu en quatre étapes à partir du stigmastérol (**17**) (figure 3.7). Ceci nous permet de procéder plus rapidement au test de réactivité approprié afin de construire la chaîne latérale des BRs des familles à 27 et 28 carbones. Les trois premières étapes sont les mêmes que pour la synthèse des BRs de la famille des 29 carbones (voir chapitre II, article). La dernière étape consiste en l'ozonolyse du composé **30** afin de synthétiser l'aldéhyde **15** désiré.



**Figure 3.7** Plan de la synthèse de l'aldéhyde 15.

### 3.3.1 Ozonolyse du composé 30 menant à l'aldéhyde 15

Lors de la synthèse de l'aldéhyde 14 par dihydroxylation suivi du clivage oxydant, nous avons obtenu un rendement moyen sur deux étapes de 48 %. Nous avons donc décidé pour la synthèse de l'aldéhyde 15 de procéder à sa préparation en une seule étape par ozonolyse. Ceci afin d'améliorer le rendement de la réaction.

L'ozonolyse est le clivage d'un alcène ou un alcyne avec de l'ozone pour former des composés organiques dans lesquels la double ou triple liaison carbone-carbone est remplacée par une double liaison à l'oxygène. Un alcène peut être oxydé avec de l'ozone pour former des alcools, des aldéhydes, des cétones, ou des acides carboxyliques en fonction du réducteur utilisé. Le schéma 3.6 nous montre une de ces voies possibles.

Nous pouvons constater dans le schéma 3.6 que la molécule d'ozone s'attache sur les carbones impliqués dans une double liaison carbone-carbone par une réaction de cycloaddition dipolaire-1,3 pour donner un molozonide, ou ozonide primaire. Ce molozonide, très instable (du fait de la présence conjointe de deux liaisons  $\sigma$  O-O), se scinde en aldéhyde ou en cétone et en oxyde de carboneyle (aussi appelé

intermédiaire de Criegee). Ces derniers réagissent à nouveau l'un sur l'autre dans une cycloaddition dipolaire-1,3 pour produire un ozonide intermédiaire relativement stable (un trioxolane). Un réactif est ensuite ajouté pour convertir l'ozonide intermédiaire en deux nouveaux produits oxygénés. Ces produits peuvent être insaturés (carbonyles) ou saturés (alcools) (voir schéma 3.6). Les conditions de traitements réductrices sont beaucoup plus utilisées que les conditions oxydantes. L'utilisation de la triphénylphosphine, la thiourée, la poussière de zinc, le sulfure de diméthyle produisent des aldéhydes ou des cétones tandis que l'utilisation de borohydrure de sodium produit des alcools.

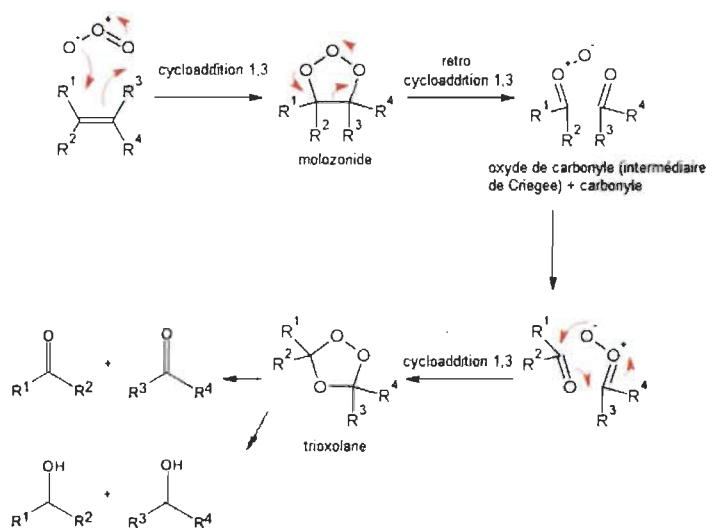


Schéma 3.6

La transformation est simple, rapide et fournit un bon rendement. Il suffit de faire réagir 30 avec l'ozone, dans le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et pyridine (100 : 1) à  $-78^\circ\text{C}$  pendant 15 minutes pour obtenir l'aldéhyde 15 avec un rendement de 86 % après traitement avec du zinc métallique afin de réduire le trioxolane formé (schéma 3.7).

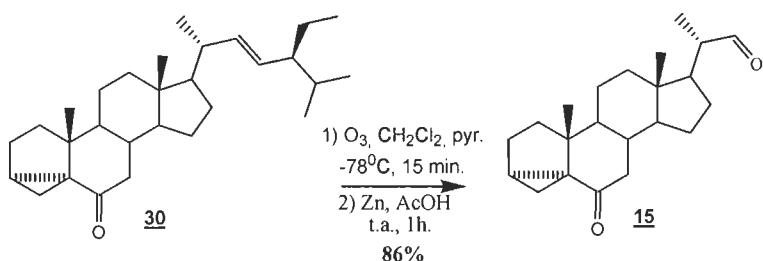
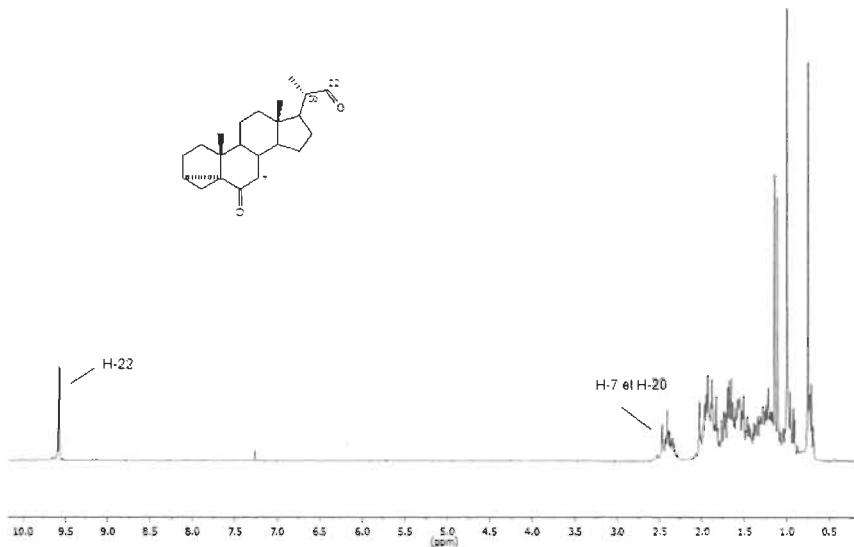


Schéma 3.7

La figure 3.8 montre le spectre RMN  $^1\text{H}$  de l'aldéhyde 15. Nous constatons l'apparition d'un signal à 9,56 ppm caractéristique de l'hydrogène H-22 de l'aldéhyde. Ce dernier se présente sous forme d'un doublet puisqu'il est couplé au proton H-20 avec une constante de couplage de 7,00 Hz, ce qui est typique d'un couplage entre un aldéhyde et un proton voisin<sup>(40)</sup>. Nous pouvons aussi observer un multiplet entre 2,58 et 2,23 ppm. Ce dernier intègre pour trois protons soit le H-20 et les deux protons en C-7.

Figure 3.8 Spectre RMN  $^1\text{H}$  200 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) de l'aldéhyde 15.

Malheureusement, nous avons constaté que l'aldéhyde 15 obtenu est instable. En effet, après une nuit (au frigo), on observe une dégradation en CCM et en RMN  $^1\text{H}$

du produit désiré. La dégradation est accélérée lorsque ce dernier reste une nuit à température ambiante. Il ne serait donc pas judicieux d'utiliser un tel composé pour une étude systématique de réactivité. En effet, nous voulons étudier l'addition de différents nucléophiles carbonés sur l'aldéhyde en C-22. L'utilisation de l'aldéhyde **15** nous ne permettra pas de déterminer avec certitude si un mauvais rendement est dû à la dégradation intrinsèque de **15** ou dû au milieu réactionnel utilisé.

### 3.4 Synthèse de l'aldéhyde **16**

Comme nous l'avions mentionné à la section 3.1, nous pouvons obtenir l'aldéhyde **16** en 3 ou 4 étapes (figure 3.9) selon la stratégie de synthèse choisie. Comme pour l'aldéhyde **15**, ce dernier nous permettra de procéder plus rapidement (comparativement à l'aldéhyde **14**) au test de réactivité approprié afin de construire la chaîne latérale des BRs des familles à 27 et 28 carbones. La majorité de ces réactions ont été discutées plus haut. Cependant il serait intéressant de s'attarder à la synthèse du composé **31**.

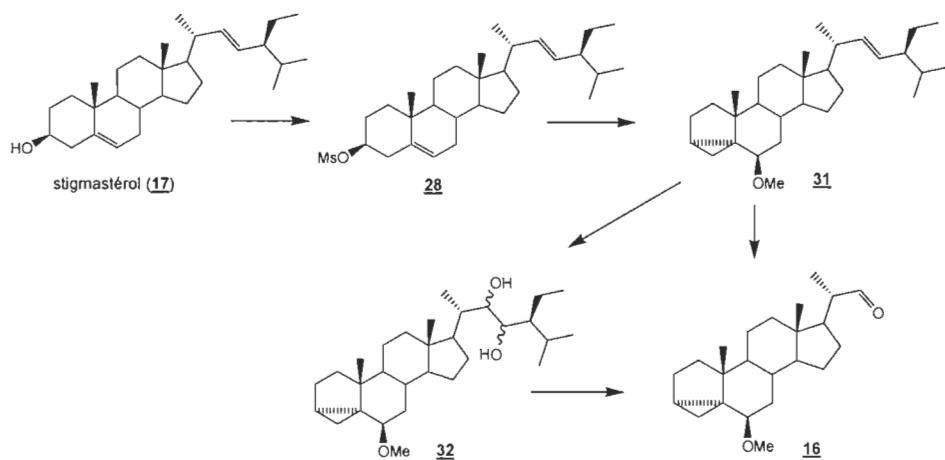


Figure 3.9 Plan de synthèse de l'aldéhyde **16**

### 3.4.1 Réarrangement *iso*-stérol du mésylate de stigmastérol **28**

Nous pouvons constater une ressemblance entre le composé **31** et le composé **29** (section 3.3). En effet, les deux composés proviennent d'un réarrangement particulier communément appelé réarrangement *i*-stérol (ou réarrangement *iso*-stérol) utilisé dans la synthèse des dérivés du cholestérol<sup>(41,42)</sup>. Ce dernier fut tout d'abord effectué sur le cholestérol et ses dérivées. Adams et Winstein<sup>(41,42)</sup> ont montré que lorsque le tosylate de cholestérol (**33**) est porté à reflux dans un mélange acétone/eau en présence de bicarbonate de potassium, on observe la formation de l'alcool **34** possédant le cyclopropane désiré (schéma 3.8).

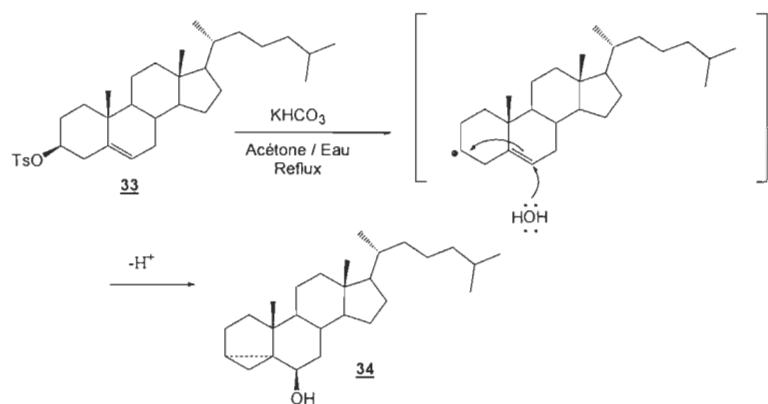
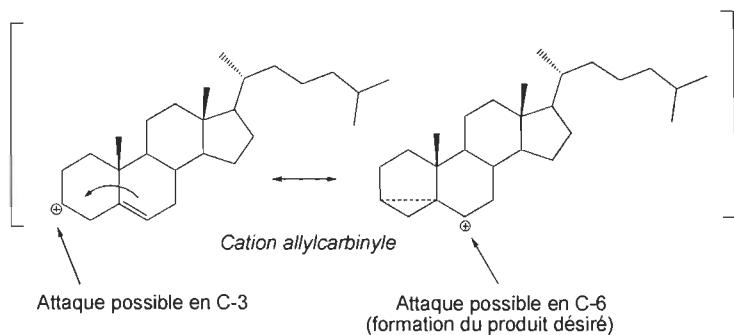


Schéma 3.8

Le groupement cyclopropyle est formé par le déplacement du groupement partant, et ce, avec inversion de la géométrie du carbone chiral. L'eau (ou OH<sup>-</sup>) attaque alors du même côté que le groupe partant<sup>(42)</sup> formant ainsi l'alcool **34**. De plus, Winstein et Adams<sup>(41,42)</sup> ont montré que les réactions de déplacement du tosylate de cholestérol sont environ 100 fois plus rapides que les réactions du tosylate de cyclohexyle. Ils ont suggéré que la double liaison participe au déplacement du groupe partant pour former un cation allylcarbinyle, pour lequel la charge est répartie entre les deux extrémités du cation (figure 3.10).



**Figure 3.10** Possibilité d'attaque par un nucléophile en C-3 et en C-6 sur le cation allylcarbinyle.

Même si les expériences de Winstein et Adams ont montré que le produit le plus stable est celui résultant de l'attaque de l'eau en C-6, il est tout de même logique d'observer comme produit mineur le produit résultant de l'attaque en C-3. D'ailleurs, dans toutes les réactions de ce genre<sup>(43,44)</sup>, on observe bien comme produit mineur celui résultant de l'attaque en C-3.

De la même manière que pour le tosylate de cholestérol (**33**), nous avons procédé au réarrangement *i*-stérol. Puisque la tosylation qui fut effectuée par Martin Boivert dans le laboratoire du Pr Benoit Daoust<sup>(35)</sup> donne un rendement moyen de 75 % pour une première étape d'une synthèse, nous avons plutôt décidé d'effectuer la mésylation du stigmastérol qui nous donne un rendement de 90-97 % (le mésylate, tout comme le tosylate est un bon groupement partant). Pour le cas présent, nous avons inséré un méthoxy en utilisant du méthanol comme nucléophile (même mécanisme que le schéma 3.8, mais en remplaçant le nucléophile  $\text{H}_2\text{O}$  par  $\text{CH}_3\text{OH}$ ). Nous avons alors pu obtenir l'éther méthylé du *i*-stigmastérol (**31**) avec un rendement de 70 % après purification par chromatographie éclair.

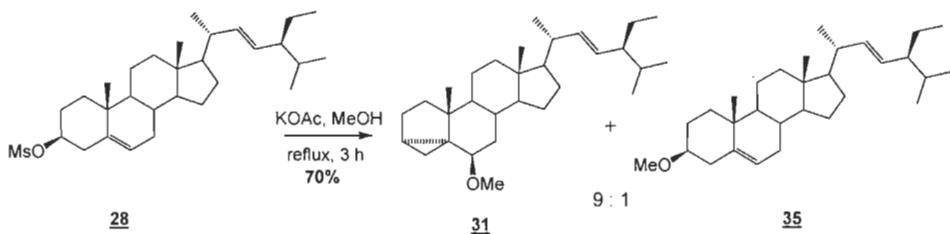
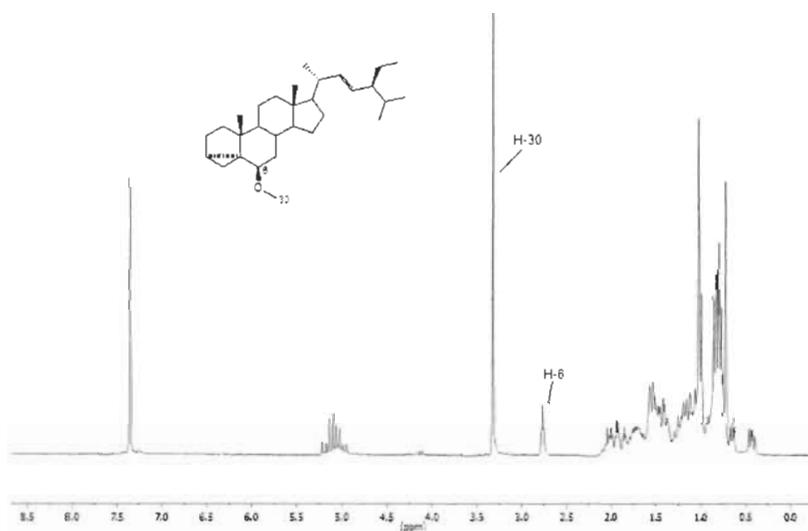


Schéma 3.9

Malheureusement, la réaction forme aussi en moyenne 10 % de l'éther méthylé du stigmastérol (**35**), résultant de l'attaque du méthanol en position C-3. Cela n'est pas surprenant, car rappelons-nous qu'un des intermédiaires de la réaction est un cation allylcarbinyle (figure 3.10) dont la charge positive est délocalisée entre les carbones en C-3 et celui en C-6.

La figure 3.11 montre le spectre RMN  $^1\text{H}$  de l'éther méthylé du i-stigmastérol (**31**) nouvellement formé. Ce spectre nous révèle la présence de deux nouveaux signaux caractéristiques à cette molécule soit le signal à 2,76 ppm correspondant à l'hydrogène en C-6, sous forme d'un triplet, et le signal à 3,32 ppm correspondant aux trois protons du méthoxy, sous forme d'un singulet.

Figure 3.11 Spectre RMN  $^1\text{H}$  200 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) du i-stigmastérol méthyl éther (**31**)

### 3.4.2 Ozonolyse vs dihydroxylation et clivage oxydant menant à l'aldéhyde **16**

L'aldéhyde **14** fut préparé par clivage oxydant et l'aldéhyde **15** par ozonolyse. Dans le cas de l'aldéhyde **16**, nous avons décidé de comparer ces deux méthodes soit l'ozonolyse et le clivage oxydant en passant par la dihydroxylation afin de déterminer laquelle nous donnera le meilleur rendement et le meilleur temps de réaction.

Nous avons constaté que nous obtenons des rendements similaires avec les deux méthodes (43 % pour l'ozonolyse vs 50 % pour le clivage (essai 2) (tableau 3.5). Cependant, l'ozonolyse est préférable puisqu'elle ne prend que quelques minutes comparativement au clivage oxydant (incluant la dihydroxylation) qui prend 10 jours.

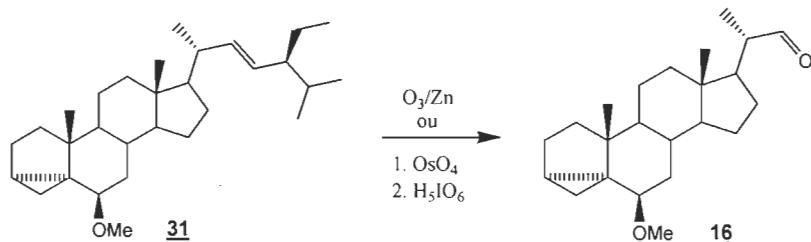


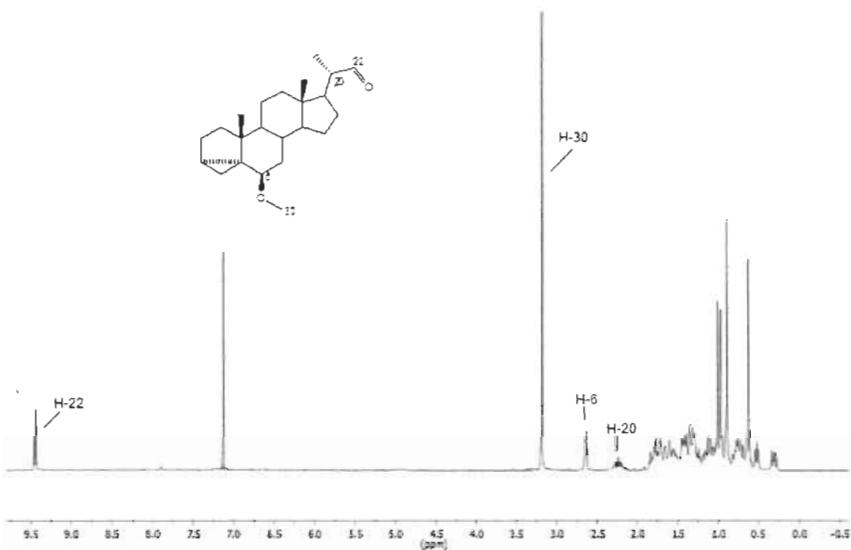
Schéma 3.10

Tableau 3.4  
Comparaison entre l'ozonolyse et le clivage oxydatif

Méthode	Essai	Rendement	Temps
Ozonolyse ( $O_3/Zn$ )	1	43 %	25 min
Clivage oxydant (1. $OsO_4$ , 2. $H_5IO_6$ )	1	20 % (après 2 réactions)	6 jours (dihydroxylation) 3 h (clivage)
	2	50 % (après 2 réactions)	10 jours (dihydroxylation) 3 h (clivage)

La figure 3.12 nous montre le spectre RMN  $^1H$  de l'aldéhyde **16**. Nous constatons l'apparition d'un signal à 9,56 ppm caractéristique de l'hydrogène H-22 de

l'aldéhyde. Ce dernier se présente sous forme d'un doublet puisqu'il est couplé au proton H-20. Nous pouvons aussi observer un nouveau signal sous forme d'un multiplet entre 2,15 et 2,30 ppm. Ce dernier intègre pour un proton. Ce signal est attribué au H-20.



**Figure 3.12** Spectre RMN  $^1\text{H}$  200 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) de l'aldéhyde **16**.

Contrairement à l'aldéhyde **15**, cet aldéhyde est beaucoup plus stable et ne subit pas de dégradation lorsqu'il est conservé au frigo. Nous avons décidé de poursuivre la synthèse avec ce dernier puisqu'en plus de sa stabilité il nous permet de synthétiser rapidement l'aldéhyde en C-22 (3 étapes), contrairement à l'aldéhyde **14** (8 étapes). Nous aurions aimé comparer la réactivité de **14** et de **16** lors de la synthèse de nos 2 familles de BRs (27 et 28 carbones). Malheureusement, le temps imparti pour la maîtrise tirait à sa fin, nous n'avions plus que quelques cinquantaines de milligrammes de l'aldéhyde **14** et nous n'avions plus eu le temps d'entreprendre à nouveau les 8 étapes de synthèse menant à **14**.

Dans le prochain chapitre, nous parlerons, dans un premier temps, de la synthèse de la chaîne latérale des BRs de la famille des 28 carbones en utilisant la chimie des

allylstannanes. Notons qu'afin d'effectuer une étude systématique de réactivité, nous utiliserons l'aldéhyde 16 pour les raisons mentionnées ci-dessus. Dans un deuxième temps, nous parlerons de la synthèse de la chaîne latérale des BRs de la famille des 27 carbones en utilisant la chimie des allyle boranes. Il est à noter que dans ce cas-ci une étude préliminaire de réactivité sera effectuée sur les aldéhydes 14, 15 et 16.

## CHAPITRE IV

### NOUVELLES STRATÉGIES DE SYNTHÈSE DES CHAÎNES LATÉRALES CORRESPONDANT AUX BRASSINOSTÉROÏDES DE LA FAMILLE DES 27 ET 28 CARBONES

#### 4.1 Rétrosynthèse

Comme énoncé au chapitre III, ce chapitre sera dédié à de nouvelles voies de synthèse des chaînes latérales des BRs des familles à 27 et 28 carbones. Ces derniers représentent les familles de BRs les plus abondantes et les plus diversifiées chez les plantes. Malheureusement, ils sont aussi les plus difficiles à préparer. La difficulté de la synthèse de ces composés réside dans la préparation de la chaîne alkyle dihydroxylée de façon stéréosélective. Cette chaîne comporte entre 8 et 10 carbones et possède quatre centres asymétriques contigus. Comme nous l'avons constaté au chapitre précédent, nous avons été en mesure de synthétiser l'aldéhyde [16](#) qui nous permettra d'ajouter différents nucléophiles carbonés afin de reconstruire les chaînes alkyles appropriées pour ces familles.

##### 4.1.1 Rétrosynthèse de la chaîne latérale des BRs de la famille des 28 carbones.

Le schéma 4.1 nous donne un aperçu de la rétrosynthèse qui nous permettrait de reconstruire de manière stéréosélective et efficace la chaîne latérale des BRs de la famille des 28 carbones (le composé représentant cette famille dans le schéma 4.1 est la castatérone).

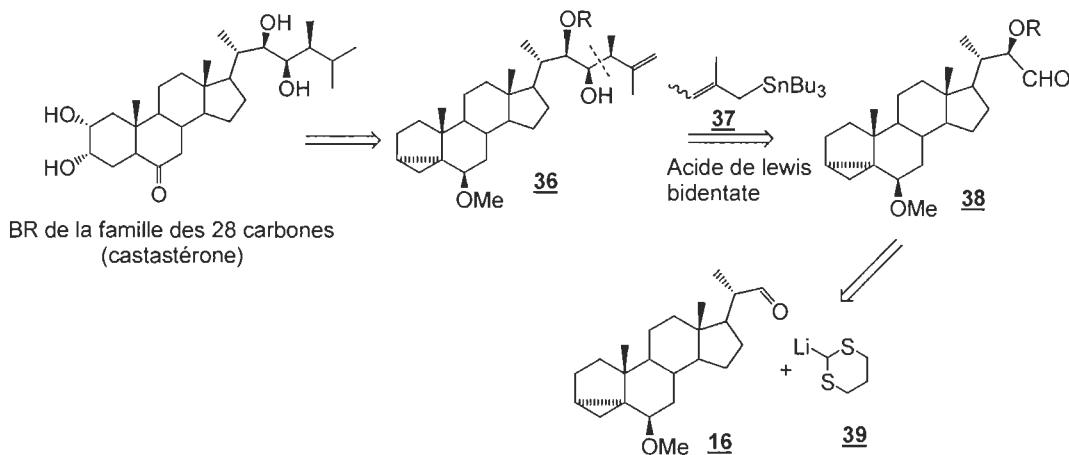


Schéma 4.1

Notre première étape rétrosynthétique, après quelques transformations des cycles A et B ainsi que de légères modifications sur la chaîne, nous amène à l'intermédiaire 36. Pour préparer ce dernier, une étape cruciale de notre stratégie intervient. Nous croyons possible d'effectuer l'insertion stéréosélective des carbones 24 à 26 à l'aide du composé 38 en utilisant la chimie des métaux allyliques ici, le stannane 37 (schéma 4.1). Jusqu'ici ignorés dans la synthèse des brassinostéroïdes, ces derniers sont pourtant bien connus pour permettre la préparation de composés acycliques hydroxylés de façon stéréosélective. Cette sélectivité sera discutée plus en détail à la section 4.2.4. L'intermédiaire 38 quant à lui, pourrait provenir de l'homologation de l'aldéhyde 16 en trois étapes en passant par un dérivé 1,3-dithiane 39 (schéma 4.1).

#### 4.1.2 Rétrosynthèse de la chaîne latérale des BRs de la famille des 27 carbones

Comme pour la rétrosynthèse de la chaîne latérale des BRs de la famille des 28 carbones, la chimie des métaux allyliques pourrait être considérée lors de la synthèse de la chaîne latérale des BRs de la famille des 27 carbones, mais cette fois-ci sans étape d'homologation. Plusieurs chemins pourraient s'offrir à nous afin d'obtenir le produit désiré. Une des méthodes possibles serait tout d'abord

d'effectuer une ozonolyse de la double liaison de **41**. Par la suite, une réaction de Wittig pourrait être envisagée, afin d'obtenir le composé **40** (schéma 4.2).

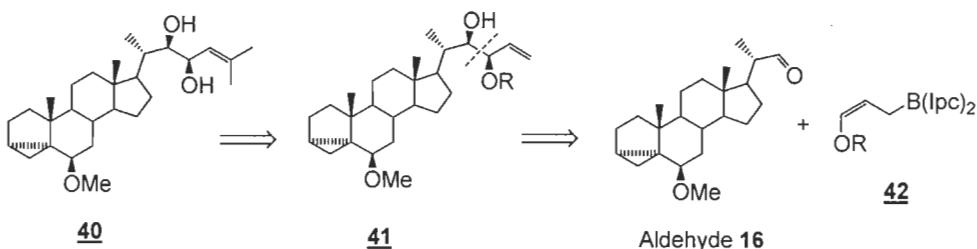
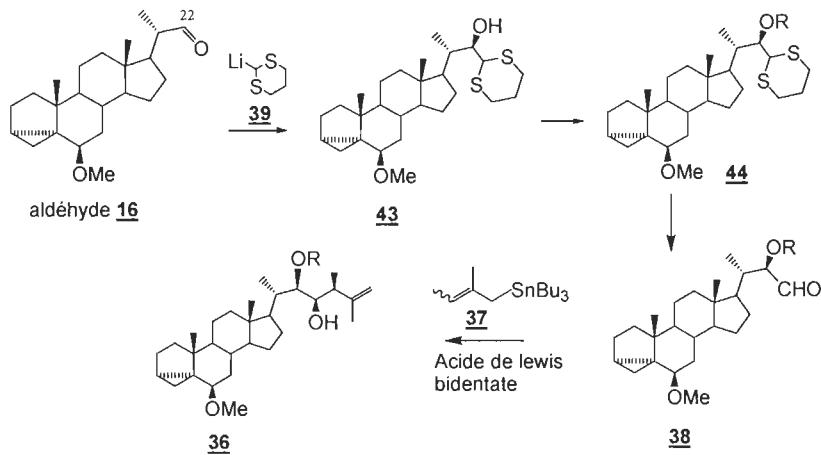


Schéma 4.2

L'intermédiaire **41**, quant à lui, pourrait être synthétisé à partir d'une méthode impliquant l'addition de boranes allyliques **42** sur l'aldéhyde **16** afin d'obtenir une synthèse stéréosélective au niveau des 3 centres asymétriques contigus 21, 22 et 23 avec un minimum d'étape de synthèse (schéma 4.2). Cette chimie n'est pas connue dans la synthèse des brassinostéroïdes. Les raisons nous portant à croire que la bonne stéréochimie sera obtenue seront expliquées dans la section 4.3.1

#### 4.2 Synthèse de la chaîne latérale des BRs de la famille des 28 carbones

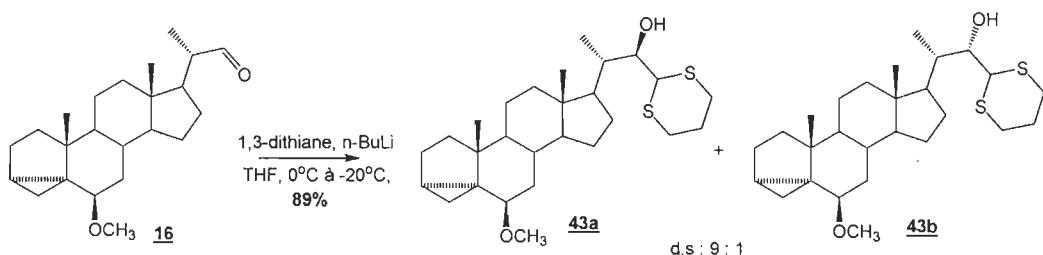
Comme nous l'avons vu à la section 4.1.1, le premier objectif dans la synthèse de cette chaîne latérale réside dans l'homologation de l'aldéhyde **16** en trois étapes en passant par un dérivé 1,3-dithiane afin de parvenir à l'intermédiaire **38** (Figure 4.1). Nous verrons par la suite l'utilisation de la chimie des allylstannanes dans la synthèse de stéroïdes. La figure 4.1 nous montre un aperçu d'une nouvelle stratégie de synthèse que nous pouvons réaliser afin d'obtenir la chaîne latérale des BRs de la famille des 28 carbones.



**Figure 4.1** Plan de la synthèse la chaîne latérale des BRs de la famille des 28 carbones.

#### 4.2.1 Préparation du dithioacétal **43** à partir de l'aldéhyde **16**

L'addition du 2-lithio-1,3-dithiane (**39**) à une fonctionnalité carbonyle flanquée d'un carbone chiral peut être hautement diastéréosélective. Cette réaction fut étudiée lors des synthèses de BRs à partir de composés possédant un aldéhyde en C-22. Plusieurs chercheurs tels que Takatsuto<sup>(45)</sup>, Hazra<sup>(46)</sup> et Wu<sup>(26)</sup>, pour n'en nommer que quelques-uns, ont démontré que l'attaque de l'anion 1,3-dithiane sur l'aldéhyde **16** forme majoritairement le diothioacetal **43a** (schéma 4.3).



### Schéma 4.3

Nous avons effectué la réaction en suivant les conditions de Hazra<sup>(46)</sup>. Dans un premier temps le dithiane est mis à réagir avec le n-BuLi à -20 °C pendant 2 heures,

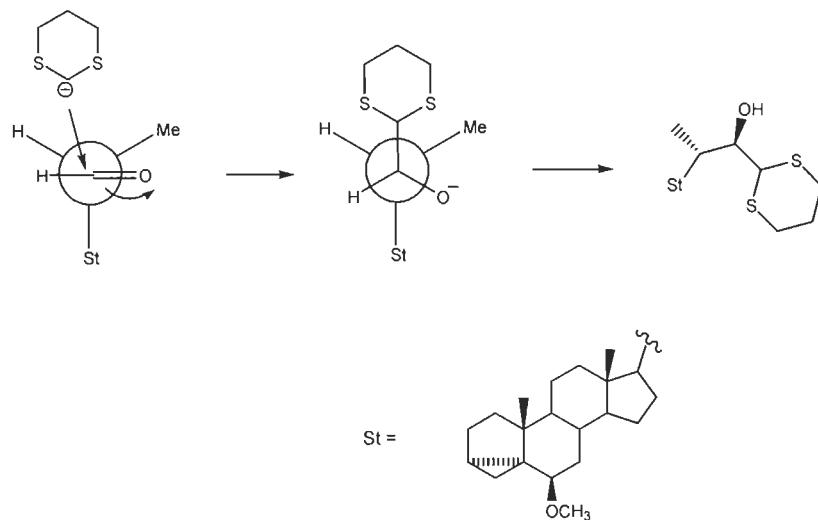
puis dans un deuxième temps ce mélange est additionné à l'aldéhyde **16**. Nous n'avons observé aucune réaction (conservation de l'aldéhyde **16**) (tableau 4.1, essai 1) contrairement à Hazra<sup>(46)</sup> qui a obtenu un rendement de 89 %. Nous avons alors pensé que si nous augmentions le nombre d'équivalents du 1,3-dithiane et du n-BuLi, en conservant la température à -20 °C, il pourrait y avoir une réactivité. Mais, encore une fois, il n'y a pas eu de réaction (conservation de l'aldéhyde **16**), et ce, même après 36h (tableau 4.1, essai 2). Nous avons donc décidé d'effectuer la réaction à température ambiante (tableau 4.1, essai 3), tout en gardant à 2 heures le temps nécessaire pour la première réaction (formation du 2-lithio-1,3-dithiane). Nous avons alors observé la formation du composé **43a** désiré. Puisque cet essai fut réalisé sur de très faibles quantités (15 mg), nous avons décidé de le reproduire dans les mêmes conditions en augmentant les quantités (tableau 4.1, essai 4). Nous avons alors obtenu le composé **43a** avec un rendement de 49 % (70 mg). Nous avons, par la suite, procédé à quelques ajustements (temps pour former le 2-lithio-1,3-dithiane ainsi que le temps de le faire réagir sur l'aldéhyde), afin d'augmenter le rendement. Ces modifications nous ont alors permis d'obtenir la diothioacétal **43a** avec un rendement de 86 % après purification par chromatographie éclair (tableau 4.1, essai 5). Contrairement à Takatsuto<sup>(45)</sup>, Hazra<sup>(46)</sup> et Wu<sup>(26)</sup> qui rapportent avoir eu des diastéréosélectivité de 9 : 1 entre le dithioacétal **43a** et **43b**, nous n'avons pas réussi à observer la présence du composé **43b** ni par RMN <sup>1</sup>H ni par RMN <sup>13</sup>C, et ce, même suite à la purification par chromatographie. La réaction semble être très diastéréosélective, et ce, même à température ambiante.

**Tableau 4.1**  
Réactivité du dithiane avec l'aldéhyde **16**

Essai	Équivalent (dithiane/n-BuLi)	Température (°C)	Temps de la réaction (heures) Étape 1/ Étape 2	Rendement
1	(1.5 éq./1.1 éq.)	-20	2 / 5	Pas de réaction
2	(5 éq. / 5 éq.)	-20	2 / 36	Pas de réaction
3	(5 éq. / 5 éq.)	25	2 / 5	40 %
4	(5 éq. / 5 éq.)	25	2 / 2	49 %
5	(5 éq. / 5 éq.)	25	2 / 2	86 %

Solvant : THF.

La stéréochimie de ce nouveau centre chiral créé en C-22 est conforme à la prédiction de la règle de Felkin-Ahn. La figure 4.2 nous montre l'état de transition la plus favorable pour l'attaque du nucléophile. En effet, l'addition de l'anion du dithiane se fait du côté le moins encombré (ici par le côté de l'hydrogène) en respectant l'angle de Dunitz-Bürgi voisin de 105°.



**Figure 4.2** Stéréochimie de l'addition de l'anion du dithiane.

La figure 4.3 montre l agrandissement du spectre RMN  $^1\text{H}$  du dithioacétal **43a**. Nous observons dans un premier temps, la disparition du proton H-22 de l aldéhyde **16** à 9,58 ppm et l apparition de deux doublets à 3,91 et 3,77 ppm qui correspondent respectivement au proton H-22 et H-23 du dithioacétal **43a**. Ces derniers se présentent sous forme d un système de spin AB avec une constante de couplage de 10,1 Hz. Nous remarquons également la présence de deux nouveaux multiplets entre 3,03 et 2,82 ppm et entre 2,73 et 2,61 ppm correspondant aux signaux des protons H-35 et H-37 du dithiane. Le signal à 2,38 ppm représenterait, quant à lui, le proton de l hydroxy en C-22. Notons également qu en RMN  $^{13}\text{C}$  nous n observons aucun dédoublement de carbones et que le nombre de carbones correspond bien au composé **43a** (absence de diastéréoisomère).

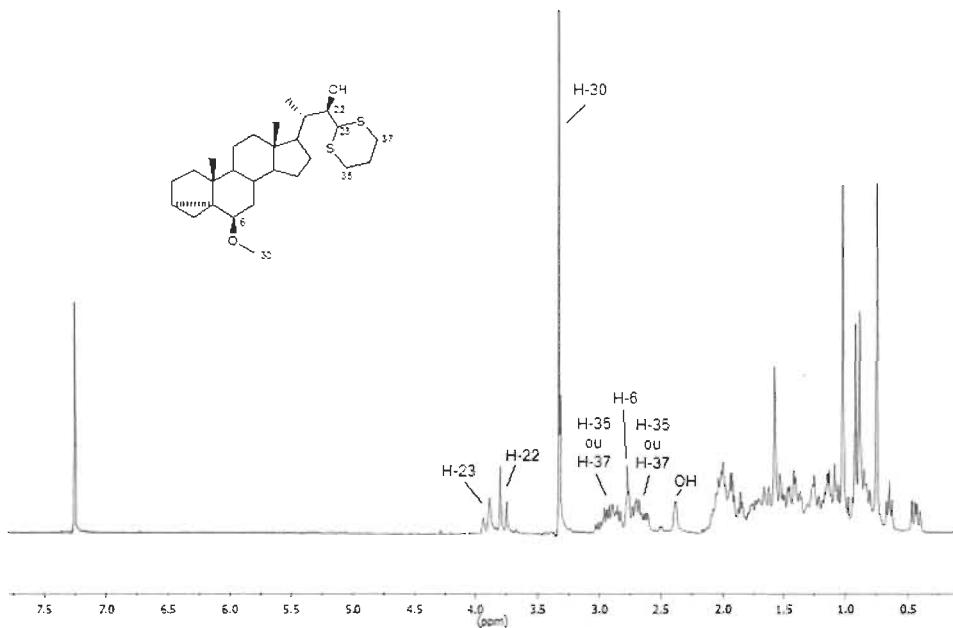
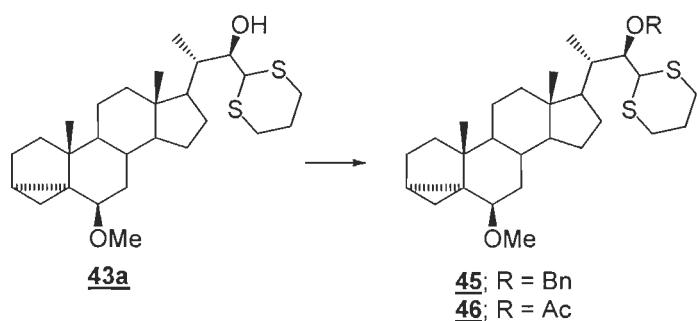


Figure 4.3 Spectre RMN  $^1\text{H}$  200 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) du diothioacétal **43a**.

#### 4.2.2 Protection du groupement hydroxyle du dithioacétal **43a**

La protection du groupe hydroxyle du dithioacétal **43a** (schéma 4.4) est nécessaire avant la transformation de la fonctionnalité dithiacétal en aldéhyde afin d éviter la

réaction connue des  $\alpha$ -hydroxy aldéhydes dans les conditions expérimentales requises pour la déthioacétalisation.



#### Schéma 4.4

**Tableau 4.2**  
Protection de la fonction hydroxyle du dithioacétal **43a**

Essai	Réactif (et équivalent)	Base (et équivalent)	Temps (heures)	Rendement
1	BnBr (2 éq.)	NaH (1.2 éq.)	24 h	Pas le produit désiré
2	BnBr (2 éq.)	NaH (2.2 éq.)	24 h	Pas le produit désiré
3	BnBr (2 éq.)	NaH (3.4 éq.)	24 h	Pas le produit désiré
4	Ac <sub>2</sub> O (excès)	Pyridine (excès)	16 h	73-84 %

En premier lieu, nous avions décidé d'opter pour une protection à l'aide d'un groupement benzyle. L'intérêt de ce groupe protecteur réside dans sa capacité à participer à la formation de chélate avec l'aldéhyde en C-23 lors de la réaction avec les métaux allyliques en présence d'un acide de Lewis bidentate comme nous allons le voir dans la section 4.2.4. Nous avons réalisé alors un premier essai en utilisant 1,2 éq. d'hydrure de sodium (tableau 4.2 essai 1). Cependant, nous avons remarqué que la réaction semblait ne plus progresser après 5h et que le produit majoritaire reste le dithioacétal **43a**. Nous avons déduit que ce problème pouvait être dû au manque d'hydrure de sodium dans le milieu. Nous avons alors augmenté le nombre d'équivalents d'hydrure de sodium à 2,2 éq. (tableau 4.2 essai 2). Nous avons alors

observé la formation d'un produit moins polaire ( $R_f = 0,64$ ) que le dithioacétal 43a ( $R_f = 0,47$ ). En analysant le spectre RMN  $^1H$  du produit brut, nous avons observé la présence de nouveaux signaux dans la région des aromatiques. Cependant, nous avons également observé une disparition des protons du dithiane. Il était donc clair que nous n'avions pas le produit désiré. Nous avons alors réalisé un dernier essai en utilisant 3,4 éq. d'hydrure de sodium (tableau 4.2 essai 3). Nous avons observé cette fois-ci la conservation des signaux du dithiane en RMN  $^1H$ , cependant nous n'avions pas de signaux dans la région des aromatiques. De plus, suite à une comparaison minutieuse du spectre RMN  $^1H$  de notre brut avec le spectre RMN  $^1H$  du produit de départ 43a, il était clair que 43a était absent de ce brut. Nous avons tenté d'élucider la structure de ce dernier, cependant nous n'avons pas réussi à le caractériser. Le temps nous pressant et la réaction de benzylation semblant capricieuse, nous avons décidé de protéger cette fonction hydroxy à l'aide d'un groupement acétate déjà connu dans la chimie des BRs<sup>(46)</sup>. Malgré le fait que l'oxygène sur un acétate est moins basique, nous croyons qu'il serait tout de même possible qu'il y ait complexation en présence d'un acide de Lewis comme l'a démontré Raghavan<sup>(47)</sup>. Cette transformation est simple, rapide et fournit un bon rendement (tableau 4.2, essai 4). Il ne suffit que de faire réagir 16 avec l'anhydride acétique, dans la pyridine à température ambiante pendant 16 heures afin d'obtenir le composé 46 avec un rendement de 73 à 86 % après extraction (conditions de Hazra<sup>(46)</sup>). Aucune purification supplémentaire n'est nécessaire. Il est à noter que nous avons également préparé cet acétate à partir du stigmastérol en n'effectuant qu'une seule purification par chromatographie éclaire à la fin (5 étapes). Nous avons alors obtenu un rendement global de 16 % comparativement un rendement global de 36 % lorsqu'on a effectué les purifications au fur et à mesure. Il semble donc que cette voie sans purification ne soit pas avantageuse dans ce cas.

La figure 4.4 montre le spectre RMN  $^1H$  du dithioacétal protégé 46. Nous remarquons la présence d'un nouveau signal à 2,08 ppm sous forme d'un singulet qui correspondrait aux protons H-39 de l'acétate, ainsi que la disparition du signal du proton de l'alcool à 2,38 ppm. De plus, nous pouvons observer le déblingage du

proton H-22 passant de 3,91 à 5,39 ppm ce qui est cohérent avec le fait de passer d'un alcool à un acétal comme groupement voisin<sup>(46,48)</sup>. Le signal se présente maintenant sous forme d'un doublet de doublet contrairement au dithioacétale non protégé **43a** dans lequel ce signal était sous forme d'un doublet. Il semble que la présence de l'acétal nous permet maintenant de voir le couplage entre le H-22 et le H-20 avec une constante de couplage de 1,9 Hz.

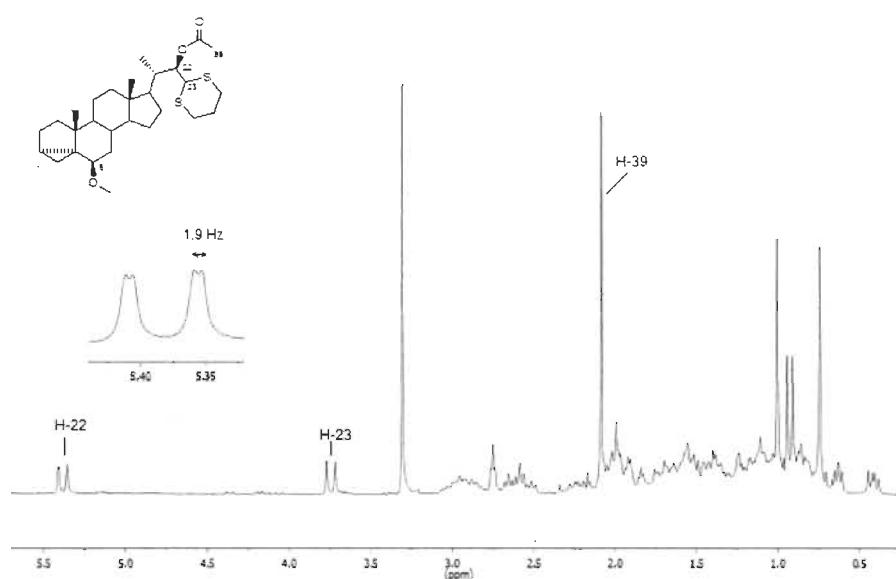


Figure 4.4 Spectre RMN  $^1\text{H}$  200 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) de **46**.

#### 4.2.3 Déthioacétalisation du dithioacétal protégé **46** menant à l'aldéhyde **38**

Nous sommes à présent à une étape d'obtenir l'aldéhyde **38** qui nous permettra de synthétiser la chaîne latérale des BRs de la famille des 28 carbones. Plusieurs voies de déthioacétalisation (permettant de transformer le dithioacétal en carboxaldéhyde) existent dans la littérature<sup>(46,49,50)</sup>. Nous avons décidé d'explorer les deux voies les plus communément utilisées dans la synthèse des BRs, toujours dans le but d'optimiser les rendements et de diminuer le temps de la réaction.

Dans un premier temps, nous avons procédé à la déthioacétalisation en utilisant les conditions de Wu<sup>(51)</sup> (tableau 4.3, essai 1). Nous avons alors obtenu un rendement faible de 35 %. Malgré qu'en CCM nous avions observé une disparition quasi-totale du dithioacétal protégé **46**, la RMN <sup>1</sup>H du brut nous a indiqué la présence du produit de départ en quantité appréciable. Nous avons donc décidé de reproduire la réaction en doublant le temps de réaction (tableau 4.3, essai 2). Malheureusement, nous n'avons obtenu qu'un rendement de 40 %. Nous avons alors attribué ces rendements faibles au fait qu'il se produit des réactions secondaires indésirables (plusieurs taches observées en CCM). Nous avons alors décidé de changer de stratégie et d'opter pour des conditions qui nous semblaient plus douces, soit l'utilisation du carbonate de barium et du N-bromosuccinimide<sup>(46)</sup>. Lors du premier essai, nous n'avons obtenu qu'un rendement 20 % (tableau 4.3, essai 3). Or, dans la littérature<sup>(46)</sup>, on rapporte des rendements de 96 %. Nous avons remarqué que le problème se posait au niveau de l'extraction, car en CCM la réaction semblait former un seul produit. Suite à quelques modifications que nous avons pu apporter à cette extraction (voir section expérimentale), nous avons réussi à obtenir l'aldéhyde **38** avec un rendement de 80 % (tableau 4.3, essai 4). Suite à ces modifications, nous avons effectué cette réaction avec une plus grande quantité afin de minimiser les pertes engendrées par les filtrations, et par le même fait obtenir plus de produits pour les réactions subséquentes. Nous avons alors obtenu l'aldéhyde **38** avec un rendement de 93 % après 45 min de réaction (tableau 4.3, essai 5). Aucune purification supplémentaire n'est nécessaire.

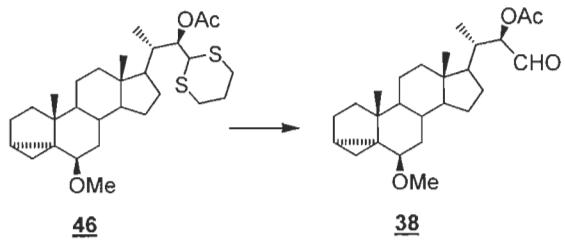
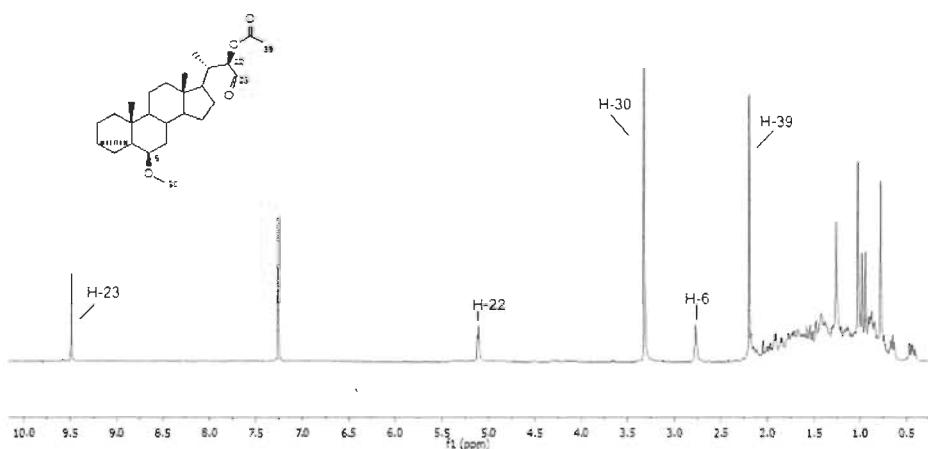


Schéma 4.5

**Tableau 4.3**  
Déthioacetalisation du dithioacétal protégé **46**

Essai	Conditions	Temps	Rendement
1	HgO (3 éq)/ $\text{BF}_3\text{OEt}_2$ (3 éq)	4 h	35 %
2	HgO (3 éq)/ $\text{BF}_3\text{OEt}_2$ (3 éq)	8 h	40 %
3	$\text{BaCO}_3$ (15 éq)/ NBS (15 éq)	0,5 h	20 %
4	$\text{BaCO}_3$ (15 éq)/ NBS (15 éq)	0,75 h	80 %
5	$\text{BaCO}_3$ (15 éq)/ NBS (15 éq)	0,75 h	93 %

La figure 4.5 nous montre le spectre RMN  $^1\text{H}$  de l'aldéhyde **38**. Nous constatons l'apparition d'un signal à 9,49 ppm caractéristique de l'hydrogène H-23 de l'aldéhyde. Ce dernier se présente sous forme d'un singulet, contrairement aux hydrogènes des aldéhydes en C-22 que nous avons précédemment observés (voir chapitre III). Le proton H-22, quant à lui, se présente sous forme d'un doublet à 5,11 ppm, avec une constante de couplage de 1,9 Hz. Cette constante est caractéristique d'un couplage H-22 et H-20 chez les BRs (voir p. 100). Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  montre l'apparition d'un nouveau signal à 199,3 ppm qui représenterait le carbone C-23 de l'aldéhyde. Donc, nous sommes bien en présence de l'aldéhyde **38**.



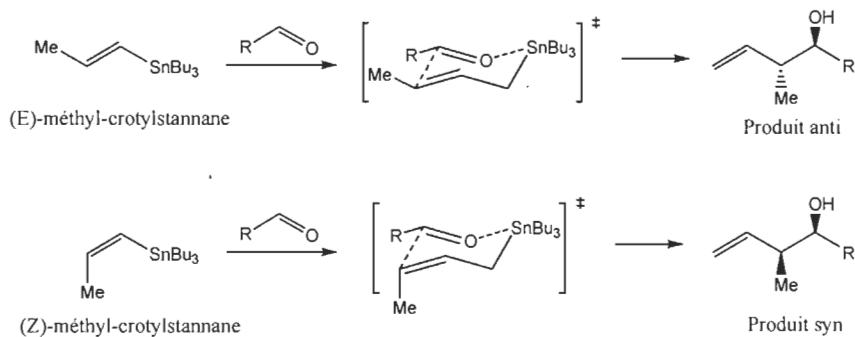
**Figure 4.5** Spectre RMN  $^1\text{H}$  200 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) de l'aldéhyde **38**

#### 4.2.4 Synthèse de l'intermédiaire **36** en utilisant la chimie des métaux allyliques

Le développement de la catalyse asymétrique, en particulier pour la formation de liaisons carbone-carbone, est l'une des plus difficiles en synthèse organique. L'addition d'un réactif organométallique à un carbonyle est d'une utilité considérable dans la synthèse stéréocontrôlée de composé acyclique. Parmi les divers réactifs organométalliques qui ont été utilisés avec succès, les allylstannanes peuvent réagir de manière stéréosélective avec les aldéhydes. Ainsi, avant de discuter plus précisément de notre stratégie de synthèse, il serait pertinent de comprendre la réactivité et la sélectivité induite par l'application de tels composés lors d'une synthèse.

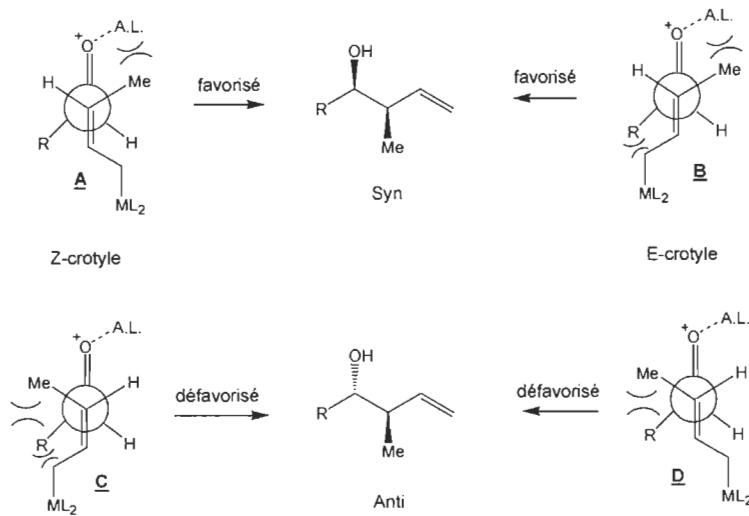
Les états de transition par lesquels passent ces réactifs dépendent en grande partie de la présence ou l'absence d'acide de Lewis (A.L.) dans le milieu. La nature de l'aldéhyde peut également jouer un rôle dans certains cas particuliers (exemple : aldéhyde  $\alpha$ -hydroxylé). Cependant, l'addition a toujours lieu via un mécanisme concerté, impliquant la dissociation de l'étain et la formation de liaisons C-C en position  $\gamma$ .

La réaction d'un aldéhyde avec un stannane sans acide de Lewis peut conduire à une certaine stéréosélection (syn versus anti). En effet, les produits s'additionnent en passant par un état de transition cyclique à six membres, dans lequel l'étain sert d'élément d'organisation. La configuration de la double liaison dans l'allylstannane contrôle le sens de la diastéréosélectivité de la réaction. Donc, lorsqu'on est en présence du (E)-crotylstannane le produit majoritairement formé est le produit trans et le produit devient cis lorsque c'est le (Z)-crotylstannane qui est utilisé (figure 4.6).



**Figure 4.6** État de transition cyclique d'un aldéhyde avec l'crotylstannane sans présence d'acide de Lewis.

Dans le cas où il y a présence d'acide de Lewis la réaction se produit via un état de transition ouvert puisque l'acide de Lewis vient complexer l'aldéhyde et donc il devient impossible pour ce dernier de se complexer avec l'étain afin de former l'état de transition décrit dans la figure 4.6. Le model de Felkin-Anh est indépendant de l'état de transition. La figure 4.7 montre les états de transitions possibles pour l'addition de groupements (Z)-crotyle et (E)-crotyle.



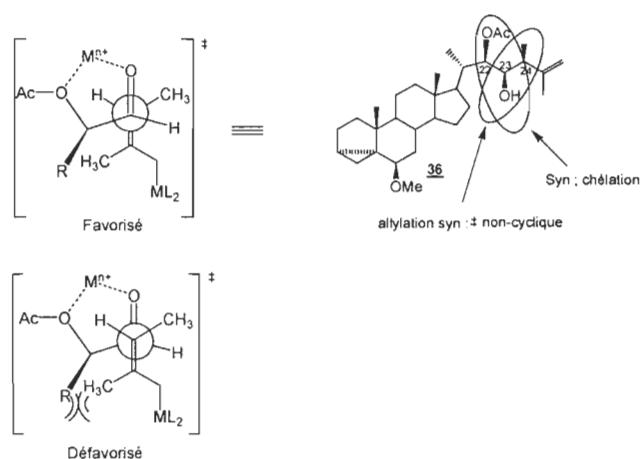
**Figure 4.7** État de transition non cyclique de l'addition d'un groupement crotyle (E et Z) sur un aldéhyde en présence d'un acide de Lewis (A.L.).

Premièrement, nous pouvons remarquer que l'acide de Lewis a tendance à se placer du côté opposé au groupement R dans les quatre états de transition afin de minimiser les effets stériques. Observons d'abord la réaction avec le Z-crotylstannane. Nous pouvons remarquer que l'état de transition C est fortement défavorisé à cause de l'interaction gauche entre le groupement R de l'aldéhyde et le groupe Me du fragment crotyle. De plus, il existe une répulsion stérique entre le groupement R et le groupe CH<sub>2</sub> du fragment crotyle. Cet état de transition est énergétiquement élevé, il est donc défavorisé. L'état de transition A semble être plus bas en énergie puisque seul un faible encombrement stérique existe entre l'A.L. et le groupe Me du fragment crotyle. Si nous observons maintenant la réaction avec le E-crotylstannane, nous pouvons remarquer encore une fois l'interaction gauche (très défavorisée) qui a lieu dans l'état de transition D entre le groupement R de l'aldéhyde et le groupe Me du fragment crotyle. L'état de transition B devrait être favorisé lors de cette réaction. Il existe en effet deux encombrements stériques pour cet état de transition, mais ceux-ci sont moins importants que l'effet gauche observé en D.

Nous venons de voir comment nous pouvons contrôler la sélectivité relative, en partant avec un aldéhyde achiral. Ainsi, comme nous avons pu démontrer précédemment (figure 4.7), le produit syn est le produit majoritaire, et ce, indépendamment de la géométrie de l'alcène. Malheureusement, avec un aldéhyde achiral, il est impossible de contrôler la stéréochimie absolue des nouveaux centres chiraux puisque l'attaque par en arrière ou par en avant est équivalente.

Dans le cas d'un aldéhyde chiral, possédant un groupement  $\alpha$ -hydroxylé comme l'aldéhyde 38, les états de transitions montrés à la figure 4.7 s'appliquent. Cependant, un autre phénomène est également possible, à savoir la chélation qui est induite par l'introduction d'un acide de Lewis bidentale, ce qui rend une des faces plus accessible. La chélation est la coordination sur le même atome métallique (acide de Lewis) de deux hétéroatomes portant des doublets libres. La conformation la plus peuplée ne suit plus alors le modèle de Felkin-Anh, mais préfère placer le

groupement  $\alpha$ -hydroxy le plus près possible de l'oxygène du carbonyle. De cette façon, l'acide de Lewis peut faire un pont entre les deux hétéroatomes. Cette conformation est la plus peuplée parce qu'elle est stabilisée par la chélation et c'est aussi la plus réactive parce que l'acide de Lewis augmente la réactivité du groupement carbonyle<sup>(50)</sup>.



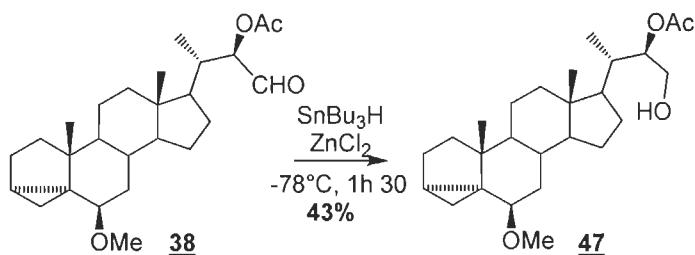
**Figure 4.8** États de transitions théoriques de l'alkylation de l'aldéhyde 38 menant à 36.

Nous pouvons constater, à la figure 4.8, que lorsqu'il y a chélation entre l'aldéhyde 38 et l' $\alpha$ -acétoxyde, le groupement R, qui représente le corps stéroïdien, pointe par en avant. Ainsi l'aldéhyde peut sélectivement être alkylé par la face arrière, afin d'éviter l'encombrement stérique avec le groupement R. Cela se fait en ajoutant des nucléophiles doux tels que les allylstannanes qui ne détruisent pas la chélation<sup>(52)</sup>. Ce phénomène de chélation peut se produire uniquement en présence d'acides de Lewis (cation métallique) qui préfèrent se coordonner à deux hétéroatomes à la fois.

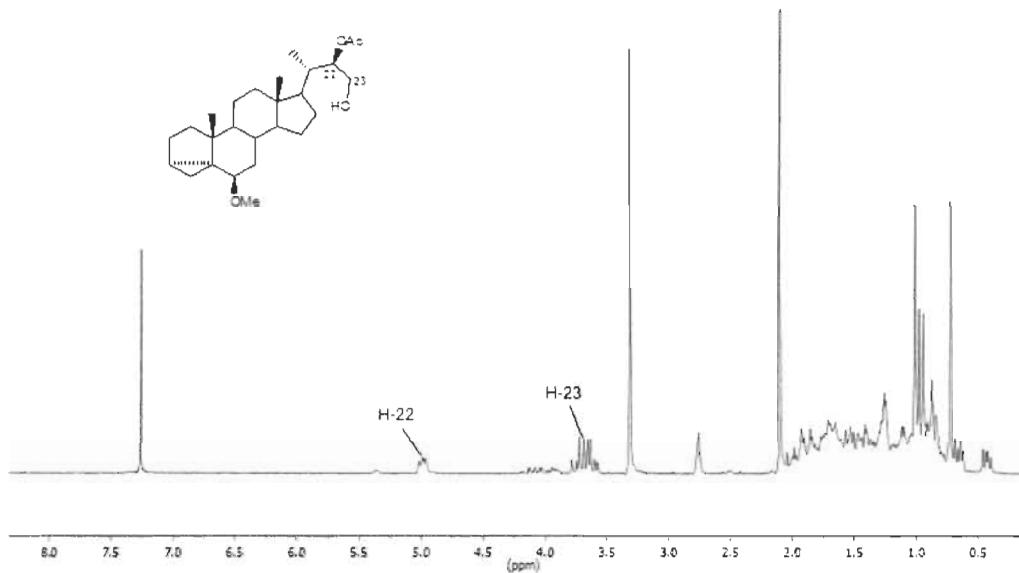
Ainsi, si nous réalisions la synthèse à partir de l'aldéhyde 38, qui est  $\alpha$ -acétoxylé, nous pourrions alors espérer avoir un contrôle sur la stéréochimie des carbones C-22, C-23 et C-24. Dans un premier temps, nous avons décidé de faire une étude de la réactivité des composés stannylés vis-à-vis les BRs puisqu'à notre

connaissance nous sommes les premiers à étudier cette réactivité sur les BRs. Pour ce faire, nous avons décidé de tester dans un premier temps l'hydrure de stannylique, le plus simple des nucléophiles stannyliés (NB. Le produit résultant sera un candidat intéressant pour notre étude biologique). En second lieu, nous avons opté pour l'utilisation d'un composé stannylié facile d'accès l'allyltributylstannane, disponible commercialement (ce qui n'est pas le cas pour le stannane 37). Finalement, nous pourrons tester la réactivité du stannane 37 avec l'aldéhyde 38 nous permettant ainsi de reconstruire la chaîne latérale des BRs de la famille des 28 carbones.

La réduction, avec l'hydrure de tributylétain, de l'aldéhyde 38, afin de former l'alcool 47, est simple et rapide. Il ne suffit que de faire réagir 38 avec le  $\text{ZnCl}_2$  et l'hydrure de stannane dans du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  à  $-78^\circ\text{C}$  pendant 1h 30 pour obtenir 47 avec un rendement de 43 % après purification par chromatographie éclair (schéma 4.6). Notons que cette réaction a été réalisée une seule fois et qu'elle pourrait potentiellement être optimisée.

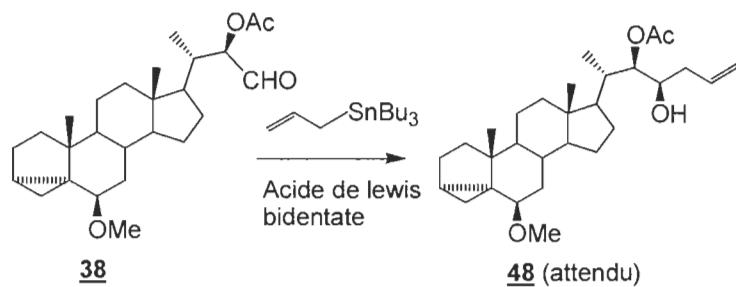


le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  et l'apparition d'un signal à 78,5 ppm correspondrait bien à la réduction de l'aldéhyde **38** en alcool **47**.



**Figure 4.9** Spectre RMN  $^1\text{H}$  200 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) de l'alcool **47**.

Nous avons ensuite procédé aux essais de la réactivité de l'aldéhyde **38** en l'utilisant l'allyltributylstannane (schéma 4.7) qui rappelons-le, en plus d'être commercial, est reconnu pour avoir une grande réactivité. Le tableau 4.4 nous montre un résumé des essais réalisé à cette fin.



**Schéma 4.7**

**Tableau 4.4**  
Réactivité de l'aldéhyde 38 avec d'allylstannanes en utilisant  
différents acides de Lewis

Essai	Acide de Lewis (éq)	Éq. de allyltributyl-stannane	Température (°C)	Temps (heure)	Produit formé (rendement)
1	ZnCl <sub>2</sub> (2 éq)	2 éq	-78 °C	5 h	Pas de réaction
2	MgBr <sub>2</sub> (2 éq)	2 éq	-78 °C (4h) Tp (24 h)	28 h	Pas de réaction
3	MgBr <sub>2</sub> (2 éq)	2 éq	Reflux (55 °C)	10 h	Dégradation
4	BF <sub>3</sub> ·OEt <sub>2</sub> (2 éq)	2 éq	-78 °C à tp.	2 h 30	Double substitution, composé <u>49</u> (27 %)
5	BF <sub>3</sub> ·OEt <sub>2</sub> (2 éq)	1.05 éq	-78 °C à tp.	2 h	monosubstitution (41 %)

Nous avons, dans un premier temps, utilisé le ZnCl<sub>2</sub> (tableau 4.4 essai 1) comme acide de Lewis bidentale afin d'induire la chélation entre l'aldéhyde 38 et l'α-acétate qui rappelons-le, est nécessaire pour nous permettre un contrôle sur la stéréochimie des carbones C-22, C-23 et C-24 (voir figure 4.8). Nous avons donc procédé à la réaction en utilisant les conditions de Breit<sup>(53)</sup>. Nous avons été déçus de ne voir aucune réactivité (conservation de l'aldéhyde 38), et ce, même après 5 h de réaction. Nous avons alors opté pour l'utilisation du bromure de magnésium (MgBr<sub>2</sub>), un autre acide de Lewis bidentate (tableau 4.4, essai 2). Dans les conditions standards de la réaction, nous n'avons eu aucune réactivité (conservation de l'aldéhyde 38) à -78 °C, et ce, même après 4 h. Nous avons alors laissé la réaction à température ambiante pendant 24 h, toujours aucune réactivité n'a pu être observée (conservation de l'aldéhyde 38). Nous avons décidé de « forcer » la réaction en portant cette dernière à reflux (tableau 4.4, essai 3). Malheureusement, nous avons constaté une dégradation considérable de l'aldéhyde 38. Nous avons alors décidé d'utiliser le BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> comme acide de Lewis. Ce dernier est un acide de Lewis fort et devrait permettre d'observer une réactivité. Évidemment, BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> n'est pas un acide de Lewis bidentate, ne devrait pas permettre de chélation et donc ne mènera

pas à la bonne stéréochimie désirée. Mais ici, ce que nous voulons observer, c'est s'il est possible d'ajouter un allylstannane sur l'aldéhyde **38**. Comme indiqué dans le tableau 4.4, essai 4, en utilisant deux équivalents de l'éthérate de trifluorure de bore ( $\text{BF}_3\text{OEt}_2$ ) et deux équivalents de l'allyltributylstannane (comme nous l'avions fait pour les bidentates), nous avons observé en CCM la présence d'une nouvelle tache majoritaire moins polaire ( $R_f = 0,55$ ) que l'aldéhyde **38** ( $R_f = 0,42$ ). Suite à une purification par chromatographie éclair, nous avons procédé à une analyse de ce produit nouvellement obtenu. La RMN  $^1\text{H}$ , nous a confirmé la disparition du signal à 9,49 ppm appartenant au proton de l'aldéhyde en C-23 et l'apparition d'un multiplet entre 3,6 et 3,8 ppm. Ce multiplet pourrait correspondre au proton H-23 voisin d'un hydroxyle. Nous observons également l'apparition de signaux des protons alcéniques entre 4,8 et 5,9 ppm qui, si l'on se fit au calcul d'intégration, correspondrait à six protons alcéniques et au proton H-22 qui apparaissait déjà dans cette région (voir figure 4.9). Or, l'introduction d'une seule chaîne allylique devrait nous donner une intégration de trois protons alcéniques dans cette région et non pas six! Nous avons conclu que nous avons donc eu une double substitution (dû à la présence de 2 éq. de nucléophile). La RMN  $^{13}\text{C}$  nous indique également la présence de quatre carbones dans la région des carbones alcéniques en plus de confirmer que l'on a bien isolé un seul diastéréoisomère. La présence en RMN  $^1\text{H}$  des protons à 0,10 et 0,41 ppm qui sont des signaux caractéristiques de la présence du cyclopropyle (dans le cycle A) dans la molécule, nous amène à penser que le produit formé serait le diadduit **49** (figure 4.10). Notons que nous avons isolé, en très faible quantité (2 mg, soit environ 10 %), ce qui nous semble être en RMN  $^1\text{H}$ , un autre diastéréoisomère.

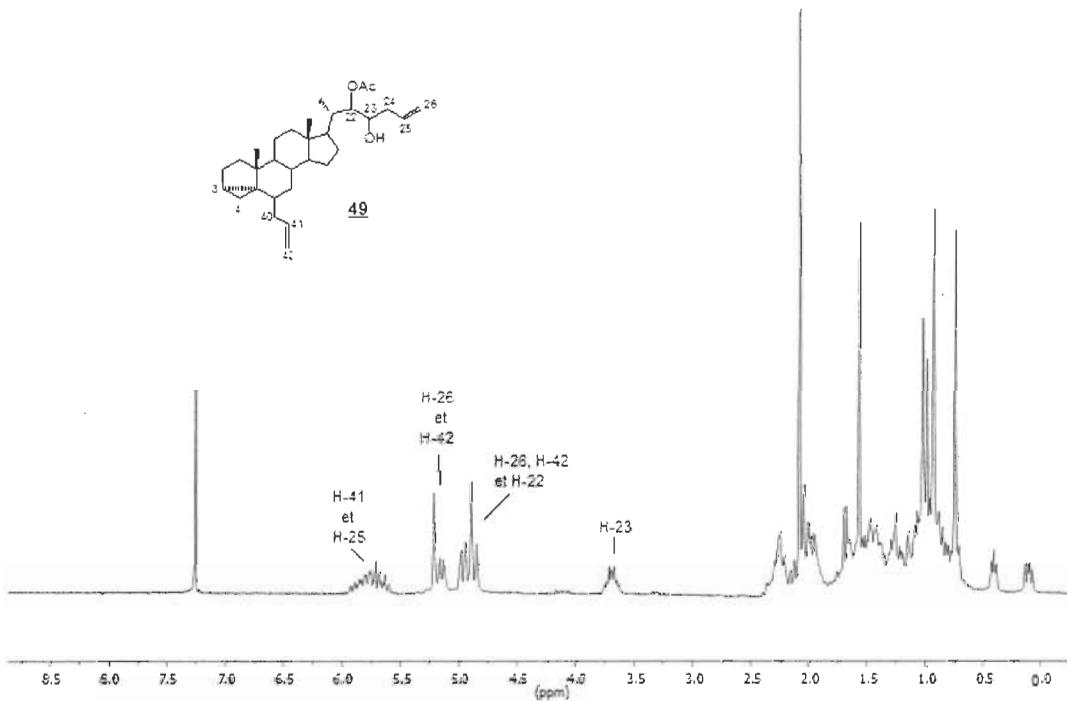
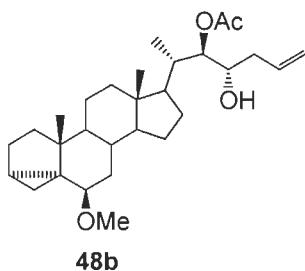


Figure 4.10 Spectre RMN  $^1\text{H}$  200 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) du composé diadduit **49**.

Nous avons, par conséquent, repris la réaction en utilisant cette fois-ci 1,05 éq d'allyltributylstannane (tableau 4.4, essai 5) afin de contrôler la réactivité. Croyant que l'aldéhyde serait la fonction la plus électrophile de la molécule, l'utilisation de 1,05 éq du stannane devrait nous mener au composé **48b** (figure 4.11). Nous avons observé l'apparition en CCM d'une nouvelle tache majoritaire qui était, cette fois-ci, plus polaire que l'aldéhyde **38** ( $\text{Rf} = 0,10$ ). À notre grande surprise, la RMN  $^1\text{H}$  du produit brut, nous indiquait la la rétention du proton de l'aldéhyde en C-23. Nous avons également observé l'apparition de signaux des protons alcéniques entre 4,8 et 5,9 ppm qui selon le calcul d'intégration, correspondrait à trois protons alcéniques. Il y a donc eu addition du nucléophile, mais rétention du groupement aldéhyde. Le nucléophile a donc additionné sur une autre fonction électrophile que l'aldéhyde. La seule autre possibilité, semble donc être la fonctionnalité cyclopropyle-OMe des cycles A et B. Cependant, à partir du RMN  $^1\text{H}$  du brut, nous n'avons pas réussi à conclure avec certitude si l'attaque avait eu lieu sur le C-6 ou le C-3. Pour y arriver,

nous avons effectué une purification par chromatographie éclair. Malheureusement, nous avons constaté que le produit s'est dégradé dans la colonne.

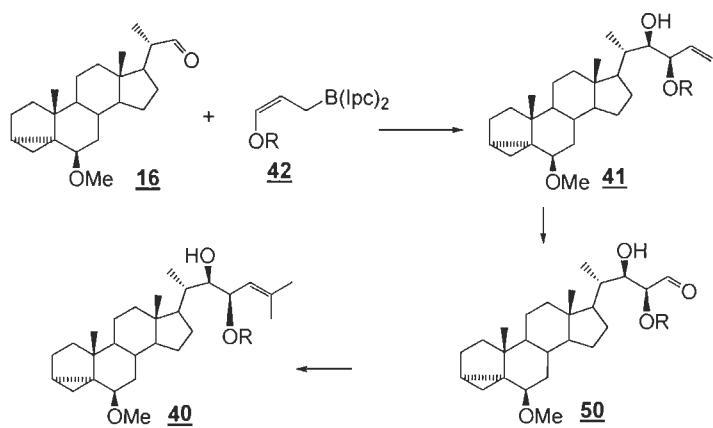


**Figure 4.11** Produit **48b** attendu en utilisant 1,05 éq d'allyltributylstannane et  $\text{BF}_3\text{:OEt}_2$  comme acide de Lewis.

En conclusion, malgré le fait que l'aldéhyde **38** est un des aldéhydes les plus utilisés pour les substituants nucléophiles dans la chimie des BRs<sup>(18)</sup>, dans ce cas précis, il semblerait plus adéquat d'opter pour l'utilisation d'un aldéhyde ne possédant pas les fonctionnalités présentes dans les cycles A et B (cyclopropyle, OMe) du composé **38** (qui semble être plus électrophile que la fonction aldéhyde en C-23). L'aldéhyde **14** serait un candidat plus intéressant, puisqu'en plus de ne pas avoir de méthoxy en C-6, il possède déjà les fonctionnalités requises chez les BRs dans les cycles A et B. Cependant, nous n'avions plus d'aldéhyde **14** et nous n'avions plus de temps (alloué pour cette maîtrise) pour en refaire. Il serait néanmoins intéressant dans un projet futur d'explorer cette voie en testant aussi une plus grande variété d'acide de Lewis bidentate. La prochaine étape sera donc d'étudier la réactivité du composé possédant un aldéhyde en C-23 dérivant de l'aldéhyde **14** avec l'allyltributylstannane. De plus, nous avons aussi l'intention d'explorer une plus grande variété d'acide de Lewis bidentate. Il sera ensuite temps d'étudier la réactivité avec le stannane **37** afin de former la chaîne latérale de la famille des BRs à 28 carbones.

### 4.3 Synthèse de la chaîne latérale des BRs de la famille des 27 carbones

Comme pour les BRs de la famille des 28 carbones, la chimie des métaux allyliques pourrait être considérée lors de la synthèse de la chaîne latérale des BRs de la famille des 27 carbones. La figure 4.12 nous montre un aperçu d'une stratégie de synthèse que nous pouvons réaliser afin d'obtenir la chaîne latérale des BRs de la famille des 27 carbones.



**Figure 4.12** Plan de la synthèse de la chaîne latérale des BRs de la famille des 27 carbones.

En partant de l'aldéhyde **16**, l'intermédiaire **41** pourrait être synthétisé à partir d'une méthode impliquant l'addition de boranes allyliques (ici, l'allylborane **42**) afin d'obtenir une synthèse stéréosélective au niveau des 3 centres asymétriques contigus de la chaîne alkyle. Pourquoi choisir la chimie des allylboranes au lieu des allylstannanes? L'aldéhyde **16** ne possède pas de groupement  $\alpha$ -hydroxylé, la chélation induite par l'introduction d'un acide de Lewis nous ne pourrait pas avoir lieu. La réaction passera alors par un état de transition Felkin-Ahn (non-chélaté). Cet état de transition pourrait éventuellement nous mener à la bonne configuration. Cependant, nous savons qu'un état de transition contrôlé uniquement par un modèle Felkin-Ahn n'est pas aussi sélectif qu'un état de transition impliquant une chélation. Ce dernier permet de figer la molécule à l'aide d'un intermédiaire cyclique à

5 membres et donc permettre une stéréosélectivité plus efficace. Dans le cas des boranes allyliques, la réaction passerait par un état de transition cyclique spécifique.

#### 4.3.1 Synthèse de l'intermédiaire **41** en utilisant la chimie des boranes allyliques à partir de l'aldéhyde **16**

Afin de mieux comprendre cette réaction, nous pouvons commencer par une discussion plus approfondie de la chimie des allylboranes. Le bore est un composé dont la chimie est très répandue. Il permet de très nombreuses réactions telles que des couplages, des réductions, des alkylations, etc. Son utilisation présente de nombreux avantages notamment au point de vue de sa non-toxicité<sup>(54)</sup>.

##### 4.3.1.1 Type d'allylboranes

Il existe deux grandes familles d'allylboranes soit les croyldialkylboranes et les croylboronates (figure 4.13). Les croyldialkylboranes sont généralement plus réactifs, mais ils sont aussi moins stables. Il faut donc les utiliser immédiatement et à basse température (-78 °C) afin d'éviter d'interconversion E/Z<sup>(55)</sup>. L'utilisation de copules chiraux sur le bore permet néanmoins d'offrir une très bonne énantiomérisélectivité. Les croylboroates sont, quant à eux, moins réactifs, mais beaucoup plus stables. Ils peuvent donc être stockés et peuvent être utilisés à des températures plus élevées (température ambiante) puisqu'il y a très peu avoir pas d'interconversion E/Z. Nous avons choisi d'opter pour l'alkylation de l'aldéhyde **16** à l'aide des croyldialkylboranes. Une étude sur les croylboronates est envisagée dans les projets futurs de notre laboratoire, afin d'avoir une étude comparative entre ces deux familles d'allylboranes.



Figure 4.13 Types d'allylboranes.

#### 4.3.1.2 Allylboration énantiométrique

L'utilisation de copule chirale sur le bore permet de créer un alcool optiquement actif avec un excès énantiomérique plus ou moins bon dépendant de la nature de la copule chirale porté par le bore<sup>(56)</sup> (schéma 4.8). Plus la copule est volumineuse et plus l'excès énantiomérique, sur le centre nouvellement créé, est bon<sup>(57,58)</sup>.

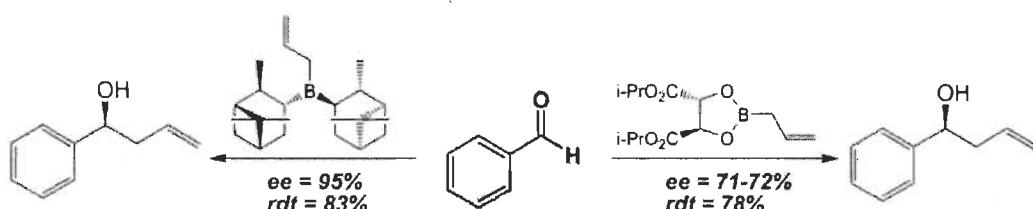
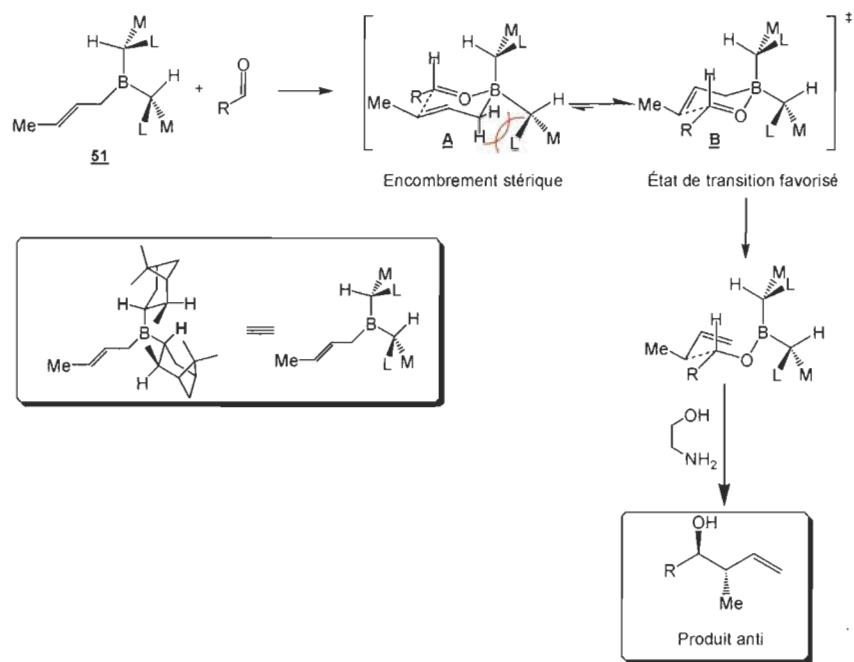


Schéma 4.8

Il est possible, en plus de la copule chirale sur le bore, de partir d'un allylborane qui ne soit pas un alcène terminal. Cela conduira à la formation d'un alcool optiquement actif pour lequel la configuration relative des deux centres stéréogéniques sera déterminée en fonction de la stéréochimie de la liaison C-C. La figure 4.14 nous montre un exemple d'une allylation en partant d'un allylborane E (**51**). Notons que pour faciliter la compréhension des états de transition, nous avons simplifié la représentation des copules chiraux sur le bore. Cette réaction se fait en passant par un état de transition cycle de type Zimmerman-Traxler, avec le substituant R en position pseudo-équatoriale. Nous pouvons constater que l'état de transition **A** est défavorisé à cause de l'encombrement stérique entre le groupement L (large) du copule chiral sur le bore et un hydrogène du carbone saturé du groupement crotyle. Ceci permet de former majoritairement un des deux alcools allyliques, en passant par l'état de transition **B**. La réaction est stéréospécifique : le produit anti est obtenu à partir de l'oléfine E, et le produit syn à partir de l'oléfine Z. C'est un des grands avantages de cette méthode.

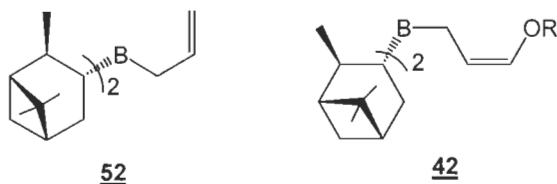


**Figure 4.14** Mécanisme de l'allylboration énantiomélique à partir d'un allylborane E.

Le bore étant un bon acide de Lewis, il se complexe facilement à l'oxygène du carbonyle. Une fois la chaîne allyle introduite sur le carbonyle, il est nécessaire de rompre la liaison oxygène-bore nouvellement formée. Pour cela, différents produits peuvent être utilisés comme l'éthanol amine ou d'autres amino alcools plus complexes. Ce traitement permet de retirer facilement le produit secondaire sous format d'un précipité cristallin.

Jusqu'à ce jour, l'allylborane chiral dérivé du  $\alpha$ -pinène (*B*-allyldiisopinocampheylborane **52**)<sup>(59)</sup> (figure 4.15), s'est avéré le plus efficace en terme de pureté optique élevée pour une large gamme d'aldéhydes achiraux et chiraux. Plusieurs allylboranes d'ordre supérieur issus du  $\alpha$ -pinène ont été préparés *in situ* ou en tant que réactifs isolables. Tous ces réactifs fournissent de très bons rendements des alcools correspondants homoallyliques lors d'une réaction avec des aldéhydes dans d'excellentes énanti- et diastéréosélectivités. Un des nombreux

allylboranes d'ordre supérieur développé par Brown<sup>(56)</sup> est le (B)-(Z)- $\gamma$ -alkoxyallyldiisopinocampheylborane (**42**) (figure 4.15).



**Figure 4.15** Les allylboranes chiraux de Brown.

La réaction de ce réactif **42** avec un aldéhyde donne les alcools homoallyliques 1,2-syn  $\alpha$ -alkoxy avec de très hauts rendements et d'excellents excès énantiomériques. L'énantiosélectivité de ces alcools homoallyliques est gouvernée strictement par la configuration absolue de l'énantiomère du  $(Ipc)_2BOMe$  utilisé (molécule **55**, voir schéma 4.9). Ainsi, les diols vicinaux obtenus par l'utilisation du  $(+)-(Ipc)_2BOMe$  sont toujours de configuration (R,R), et le  $(-)-(Ipc)_2BOMe$  fournit des diols vicinaux de configuration (S,S)<sup>(69)</sup>, et ce, indépendamment de la stéréochimie de l'aldéhyde utilisé. Donc, dans le cas de l'aldéhyde **16**, par exemple, l'utilisation du  $(-)-(Ipc)_2BOMe$  devrait nous donner l'intermédiaire **41** avec la configuration 22R, 23R.

#### 4.3.1.3 Préparation du (B)-(Z)- $\gamma$ -alkoxyallyldiisopinocampheylborane (**42**) et son application énantiosélective

Le réactif **42** est habituellement préparé et utilisé *in situ* (schéma 4.9). Ainsi, le traitement de l'éther allylique **53** avec une base forte telle que le sec-BuLi conduit à la formation d'un anion (Z)-allylique **54**. La coordination du lithium et de l'oxygène résultant en un état de transition à 5 membres explique la formation exclusive de la stéréochimie Z. La réaction de cet anion **54** avec le  $(Ipc)_2BOMe$  (**55**) fournit le complexe **56**, avec une conformation (Z) de l'oléfine. L'addition d'un acide de Lewis fort au complexe **56** libère le réactif allylborane (B)-(Z)- $\gamma$ -alkoxyallyldiisopinocampheylborane (**42**)<sup>(60)</sup>.

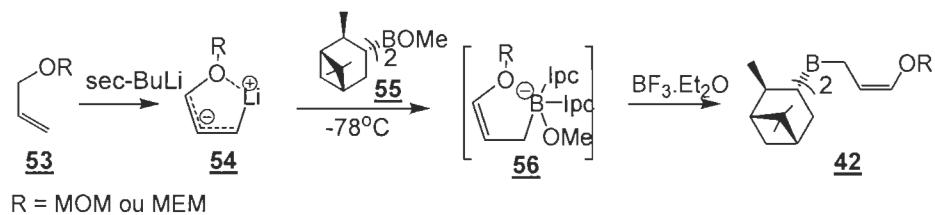


Schéma 4.9

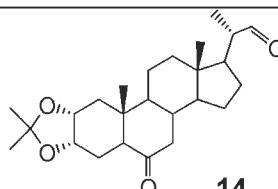
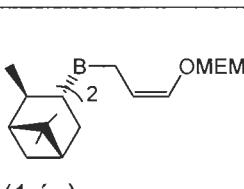
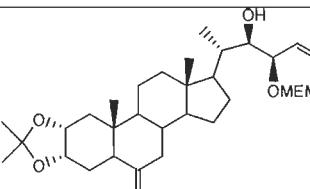
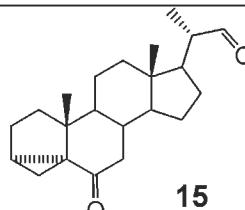
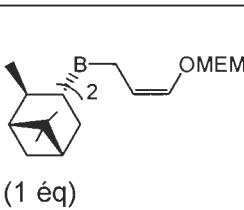
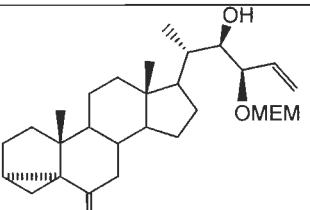
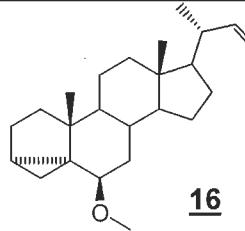
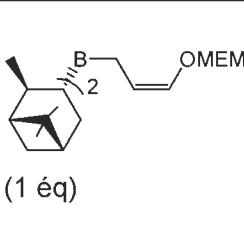
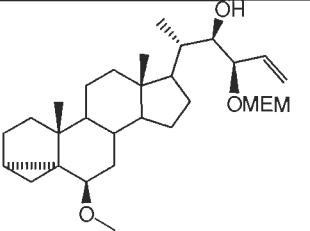
Nous avons, dans un premier temps, tenté de synthétiser l'éther allylique **53**, en utilisant le méthoxyméthyle (MOM) comme groupement protecteur (R = MOM). Nous avons toutefois rencontré des problèmes lors de la synthèse de ce dernier. En effet, le composé obtenu est volatil et afin de le purifier il a fallu effectuer une distillation fractionnée nous permettant d'obtenir l'éther allylique désiré (tableau 4.5, essai 1). Cependant, la première tentative pour isoler **53** par distillation fractionnée a échoué. Nous avons effectué un deuxième essai en surveillant minutieusement la distillation (tableau 4.5, essai 2), mais encore une fois, le produit obtenu était impur (impureté : solvant de la réaction). Il semble donc que cet éther allylique est trop volatil ce qui rend difficile sa purification. Nous avons décidé d'utiliser le méthoxyéthoxy méthyle (MEM) comme groupement protecteur (possédant deux carbones et un oxygène supplémentaire). L'éther allylique provenant du MEMCI devrait être moins volatil puisque ce dernier posséderait un poids moléculaire plus élevé. En effet, nous avons remarqué que cet éther allylique était beaucoup moins volatil. Nous avons pu isoler le produit pur désiré avec un rendement de 88 % (tableau 4.5, essai 3).

**Tableau 4.5**  
Protection de l'alcool allylique menant à l'éther allylique **53**

Essai	R	Réactif (éq)	Base de Hunig (éq)	Température (temps)	Commentaire (rendement)
1	MOM	MOMCI (1,25)	1,5	0 °C à tp (3 h)	Problème dans la distillation
2	MOM	MOMCI (1,25)	1,5	0 °C à tp (3 h)	Problème dans la distillation
3	MEM	MEMCI (1,1)	1,1	0 °C à tp (3 h)	Produit désiré (88 %)

Nous avons alors poursuivi en synthétisant le réactif **42**, qui rappelons-le est habituellement préparé et utilisé *in situ*. Le tableau 4.5 nous montre un résumé les réactions entre les aldéhydes **14**, **15** et **16** et le réactif **42**. On peut être surpris de voir l'aldéhyde **15** apparaître ici puisque nous avons vu précédemment que **15** était instable (section 3.3.1). Pourquoi donc l'utiliser? Nous avons pensé que cette instabilité pourrait se traduire en plus grande réactivité vis-à-vis de ces allylboranes.

**Tableau 4.6**  
Réactivité des aldéhydes **14**, **15** et **16** avec l'allylborane de Brown **42**

Aldéhyde	Allylborane	Produit désiré	Rend. (condition)
 <b>14</b>	 (1 éq)	 <b>28</b>	Pas de réaction (-78 °C, 6 h)
 <b>15</b>	 (1 éq)		Pas de réaction (-78 °C, 6 h et t.p., 24 h)
 <b>16</b>	 (1 éq)		Pas de réaction (-78 °C, 6 h et t.p., 24 h)

Solvant : THF.

Nous avons dans un premier temps effectué la réaction en utilisant l'aldéhyde **14** en utilisant les conditions de Brown<sup>(59)</sup>. Nous n'avons vu aucune réactivité (conservation de l'aldéhyde **14**), et ce, même après 6 h de réaction à -78 °C. Nous avons par la

suite effectué la réaction dans les mêmes conditions pour l'aldéhyde 15 ainsi que l'aldéhyde 16 en simultanée. Nous avons été déçus de ne pas voir la présence du produit désiré pour l'un comme pour l'autre même après 6 h de réaction à -78 °C. Nous avons donc décidé de laisser ces deux derniers réagir à température ambiante pendant 24 h. Encore une fois, aucune apparition des produits désirés n'est observée (conservation de l'aldéhyde 16 et dégradation de l'aldéhyde 15). Nous n'avons pas eu plus de temps pour faire plus d'essais.

Une des raisons pour laquelle on n'observe aucune réaction serait peut-être due au fait que nous n'arrivons pas à créer le réactif de Brown 42. Il faudrait dans le futur effectuer une réaction entre ce réactif 42 et un aldéhyde connu pour bien réagir avec ce borane nucléophile afin de vérifier si nous sommes bien capables de préparer ce réactif. De plus, il serait intéressant de refaire les trois essais, mais en variant le nombre d'équivalents de l'allylborane 42, ainsi que la température de la réaction.

#### 4.4 Conclusion du deuxième objectif

Dans un premier temps, nous avons synthétisé les aldéhydes 14, 15 et 16, qui rappelons-le nous permettent, suite à l'ajout de différents nucléophiles carbonés, la construction des chaînes latérales des familles à 27 et 28 carbones. Nous avons opté pour ces trois aldéhydes puisque chacun offre des avantages. Les aldéhydes 15 et 16 peuvent être synthétisés en seulement 3 à 4 étapes; ce qui nous permet de procéder plus rapidement au test de réactivité approprié afin de construire la chaîne latérale. Cependant, ils nécessiteront plus tard la transformation des cycles A et B afin d'obtenir des BRs. L'aldéhyde 14 quant à lui possède déjà les fonctionnalités requises dans les cycles A et B, mais il est aussi plus laborieux à synthétiser. Nous avons constaté que l'aldéhyde 15 est instable (dégradation observée en CCM et par RMN <sup>1</sup>H). Nous avons alors décidé de poursuivre le reste de la synthèse avec l'aldéhyde 16 puisqu'en plus de sa stabilité il est aussi plus rapide à synthétiser (3 étapes, avec un rendement de 34 %) que l'aldéhyde 14 (8 étapes : 18 %). Nous avons alors procédé à la construction de la chaîne latérale des BRs de la famille des

28 carbones. Pour ce faire, nous avons dû, dans un premier temps, synthétiser l'aldéhyde 38 en trois étapes avec un rendement global de 67 % (en partant de l'aldéhyde 16) en passant par un dérivé 1,3-dithiane. En utilisant la chimie des métaux allyliques ici, le stannane 37 sur l'aldéhyde 38, nous croyons possible d'effectuer l'insertion stéréosélective des carbones 24 à 26 et ainsi construire la chaîne latérale des BRs de la famille des 28 carbones. Dans un premier temps, nous avons décidé de faire une étude de la réactivité des composés stannylés vis-à-vis les BRs puisqu'à notre connaissance nous sommes les premiers à étudier cette réactivité sur les BRs. Pour ce faire, nous avons décidé de tester dans un premier temps l'hydrure de stannane le plus simple des nucléophiles stannés. Nous avons alors réussi à synthétiser l'alcool 47 (issu de la réduction de l'aldéhyde 38) avec un rendement de 43 %. En second lieu, nous avons opté pour l'utilisation d'un composé stanné facile d'accès l'allyltributylstannane, disponible commercialement. Nous avons été déçus de constater qu'aucune réactivité n'est observée (conservation de l'aldéhyde 38) en utilisant le  $ZnCl_2$  et le  $MgBr_2$ , deux acides de Lewis bidentats. Nous avons alors décidé d'utiliser le  $BF_3 \cdot OEt_2$  afin de tester la réactivité de l'aldéhyde 38 envers les allylstannanes. Cependant nous avons constaté qu'en utilisant deux équivalents de l'allyltributylstannane nous obtenons le diadduit 49. L'utilisation de 1,05 éq de d'allyltributylstannane mène à un composé monosubstitué en C-6 ou en C-3. En résumé, malgré le fait que l'aldéhyde 38 est un des aldéhydes les plus utilisés pour les substituants nucléophiliques dans la chimie des BRs<sup>(16)</sup>, dans ce cas précis, il semblerait plus adéquat d'opter pour l'utilisation d'un aldéhyde ne possédant pas les fonctionnalités présentes dans les cycles A et B (cyclopropyl, OMe) du composé 38 (qui semble être plus électrophile que la fonction aldéhyde en C-23). L'aldéhyde 14 serait un candidat plus intéressant, puisqu'en plus de ne pas avoir de méthoxy en C-6, il possède déjà les fonctionnalités requises chez les BRs dans les cycles A et B. Cependant, nous n'avions plus d'aldéhyde 14 et nous avions plus de temps (alloué pour cette maîtrise) pour en refaire. Nous avons alors entamé la synthèse de la chaîne latérale des BRs de la famille des 27 carbones, mais cette fois-ci sans étape d'homologation en utilisant la chimie des allylboranes. L'utilisation d'allylborane d'ordre supérieur issus de  $\alpha$ -pinène tel que

(B)-(Z)- $\gamma$ -alkoxyallyldiisopinocampheylborane (**42**) permet la création de diols vicinaux de manière énantiosélective comme dans le cas de notre intermédiaire **41**. Cependant, nous avons été déçus de constater qu'aucune réactivité n'a été observée ni avec l'aldéhyde **14**, ni l'aldéhyde **15**, ni avec l'aldéhyde **16** (conservation des aldéhydes **14** et **16** et dégradation du **15**). Ceci peut être dû à l'encombrement stérique des aldéhydes (**14**, **15** et **16**) qui n'est pas négligeable. Afin de suivre le déroulement de la réaction et de déterminer les causes de la non réactivité, il serait intéressant dans un premier temps de vérifier la formation du réactif de Brown **42** en le piégeant avec un aldéhyde connu comme étant très réactif avec ce type de composé. Dans un deuxième temps, il faudrait refaire ces trois essais, en variant le nombre d'équivalents de l'allylborane **42**, ainsi que la température de la réaction.

## CHAPITRE V

### CONCLUSION GÉNÉRALE

Le premier objectif de ce travail de recherche consistait, dans un premier temps, à réaliser la synthèse de brassinostéroïdes de la famille des 29 carbones. Dans les travaux publiés du chapitre II, nous avons présenté la préparation de deux brassinostéroïdes naturels : l'homocastastérone (**11**) et l'homobrassinolide (**12**) et un isomère non naturel; l'épi-homocastastérone (**13**) à partir du stigmastérol (**17**). Ces trois composés ont été obtenus avec des rendements globaux entre 16 et 25 %. Nous avons, dans un deuxième temps, amélioré l'efficacité et le rendement global de la préparation du diène **23** à partir du stigmastérol (**17**). En effet, nous avons mis au point la purification par recristallisation ce qui permet d'éviter deux purifications par chromatographie colonne sur silice. Cette mise au point a permis de passer de 56 % de rendement (comparable à la littérature<sup>(61)</sup>) à 72%. Sept des molécules synthétisées et deux molécules commerciales ont été testées. Seules trois des molécules de synthèse n'ont pas été actives. Pour les six autres, nous avons démontré qu'elles sont aptes à contrer le stress oxydant causé par le MPP<sup>+</sup> (*in vitro*), une toxine reproduisant la neurodégénérescence caractéristique de la maladie de Parkinson. Nous avons poursuivi par une étude de la relation structure-activité entre les différents composés et leur effet neuroprotecteur. Afin de valider cette étude, il serait intéressant de l'étendre aux BRs des familles à 27 et 28 carbones. Ces dernières sont les plus abondantes et les plus diversifiées chez les plantes. Enfin, l'objectif premier de ce travail étant atteint, l'étape suivante serait la réalisation de ces tests *in vivo* afin de confirmer leur activité.

Le second objectif de ce travail de recherche consistait à reconstruire les chaînes latérales des BRs de la famille des 27 et 28 carbones à l'aide de la chimie des métaux allyliques. Pour ce faire, nous avons, dans un premier temps, préparé les aldéhydes **14**, **15** et **16** (chapitre III) possédant un aldéhyde sur le carbone 22 qui, on le rappelle, suite à l'ajout de différents nucléophiles carbonés nous permettent de construire la chaîne alkyle appropriée. Nous avons constaté que l'aldéhyde **15** est instable (dégradation observée en CCM et par RMN  $^1\text{H}$ ). Nous avons alors choisi de travailler avec son analogue **16**, celui-ci étant stable et facile à synthétiser. Nous avons ensuite procédé à la construction de la chaîne latérale sur ce composé (chapitre IV). Pour ce faire, nous avons synthétisé dans un premier temps, l'aldéhyde **38** en trois étapes avec un rendement global de 67 % (à partir de l'aldéhyde **16**) en passant par un dérivé 1,3-dithiane. Nous avons opté pour l'utilisation de la chimie des allylstannanes (le stannane **37**) nous permettant l'insertion stéréosélective des carbones 24 à 26 et ainsi construire la chaîne latérale des BRs de la famille des 28 carbones. À notre connaissance, il n'y a jamais eu d'étude de cette réactivité sur des BRs. Nous avons alors commencé par cette étude de réactivité des composés stannanés vis-à-vis les BRs. Nous avons été en mesure de synthétiser l'alcool **47** avec un rendement de 43 % en utilisant l'hydrure de stannane (le plus simple des nucléophiles stannés). L'utilisation de  $\text{ZnCl}_2$  ou  $\text{MgBr}_2$  (deux acides de Lewis bitentates) en présence de l'allyltributylstannane n'a donné aucun résultat. Le suivi par chromatographie couche mince ne montre pas de formation de nouveau composé, l'aldéhyde **38** étant toujours dans le milieu. Nous avons alors utilisé  $\text{BF}_3\text{OEt}_2$  comme acide de Lewis et nous avons constaté que l'utilisation d'un excès d'allyltributylstannane (2 éq.) conduit à un sous-produit **49**. L'utilisation d'une quantité stoechiométrique (1,05 éq.) mène également à un produit indésirable résultant de la monosubstitution en C-6 ou en C-3. Les résultats obtenus montrent que la présence d'un groupement méthoxy en position C-6 entraîne des réactions au niveau de cette position. Il semble que le groupement carbonyle de la fonction aldéhyde soit moins réactif. L'utilisation de l'aldéhyde **14** serait plus adéquate pour ce type de synthèse. L'aldéhyde **14** est un candidat plus intéressant, car en plus de ne pas avoir de méthoxy en C-6, il possède déjà les fonctionnalités

requises chez les BRs dans les cycles A et B. Les composés **47** et **49**, nouvellement synthétisés pourraient être des candidats intéressants dans notre étude biologique.

Nous sommes, par la suite, passés au BRs de la famille des 27 carbones. Nous avons utilisé les allylboranes d'ordre supérieur issus d'a-pinènes tels que (B)-(Z)- $\gamma$ -alkoxyallyldiisopinocampheylborane (**42**), pour créer des diols vicinaux de manière énantiosélective. Les différentes réactions réalisées à partir des aldéhydes **14**, **15** et **16** n'ont pas montré d'évolution. L'axe de recherche qui pourrait être envisagé serait l'étude plus approfondie de la réactivité des allylboranes sur les BRs. En conclusion, la synthèse des aldéhydes **14**, **15** et **16** ainsi que la préparation de l'intermédiaire **38** à partir de l'aldéhyde **16** nous ont permis pour la première fois une étude systématique de la réactivité des composés stannanés vis-à-vis des BRs. La synthèse des composés **47** et **49**, candidats intéressants pour les tests biologiques, ainsi que l'étude préliminaire de réactivité des allyles boranes dans la chimie des BRs, nous permettent de considérer le second objectif comme partiellement atteint.

## CHAPITRE VI

### PARTIE EXPÉRIMENTALE

#### 6.1 Remarques générales

Les solvants utilisés furent fournis par la compagnie Fisher sous la certification ACS et distillés avant leur utilisation. Lorsqu'une réaction a nécessité l'utilisation d'un solvant anhydre, celui-ci fut asséché selon les méthodes usuelles (distillation sur sodium,  $P_2O_5$ ). Lorsque les protocoles mentionnent l'utilisation de conditions anhydres, ceci implique le séchage à l'étuve de la verrerie, des aiguilles et des agitateurs à 50 °C pendant 24 h. Les réactions furent suivies par chromatographie sur couche mince (CCM) sur des plaques de gel de silice déposée sur aluminium de la compagnie Silicycle (250 µm, UV-Vis). Les plaques CCM furent développées avec une solution acide de molybdate d'ammonium (PMA). Les chromatographies éclair furent réalisées avec la silice Siliaflash P60 de la compagnie Silicycle (40-63 µm, 230-400 mesh). Le stigmastérol ([17](#)) (utilisé comme produit de départ) fut acheté de la compagnie Acros Organics (95 % pur) et de la compagnie Trade TCI mark.

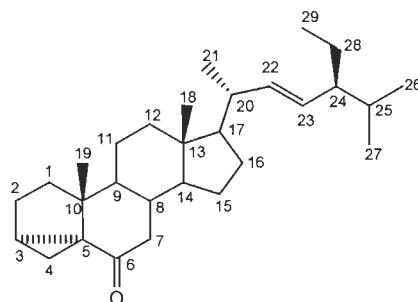
Les spectres de masses à basse résolution (SMBR) furent enregistrés sur un système CPG-SM de la compagnie Agilent Technologies (système CPG 6890N et détecteur sélectif de masse 5973) en utilisant l'hélium comme gaz porteur. Les spectres de masses à haute résolution (SMHR) ont été enregistrés à l'UQAM sur un système CLHP 1200 en utilisant un détecteur TOF 6210 de la compagnie Agilent Technologies. Les spectres  $^1H$  ont été enregistrés sur un spectromètre 200 MHz

dans du  $\text{CDCl}_3$  avec le signal du  $\text{CHCl}_3$  à 7,26 ppm comme solvant et référence. Les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  ont été enregistrés à 50,3 MHz dans du  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta = 77,1$  ppm) comme solvant et référence. Le  $\text{CDCl}_3$  qui a été utilisé contient 0,2 % de  $\text{CHCl}_3$ . Les données du RMN sont rapportées comme suit : déplacement chimique en ppm, la multiplicité (d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet, dd = doublet de doublet, dt = doublet de triplets, td = triplet de doublets), le nombre de protons, constantes de couplage en Hertz et assignation (si possible). Les spectres IR ont été obtenus sur un spectromètre Impact 420 de Nicolet. Tous les IR ont été obtenus en mélangeant les molécules à l'étude dans du KBr anhydre et en formant une pastille avec ce mélange. Les points de fusion furent évalués sur un appareil de la compagnie Electrothermal et ne sont pas corrigés. Si les solides obtenus furent recristallisés avant la mesure de leur point de fusion, le solvant de recristallisation est spécifié entre parenthèses avant la valeur du point de fusion.

L'ensemble des spectres et des points de fusions des molécules a été comparé aux données de la littérature, mis à part les composés **15**, **47** et **49** (nouveaux composés).

## 6.2 Préparation des molécules présentées au chapitre III (article)

### 6.2.1 Préparation du (22E, 24S)-3 $\alpha$ , 5-cyclo-stigmast-22-en-6-one (**30**)



Sous atmosphère de  $\text{N}_2$  et en condition anhydre, 5,25 g de stigmastérol (**17**) (12,1 mmol) pur à 95 % ont été dissous dans 60 mL de toluène. À cette solution ont

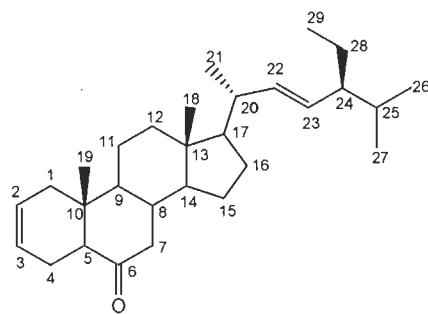
été ajoutés 13,0 mL de triéthylamine (93,1 mmol, 7,70 éq) à l'aide d'une seringue. La solution a été refroidie à 0 °C avec un bain de glace et 2,80 mL de chlorure de méthanesulfonyle (36,3 mmol, 3,00 éq) ont été ajoutés goutte à goutte pendant 10 minutes. Le mélange résultant a été agité à 0 °C pendant 1,5 h. La solution jaune obtenue a été diluée à l'eau puis extraite au toluène (x 3). La phase organique a été ensuite lavée avec de l'eau (x 3), une solution aqueuse saturée de NaHCO<sub>3</sub> (x 2), ainsi qu'avec une solution aqueuse saturée de NaCl (x 2). La phase organique a été ensuite séchée avec MgSO<sub>4</sub> puis filtrée. L'évaporation sous vide nous a permis d'obtenir 5,84 g (95 %) de **28** sous la forme d'un solide cristallin blanc. Le produit brut a été directement utilisé pour la prochaine réaction. Les données des spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C sur le produit brut étaient conformes aux données de la littérature<sup>(61)</sup>.

4,30 g du mésylate **28** (9,78 mmol) ont été suspendus dans une solution constituée de 80 mL H<sub>2</sub>O et de 240 mL d'acétone. À cette solution ont été ajoutés 1,09 g de KHCO<sub>3</sub> (13,2 mmol, 1,20 éq). La suspension a été portée à reflux pendant 6,5 h. La solution a été ensuite refroidie à température ambiante puis extraite avec de l'EtOAc (x 3). La phase organique a été lavée à l'eau (x 3), lavée avec une solution aqueuse saturée de NaHCO<sub>3</sub> (x 2), ainsi qu'avec une solution aqueuse saturée de NaCl (x 2). La phase organique a été ensuite séchée avec MgSO<sub>4</sub> puis filtrée. L'évaporation sous vide a permis d'obtenir 3,34 g (93 %) de **29** sous forme d'une huile jaune. Le produit brut a été directement utilisé pour la prochaine réaction. Les données des spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C sur le produit brut étaient conformes aux données de la littérature<sup>(61)</sup>.

3,16 g de l'alcool **29** (7,65 mmol) ont été dissous dans 80 mL d'acétone. La solution a été vigoureusement agitée puis la température de la solution a été abaissée à 0 °C avec un bain de glace. Le réactif de Jones (8N-CrO<sub>3</sub> : 5,33 g de CrO<sub>3</sub> ont été dissous dans 4,40 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré, puis de l'eau a été ajoutée pour obtenir une solution de 20 mL) a été ajouté goutte à goutte jusqu'à ce que la coloration rouge de la solution persiste (env 3,1 mL). La solution a été ensuite agitée à 0 °C pendant 10 min. Le mélange obtenu a été ensuite concentré sous vide. Le résidu

vert obtenu a été dilué à l'eau et extrait avec de l'EtOAc (x 3). La phase organique a été lavée avec de l'eau (x 3), une solution aqueuse saturée de NaHCO<sub>3</sub> (x 2), ainsi qu'avec une solution aqueuse saturée de NaCl (x 2). La phase organique a été ensuite séchée avec MgSO<sub>4</sub> puis filtrée. Après évaporation sous vide, on a obtenu 2,82 g (83 %) de **30** pur sous la forme d'un solide blanc  $T_{fus}$  (EtOH) 95-97°C. **RMN** <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 5,16 (dd, 1H,  $J_1$  = 8 Hz,  $J_2$  = 15 Hz, H-22), 5,08 (dd, 1H,  $J_1$  = 8 Hz,  $J_2$  = 15 Hz, H-23), 2,42 (dd, 1H,  $J_1$  = 8 Hz,  $J_2$  = 14 Hz, H-7α), 2,10-1,10 (m, 25H) 1,03 (s, 3H, H-19), 1,02 (d, 3H,  $J$  = 6 Hz, H-21), 0,98-0,78 (m, 9H), 0,73 (s, 3H, H-18). **RMN** <sup>13</sup>C (50,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 210,1 (C-6), 138,3 (C-22), 129,7 (C-23), 57,7, 56,1, 51,5, 47,0, 46,5, 46,3, 45,0, 42,8, 40,7, 39,8, 35,6, 35,0, 33,7, 32,1, 29,1, 26,1, 25,6, 24,4, 23,1, 21,4, 21,3, 19,9, 19,2, 12,5, 12,4, 11,9. **IR** (pastille de KBr,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>)) 2943, 2856, 1685, 1478, 1369, 1298, 1167, 966, 922. **SMBR** (*m/z*, intensité relative) 410 (M<sup>+</sup>) (100), 392 (10), 367 (70), 298 (70), 271 (75). Notons que les données du RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C pour ce composé sont les mêmes que celles déjà obtenues par notre groupe de recherche<sup>(35)</sup>.

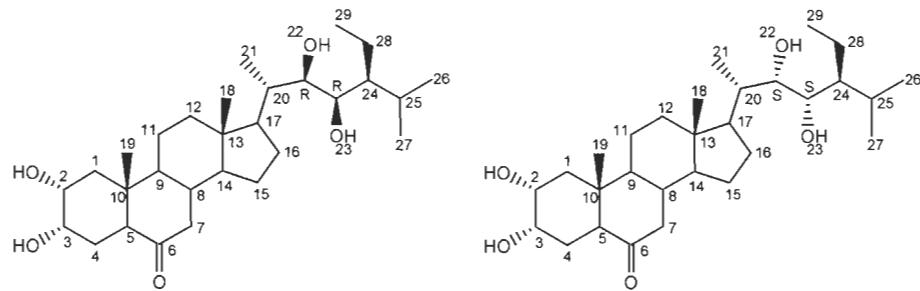
#### 6.2.2 Préparation du (22E, 24S)-stigmasta-2,22-dien-6-one (**23**)



4,88 g de la cétone pentacyclique **30** (11,9 mmol) ont été ajoutés à 50 mL de DMA. À cette suspension a été ajoutée 0,69 g de LiBr (5,94 mmol, 0,50 éq) et 0,51 g de Py-HCl (5,94 mmol, 0,50 éq). Ce mélange a été porté à reflux sous atmosphère de N<sub>2</sub> pendant 4 h. La solution a été ensuite refroidie à température pièce puis à 0 °C avec un bain de glace afin d'initier la cristallisation. Un solide blanc a alors précipité dans la solution orangée. Le solide a été filtré sous vide et lavé avec du MeOH glacé

(x 3). Le filtrat a été remis à 0 °C dans un bain de glace pour induire encore une cristallisation, et le produit a été à nouveau filtré. Cette étape a été répétée deux autres fois jusqu'à ce qu'aucune cristallisation ne soit apparente. 4.67 g (96 %) de **23** pur sous la forme d'un solide poudreux blanc a été obtenu  $T_{\text{fus}}$  (EtOH) 111-112 °C. **RMN**  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 5,66-5,58 (m, 2H, H-2 et H-3) 5,13 (dd, 1H,  $J_1$  = 8 Hz,  $J_2$  = 15 Hz, H-22), 5,07 (dd, 1H,  $J_1$  = 8 Hz,  $J_2$  = 15 Hz, H-23), 2,40-1,20 (m, 26 H), 1,04 (d, 1H,  $J$  = 7 Hz, H-21), 1,02-0,80 (m, 9H), 0,71 (s, 3H, H-19), 0,69 (s, 3H, H-18). **RMN**  $^{13}\text{C}$  (50,6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 212,4 (C-6), 138,3 (C-22), 129,8 (C-23), 125,2 et 124,8 (C-2 et C-3), 57,1, 56,1, 54,1, 53,7, 51,5, 47,3, 42,9, 40,7, 40,3, 39,6, 37,9, 32,1, 29,0, 25,6, 24,2, 22,0, 21,4, 21,3, 19,2, 13,7, 12,5, 12,4. **IR** (pastille de KBr,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ )) 2961, 2863, 1710, 1460, 1389, 965. **SMBR** ( $m/z$ , intensité relative) 410 ( $\text{M}^+$ ) (100), 395 (80), 367 (25), 297 (25), 269 (30). Notons que les données du RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  pour ce composé sont les mêmes que celles déjà obtenues par notre groupe de recherche<sup>(35)</sup>.

### 6.2.3 Préparation du (22R, 23R, 24S)-2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ , 22,23-tetrahydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one (**11**) et son isomère 22S, 23S (**13**)



0,62 g du diène **23** (1,52 mmol) a été dissous dans 30,0 mL de t-BuOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (1 : 1). À cette solution ont été ajoutés 1,26 g de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (9,10 mmol, 6,00 éq.), 3,00 g de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  (9,10 mmol, 6,00 éq.), 0,14 g de DHQD (0,30 mmol, 0,20 éq.), 0,29 g de méthanesulfonamide (3,00 mmol, 2,00 éq.) et 0,60 mL d'une solution de  $\text{OsO}_4$  2,5 % dans t-BuOH (0,06 mmol, 0,04 éq.). Le mélange réactionnel a été agité à

température ambiante pendant 6 jours. 1,20 g de NaHSO<sub>3</sub> a été ajouté et la solution a été laissée réagir 18 h à température ambiante. Le mélange obtenu a été dilué à l'eau et extrait à l'EtOAc (x 6). La phase organique a été lavée avec une solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,25 M (x3) et avec une solution aqueuse saturée de NaCl (x3). La phase organique a ensuite été séchée avec MgSO<sub>4</sub>, filtrée et évaporée sous vide. Le produit brut a été purifié par chromatographie sur colonne en utilisant un gradient CHCl<sub>3</sub>/EtOH (0 → 6 %) afin d'obtenir les deux composés **11** et **13** désirés.

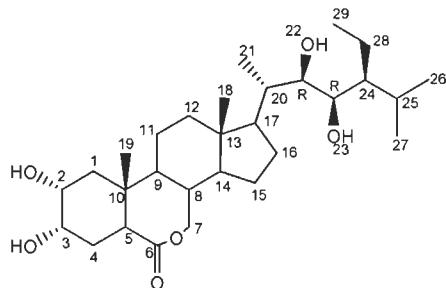
#### 22R, 23R-homocastastérone (**11**)

81,9 mg (13,4 %). CCM : CHCl<sub>3</sub>/EtOH (9:1). R<sub>f</sub> = 0,21. T<sub>fus.</sub> 223-225 °C. **RMN** <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 4,05 (m, 1H, H-3α), 3,82-3,66 (m, 2H), 3,59 (d, 1H, J = 9 Hz), 2,69 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 3,5, J<sub>2</sub> = 12,5 Hz, H-5α), 2,3 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 4,3, J<sub>2</sub> = 12,9 Hz, H-7β), 2,2-0,9 (m, 17H), 0,76 (s, 3H, H-19), 0,68 (s, 3H, H-18). **RMN** <sup>13</sup>C (50,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 211,9 (C-6), 74,5 et 72,7 (C-22,C-23), 68,4 et 68,3 (C-2, C-3), 56,5, 53,6, 52,5, 50,7, 46,7, 46,3, 42,8, 42,6, 40,2, 39,4, 37,7, 36,9, 30,9, 28,8, 27,6, 26,3, 23,8, 21,2, 19,4, 18,8, 13,6, 13,4, 11,9, 11,9. **IR** (pur, ν (cm<sup>-1</sup>)) 3493, 3447, 2965, 2940, 2862, 1699. **SMHR** calculée pour C<sub>29</sub>H<sub>51</sub>O<sub>5</sub> (MH<sup>+</sup>): 479,3731; trouvée 479,3723.

#### 22S, 23S-homocastastérone (**13**)

71,2 mg (11,5 %). CCM: CHCl<sub>3</sub>/EtOH (9:1) R<sub>f</sub> = 0,29. T<sub>fus.</sub> 206-208 °C. **RMN** <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 4,05 (m, 1H, H-3 α), 3,82-3,72 (m, 1H, H-2 α), 3,62-3,58 (m, 2H, H-22 et H-23), 2,68 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 3,5, J<sub>2</sub> = 12,5 Hz, H-5α), 2,3 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 4,3, J<sub>2</sub> = 12,9 Hz, H-7β), 2,2-0,9 (m, 17H), 0,76 (s, 3H, H-19), 0,70 (s, 3H, H-18). **RMN** <sup>13</sup>C (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 211,9 (C-6), 72,2 et 70,6 (C-22, C-23), 68,4 et 68,3 (C-2,C-3), 56,3, 53,7, 52,6, 50,7, 49,6, 46,7, 43,5, 42,5, 42,3, 40,2, 39,4, 37,6, 27,8, 26,9, 26,3, 24,2, 21,7, 21,2, 18,6, 17,7, 14,5, 14,1, 13,5, 11,9. **IR** (pur, ν (cm<sup>-1</sup>)) 3361, 2948, 2869, 1713. **SMHR** calculée pour C<sub>29</sub>H<sub>51</sub>O<sub>5</sub> (MH<sup>+</sup>): 479,3731; trouvée 479,3723.

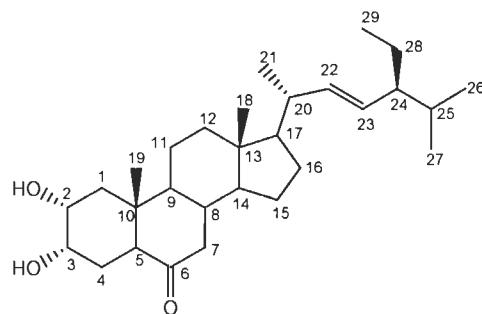
#### 6.2.4 Préparation de l'homobrassinolide (**12**)



À une solution de l'homocastasterone **11** (0,11 g, 0,22 mmol) dans  $\text{CHCl}_3$  (10,0 mL) a été ajoutée goutte à goutte une solution d'acide peroxytrifluoroacétique (2,20 mmol, 10 éq.) [préparé à partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 % aq. (0,23 mL, 2,20 mmol) et  $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$  (0,16 mL, 1,10 mmol, 5,00 éq) dans  $\text{CHCl}_3$  (5,00 mL) à 0 °C]. Le mélange réactionnel a été alors mis sous agitation à température ambiante pendant 2 h. Cette solution a été, par la suite, diluée dans  $\text{CHCl}_3$  (10,0 mL), lavée avec l'eau, une solution aqueuse saturée de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2X), une solution aqueuse saturée  $\text{NaHSO}_3$  (2X) ainsi qu'avec une solution aqueuse saturée de  $\text{NaCl}$  (x 2). La phase organique a été ensuite séchée avec  $\text{MgSO}_4$  puis filtrée. L'évaporation du solvant nous a donné un solide incolore, qui après recristallisation dans l'EtOAc a donné l'homobrassinolide (**12**) (70 mg, 65 %)  $T_{\text{fus.}}$  (EtOH) 245-247 °C. **RMN**  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 4,05 (m, 3H, H-3 $\alpha$ , H-7 $\alpha$  et H-7 $\beta$ ), 3,71 (m, 2H), 3,57 (d, 1H,  $J$  = 8,6 Hz), 3,12 (dd, 1H,  $J_1$  = 5,1 et  $J_2$  = 12,1 Hz, H-5), 2,2-0,87 (m), 0,71 (s, 3H, H-18). **RMN**  $^{13}\text{C}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 176,2 (C-6), 74,4 et 72,8 (C-22, C-23), 70,4 et 68,1 (C2, C-3), 68,1 (C-7), 58,2, 52,5, 51,3, 46,3, 42,5, 41,5, 40,9, 39,6, 39,2, 38,3, 36,9, 31,0, 28,8, 27,6, 24,7, 22,2, 21,2, 19,4, 18,8, 15,5, 13,5, 11,9, 11,7. **IR** (pur,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ )) 3436, 2965, 2933, 2837, 1695. **SMHR** calculée pour  $\text{C}_{29}\text{H}_{51}\text{O}_6$  ( $\text{MH}^+$ ): 495,3680; trouvée 495,3674.

### 6.3 Préparation des molécules présentées au chapitre IV

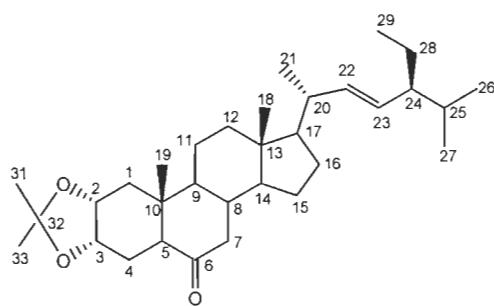
#### 6.3.1 Préparation du (22E, 24S)-2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one (22)



250 mg du diène 23 (0,61 mmol) ont été suspendus dans 7,50 mL d'un mélange acétone/eau 9:1. À ce mélange ont été ajoutés 178 mg de NMO (1,52 mmol, 2,50 éq) et la suspension obtenue a été agitée à température ambiante pendant 24 h. On a ajouté ensuite un excès de NaHSO<sub>3</sub> (0,15 g dans 2,50 mL d'eau) à la solution jaune obtenue et cette dernière a été agitée à température ambiante pendant 5 h. Le mélange obtenu a été dilué à l'eau et extrait avec EtOAc (x 3). La phase organique a été ensuite lavée avec de l'eau (x 3), une solution aqueuse saturée de NaHCO<sub>3</sub> (x 2), ainsi qu'avec une solution aqueuse saturée de NaCl (x 2). La phase organique a été ensuite séchée avec MgSO<sub>4</sub> puis filtrée. Après évaporation sous vide, 217 mg d'un solide brun clair a été obtenu. Ce solide a été purifié d'abord par chromatographie éclair en éluant avec un mélange CHCl<sub>3</sub>/MeOH 2 % puis recristallisé dans l'EtOH afin d'obtenir 160 mg (60 %) de 22 sous la forme d'aiguilles blanches  $T_{fus}$  (EtOH) 237- 239 °C. **RMN** <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 5,13 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 8 Hz, J<sub>2</sub> = 15 Hz, H-22), 5,07 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 8 Hz, J<sub>2</sub> = 15 Hz, H-23), 4,04 (m, 1H, H-3β), 3,75 (m, 1H, H2β), 2,65 (dd, 1H, J<sub>1</sub>=13 Hz, J<sub>2</sub> = 3 Hz, H-5), 2,31 (dd, 1H, J<sub>1</sub>=13 Hz, J<sub>2</sub> = 4 Hz, H-7β), 2,20-1,10 (m, 24H), 1,03, (d, 3H, J = 6 Hz, H-21), 0,74-0,86 (m, 9H), 0,75 (s, 3H, H-19), 0,68 (s, 3H, H-18). **RMN** <sup>13</sup>C (50,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 212,3 (C-6), 138,2 (C-22), 129,9 (C-23), 68,6 et 68,5 (C-2, C-3), 57,0, 56,1, 54,0, 51,5, 50,9, 47,0, 43,1, 42,8, 40,6, 40,5, 39,6, 37,9, 32,1, 28,9, 26,5, 25,6, 24,2 21,4, 21,3, 19,2, 13,8, 12,5. **IR** (pastille de KBr,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>)) 3332,

2954, 2856, 1712, 1451, 1374, 1048, 966. **SMBR** (*m/z*, intensité relative) (dérivé OTMS) 573 ( $M-CH_3$ )<sup>+</sup> (30), 498 (15), 471 (100), 382 (30). Notons que les données du RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C pour ce composé sont les mêmes que celles déjà obtenues par notre groupe de recherche<sup>(35)</sup>.

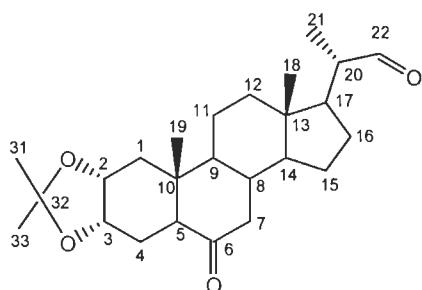
### 6.3.2 Préparation du (22E, 24S)-2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one, 2,3-acétonide (**24**)



150 mg du diol **22** (0,34 mmol) ont été suspendus dans 3,00 mL de  $CH_3CN/CH_2Cl_2$  (1:1). À cette suspension ont été ajoutés 0,50 mL de DMP (4,10 mmol, 12,4 éq) et 0,790 mg de CSA (0,003 mmol, 0,010 éq). La solution incolore résultante a été agitée à température ambiante pendant 1,5 h. La solution obtenue a été diluée au dichlorométhane et lavée avec une solution aqueuse saturée de  $NaHCO_3$  (x 2) puis avec une solution aqueuse saturée de  $NaCl$  (x 2). On a obtenu 162 mg d'un solide jaune pâle. Ce solide a été purifié par chromatographie éclair et l'élution avec un mélange  $CH_2Cl_2/EtOAc$  (95:5) a fourni 150 mg (92 %) de **24** sous la forme d'un solide blanc. **RMN** <sup>1</sup>H (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) 5,16 (dd, 1H,  $J_1 = 8$  Hz,  $J_2 = 15$  Hz, H-22), 5,06 (dd, 1H,  $J_1 = 8$  Hz,  $J_2 = 15$  Hz, H-23), 4,27 (m, 1H, H-3 $\alpha$ ), 4,06 (m, 1H, H-2 $\alpha$ ), 2,51 (dd, 1H,  $J_1 = 13$  Hz,  $J_2 = 3$  Hz, H-5), 2,26 (dd, 1H,  $J_1 = 13$  Hz,  $J_2 = 4$  Hz, H-7 $\beta$ ), 2,10-1,42 (m, 22H), 1,49 (s, 3H, H-31 ou H-33), 1,33 (s, 3H, H-31 ou H-33), 1,03 (d, 3H,  $J = 6$  Hz, H-21), 0,77-0,88 (m, 9H), 0,67-0,69 (m, 6H, H-18 et H-19). **RMN** <sup>13</sup>C (50,6 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm) 211,7 (C-6), 138,8 (C-22), 129,8 (C-23), 108,1 (C-32), 72,6 et 72,4 (C-2 et C-3), 57,0, 56,1, 53,6, 51,7, 51,5, 47,1, 43,0, 42,7, 41,4, 40,6, 39,5, 37,8, 32,1, 28,9, 28,8, 26,7, 25,6, 24,3, 22,8, 21,4, 21,3, 19,2, 12,9, 12,5,

12,4. **IR** (pastille de KBr,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>)) 2970, 2860, 1702, 1469, 1382, 1242, 1218, 1063, 962. **SMBR** (*m/z*, intensité relative) 486 (M<sup>+</sup>) (10), 469 (100), 409 (30), 383 (80), 287 (70). Notons que les données du RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C pour ce composé sont les mêmes que celles déjà obtenues par notre groupe de recherche<sup>(35)</sup>.

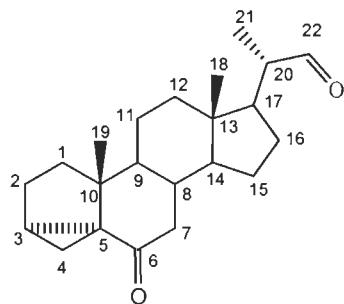
### 6.3.3 Préparation du 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -dihydroxy-6-oxo-5 $\alpha$ -stigmastan-22-al 2,3-acétonide (**14**)



430 mg d'acétonide **24** (0,90 mmol) ont été dissous dans 40 mL d'un mélange THF/H<sub>2</sub>O 5 :1. À cette solution ont été ajoutés 420 mg de NMO (3,60 mmol, 4,00 éq), 37,0 mg de NaHCO<sub>3</sub> (0,45 mmol, 0,50 éq.), 86,0 mg de méthanesulfonamide (0,90 mmol, 1,00 éq.) et 0,36 mL d'une solution de OsO<sub>4</sub> 2,5 % dans t-BuOH (0,06 mmol, 0,04 éq.). Le mélange réactionnel a été agité à 40 °C pendant 6 jours. 120 mg de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et 370 mg de NaSO<sub>3</sub> aq. dans 2,00 mL d'eau ont alors été ajoutés et le mélange a été laissé sous agitation à 40 °C pendant 5 h. Le solvant a été alors évaporé sous vide et le résidu a été extrait au EtOAc (x 3). La phase organique a été ensuite lavée avec une solution 5 % aqueuse de NaHSO<sub>3</sub> (x 2), une solution aqueuse saturée de NaHCO<sub>3</sub> (x 2), ainsi qu'avec une solution aqueuse saturée de NaCl (x 2). La phase organique a été ensuite séchée avec MgSO<sub>4</sub> puis filtrée. Après évaporation sous vide on a obtenu 375 mg de **21** sous forme d'une poudre jaune clair. Le produit brut a été directement utilisé pour la prochaine réaction.

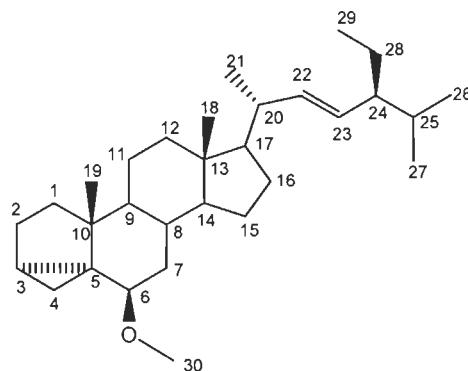
Sous atmosphère de N<sub>2</sub> et en condition anhydre 300 mg de **21** (0,58 mmol), 48,0 mg de NaHCO<sub>3</sub> (0,58 mmol, 1,00 éq.), 130 mg de H<sub>5</sub>IO<sub>6</sub> (0,58 mmol, 1,00 éq.) ont été dissous dans 13,0 mL de THF et 47,0 µL de pyridine (0,58 mmol, 1,00 éq.). Le mélange réactionnel a été agité à température ambiante pendant 24 h. La solution a été filtrée afin d'enlever le précipité (HIO<sub>3</sub>). Le solide récupéré a été ensuite lavé avec du THF. Le filtrat a été alors évaporé sous vide afin d'obtenir une huile jaune. Du NaHSO<sub>3</sub> 5 % aqueux fraîchement préparé a été ajouté à cette dernière et le mélange a été agité à température ambiante pour 30 min. Une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10 % aqueuse a été ensuite ajoutée et le tout a été agité pour un autre 30 min à température ambiante. Le produit a été extrait à l'aide de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (x 3). La phase organique a été ensuite lavée avec une solution 5 % aqueuse de NaHSO<sub>3</sub> (x 2), une solution aqueuse saturée de NaCl (x 2), et ensuite séchée avec MgSO<sub>4</sub> puis filtrée. Après évaporation sous vide on a obtenu 136 mg de **14** sous forme d'un solide jaune. Ce solide a été purifié par chromatographie éclair et l'élution avec un mélange Hexane/EtOAc (7:1) a fourni 125 mg (55 %) de **14** sous la forme d'un solide blanc T<sub>fus</sub> (EtOH) 196- 200 °C. **RMN** <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 9,55 (d, 1H, J = 3 Hz, H-22), 4,27 (m, 1H, H-3a), 4,06 (m, 1H, H-2α), 2,50 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 13 Hz, J<sub>2</sub> = 3 Hz, H-5), 2,30 (m, 2H, H-7β et H-20), 2,10-1,22 (m, 22H), 1,49 (s, 3H, H-31 ou H-33), 1,33 (s, 3H, H-31 ou H-33), 1,03 (d, 3H, J = 6 Hz, H-21), 0,76 (s, 3H, H-19), 0,68 (s, 3H, H-18). **RMN** <sup>13</sup>C (50,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm), 210,8 (C-6), 204,8 (C-22), 107,4 (C-32), 72,2 et 72,0 (C-2 et C-3), 55,8, 53,2, 51,4, 50,9, 49,3, 46,8, 43,4, 42,4, 41,1, 38,9, 37,4, 28,6, 26,9, 26,5, 24,3, 22,5, 21,0, 13,4, 12,6, 12,3. **IR** (pur, ν (cm<sup>-1</sup>)) 2958, 2940, 1705, 1697, 1459, 1384, 1042, 967. **SMBR** (m/z, intensité relative) 387 (M-CH<sub>3</sub>)<sup>+</sup> (100), 345 (15), 327 (35), 281 (30), 207 (90). Les données des spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C étaient conformes aux données de la littérature<sup>(37)</sup>.

### 6.3.4 Préparation du (20S)-3 $\alpha$ -5-cyclo-6-oxo-5 $\alpha$ -pregnane-20-carboxaldéhyde (**15**)



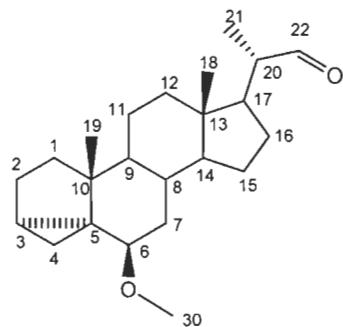
2,36 g de la cétone pentacyclique **30** (5,70 mmol) ont été dissous dans 180 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> contenant 1,80 mL de pyridine (22,3 mmol, 3,91 éq). La solution a été refroidie à -78 °C et l'ozone a été bullé dans la solution (débit modéré). Le bullage a été maintenu jusqu'à l'obtention d'une coloration bleue dans le mélange, puis le mélange a été laissé sous agitation à -78 °C jusqu'à disparition de cette coloration bleue (mettre un courant d'air si nécessaire). 3,70 g de zinc métallique (57,0 mmol, 10,0 éq) et 6,00 mL d'acide acétique glacial (134 mmol, 23,0 éq) ont été alors introduits et le mélange réactionnel a été ramené à température ambiante. Après 1 h d'agitation à température ambiante, le zinc a été filtré sur celite. Le filtrat a été, par la suite, concentré sous vide. L'huile résultante a été diluée dans l'eau et le produit a été extrait à l'aide d'EtOAc (x 3). La phase organique a été ensuite lavée avec une solution aqueuse saturée de NaHCO<sub>3</sub> (x 2), de l'eau (2X) ainsi qu'avec une solution aqueuse saturée de NaCl (x 2). La phase organique a été ensuite séchée avec MgSO<sub>4</sub> puis filtrée. Après évaporation sous vide on a obtenu 1,79 g de **15** sous forme d'une huile jaune. Cette huile a été purifiée par chromatographie éclair et l'élution avec du benzène (100 %) a fourni 0,56 g de **15** (30 %) sous la forme d'un gel transparent. **RMN** <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 9.56 (dd, 1H, J = 7.1, 4.1 Hz, H-22), 2.58-2.23 (m, 3H, H-7 et H-20), 2.12-0.84 (m, 22H), 0.82-0.58 (m, 6H). **SMBR** (m/z, intensité relative) 328 (M<sup>+</sup>) (100), 315 (50), 310 (50), 300 (40), 136 (98).

### 6.3.5 Préparation du i-stigmastéryl méthyl éther (31)



5,94 g du mésylate 28 (12,1 mmol) ont été suspendus dans 220 mL de méthanol. À cette solution ont été ajoutés 6,50 g d'acétate de potassium (66,6 mmol, 5,50 éq). La suspension a été portée à reflux pendant 3 h puis refroidie à température ambiante. Le solvant a été évaporé sous vide et le résidu obtenu a été dilué dans l'eau. La phase aqueuse a été alors extraite à l'EtOAc (3X). La phase organique a été lavée avec une solution aqueuse saturée de NaCl (x 2), séchée avec  $\text{MgSO}_4$  puis filtrée. Après évaporation sous vide, on a obtenu 4,3 g de 31 sous forme d'une huile brune. Cette huile a été purifiée par chromatographie éclair et l'élution avec du benzène (100 %) a fourni 3,40 g (67 %) de 31 sous la forme d'un gel transparent.  $T_{\text{fus}}$  (EtOH) 55-57°C **RMN**  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 5,08 (qd, 2H,  $J = 15,2, 8,1$  Hz, H-22 et H-23), 3,32 (s, 3H, H-30), 2,77 (t, 1H,  $J = 2,7$  Hz, H-6), 2,14-0,71 (m, 20H), 0,65 (t, 2H,  $J = 7$  Hz, H-4), 0,43 (dd, 1H,  $J = 7,9, 5,0$  Hz, H-3). **RMN**  $^{13}\text{C}$  (50,6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm), 138,4 (C-22), 129,2 (C-23), 82,4 (C-6), 56,6, 56,5 56,1, 51,2, 48,1, 43,4, 42,7, 40,5, 40,2, 35,3, 35,1, 33,4, 31,9, 30,5 29,0, 25,4, 25,0, 24,3, 22,8, 21,5, 21,2, 21,1, 19,3, 19,0, 13,1, 12,4, 12,2. **IR** (pur,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ )) 3060, 2952, 2925, 2868, 1456, 1382, 1099, 967. **SMBR** ( $m/z$ , intensité relative) 426 ( $\text{M}^+$ ) (40), 411 (50), 394 (55), 371 (85), 255 (90), 83 (100). Les données des spectres **RMN**  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  étaient conformes aux données de la littérature<sup>(51)</sup>.

6.3.6 Préparation du (20*S*)-3*α*-5-cyclo-6*β*-méthoxy-5*α*-pregnane-20-carboxaldéhyde (**16**)

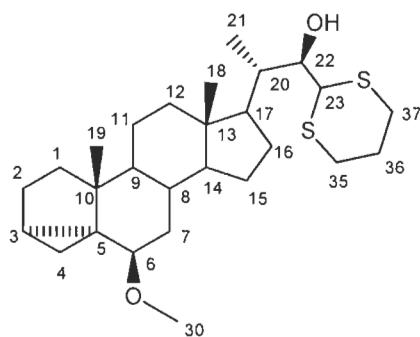


2,05 g du **31** (4,80 mmol) ont été dissous dans 30,0 mL d'un mélange THF/H<sub>2</sub>O 5 : 1. À cette solution ont été ajoutés 2,25 g de NMO (12,2 mmol, 4,00 éq), 0,20 g de NaHCO<sub>3</sub> (2,40 mmol, 0,50 éq.), 0,46 g de méthanesulfonamide (4,80 mmol, 1,00 éq.) et 1,93 mL d'une solution de OsO<sub>4</sub> 2,5 % dans t-BuOH (0,19 mmol, 0,04 éq.). Le mélange réactionnel a été agité à 40 °C pendant 10 jours. 0,58 g de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et 1,75 g de NaSO<sub>3</sub> aq. dans 9,00 mL d'eau ont alors été ajoutés et le mélange a été laissé sous agitation à 40 °C pendant 5 h. Le solvant a été alors évaporé sous vide et le résidu a été extrait à l'EtOAc (x 3). La phase organique a été ensuite lavée avec une solution 5 % aqueuse de NaHSO<sub>3</sub> (x 2), une solution aqueuse saturée de NaHCO<sub>3</sub> (x 2), ainsi qu'avec une solution aqueuse saturée de NaCl (x 2). La phase organique a été ensuite séchée avec MgSO<sub>4</sub> puis filtrée. Après évaporation sous vide on a obtenu 1,79 g de **32** sous forme d'une huile jaune. Le produit brut a été directement utilisé pour la prochaine réaction.

Sous atmosphère de N<sub>2</sub> et en condition anhydre, 1,79 g de **32** (3,88 mmol), 0,33 g de NaHCO<sub>3</sub> (3,88 mmol, 1,00 éq.), 0,89 g de H<sub>5</sub>IO<sub>6</sub> (3,88 mmol, 1,00 éq.) ont été dissous dans 20,0 mL de THF et 70 µL de pyridine (0,87 mmol, 0,22 éq). Le mélange réactionnel a été agité à température ambiante pendant 3 h. La solution a été filtrée sous vide afin d'enlever le précipité (HIO<sub>3</sub>). Le solide récupéré a été ensuite lavé avec du THF. Le filtrat a été alors évaporé sous vide afin d'obtenir une huile jaune. Du NaHSO<sub>3</sub> 5 % aqueux fraîchement préparé a été ajouté à cette

dernière et le mélange a été agité à température ambiante pour 30 min. Une solution de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10 % aqueuse a été ensuite ajoutée et le tout a été agité 30 min à température ambiante. Le produit a été extrait à l'aide de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (x 3). La phase organique a été ensuite lavée avec une solution 5 % aqueuse de  $\text{NaHSO}_3$  (x 2), une solution aqueuse saturée de  $\text{NaCl}$  (x 2), et ensuite séchée avec  $\text{MgSO}_4$  puis filtrée. Après évaporation sous vide on a obtenu 1,42 g de **16** sous forme d'une huile jaune. Cette huile a été purifiée par chromatographie éclair et l'élution avec du benzène (100 %) a fourni 0,57 g (50 %) de **16** sous la forme d'un gel solide opaque.  $T_{\text{fus}}$  ( $\text{EtOH}$ ) 80-82°C **RMN**  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 9,58 (d, 1H,  $J$  = 3,2 Hz, H-22), 3,19 (s, 3H, H-30), 2,64 (t, 1H,  $J$  = 2,8 Hz, H-6), 2,24 (m, 1H, H-20), 1,88-0,60 (m, 30H), 0,52 (t, 1H,  $J$  = 5,1 Hz, H-4 $\alpha$  ou H-4 $\beta$ ), 0,31 (dd, 1H,  $J$  = 8,0, 5,1 Hz, H-3). **IR** (pur,  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ )), 2952, 2925, 2868, 1732, 1100, 967. **RMN**  $^{13}\text{C}$  (50,6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm), 205,2 (C-22), 82,3 (C-6), 56,6, 55,7 51,2, 49,5, 48,0, 43,4, 43,3, 39,9, 35,2, 35,1, 33,3, 30,5, 27,1, 24,9, 24,5 22,7, 21,4, 19,3, 13,4, 13,1, 12,6. **SMBR** ( $m/z$ , intensité relative) 344 ( $\text{M}^+$ ) (20), 329 (60), 312 (50), 289 (100). Les données des spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  étaient conformes aux données de la littérature<sup>(51)</sup>.

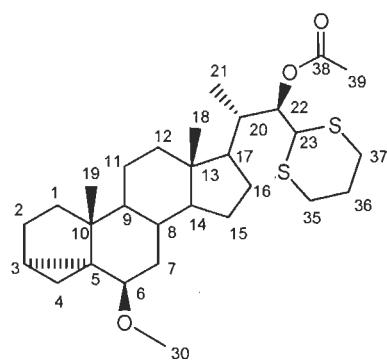
### 6.3.7 Préparation du (20S, 22R)-22-hydroxy-6 $\beta$ -méthoxy-3 $\alpha$ ,5-cyclo-24-nor-5 $\alpha$ -cholan-23-al triméthylénedithioacétal (**43a**)



Sous atmosphère de  $\text{N}_2$  et en condition anhydre, 183 mg de 1,3-dithiane (1,52 mmol, 5,00 éq) ont été dissous dans 5,00 mL de THF. La solution a été refroidie à 0 °C dans un bain de glace puis 0,99 mL de 1,54 M n-butyllithium dans l'hexane (5,00 éq) a été ajouté à l'aide d'une seringue. Le mélange a été laissé sous

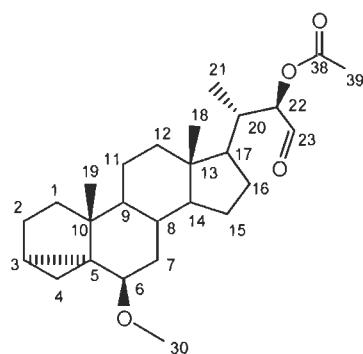
agitation pendant 1h à température ambiante puis transféré à une solution de l'aldehyde **16** (105 mg, 0,30 mmol) dans 2,00 mL de THF. Le mélange résultant a été laissé sous agitation à température ambiante pendant 2 h. De l'eau a été ajoutée à la solution et le mélange a été agité à température ambiante pendant 15 min. Le produit a été extrait à l'aide d'éther (x 3). La phase organique a été lavée avec une solution aqueuse saturée de NaCl (x 2), et ensuite séchée avec MgSO<sub>4</sub> puis filtrée. Après évaporation sous vide on a obtenu 0,22 g de **43a** sous forme d'une huile jaune. Cette huile a été purifiée par chromatographie éclair en utilisant un gradient hexane/ether (0 → 6 %) afin de fournir 0,12 g (86 %) de **43a** sous la forme d'un solide blanc. **T<sub>fus</sub>** (EtOH) 161-163°C **RMN** <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 3,91 (d, 1H, *J* = 10,1 Hz, H-22), 3,77 (d, 1H, *J* = 10,1 Hz, H-23), 3,32 (s, 3H, H-30), 3,03-2,82 (m, 2H, H-35 ou H-37), 2,77 (m, 1H, H-6), 2,73-2,61 (m, 2H, H-35 ou H-37), 2,38 (s, 1H, OH), 2,12-0,80 (m, 28H), 0,75 (s, 3H, H-18), 0,64 (t, 1H, *J* = 4,6 Hz, H-4), 0,43 (dd, 1H, *J* = 7,9, 5,1 Hz, H-3). **RMN** <sup>13</sup>C (50,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm), 82,4 (C-6), 71,7 (C-22), 56,6, 56,4, 52,8, 48,8, 48,0, 43,4, 42,8, 40,2, 37,0, 35,2, 35,1, 33,3, 30,6, 28,0, 27,1, 26,5, 25,4, 24,9, 24,1, 22,8, 21,5, 19,3, 13,2, 12,2 11,4. **IR** (pur, *v* (cm<sup>-1</sup>)) 3455, 2931, 2867, 1455, 1096, 969 **SMHR** calculée pour C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub> (MH<sup>+</sup>): 464,2758; trouvée : 464,2783. Les données des spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C étaient conformes aux données de la littérature<sup>(46)</sup>.

### 6.3.8 Préparation du (20S, 22R)-22-acétoxy-6β-méthoxy-3α,5-cyclo-24-nor-5α-cholan-23-al triméthylénedithioacétal (**46**)



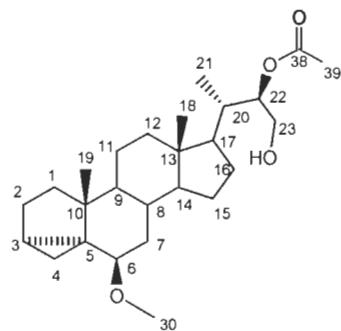
128 mg du dithioacétal **43a** (0,27 mmol) ont été dissous dans 8,00 mL de pyridine et 3,20 mL d'anhydride acétique. Le mélange a été laissé sous agitation à température ambiante pendant 16 h. Le mélange réactionnel a été versé dans une solution aqueuse saturée de NaHCO<sub>3</sub> préalablement refroidie et le tout a été laissé sous agitation pendant 15 min. Le produit a été alors extrait à l'aide d'EtOAc (x 3). La phase organique a été lavée avec une solution aqueuse saturée de NaCl (x 2), et ensuite séchée avec MgSO<sub>4</sub> puis filtrée. Après évaporation sous vide on a obtenu 0,12 g (84 %) de **46** pur sous la forme d'un solide poudreux blanc. **T<sub>fus</sub>** (EtOH) 142-145 °C. **RMN** <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 5,39 (dd, 1H, *J* = 10,6, 1,9 Hz, H-22), 3,76 (d, 1H, *J* = 10,5 Hz, H-23), 3,32 (s, 3H, H-30), 3,08-2,84 (m, 2H, H-35 et H-37), 2,76 (s, 1H, H-6), 2,70-2,47 (m, 2H, H-35 et H-37), 2,08 (s, 3H, H-39), 2,05-0,81 (m, 28H), 0,76 (s, 3H, H-18), 0,64 (t, 1H, *J* = 4,8 Hz, H-4), 0,43 (dd, 1H, *J* = 7,9, 5,1 Hz, H-3). **RMN** <sup>13</sup>C (50,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm), 170,7 (C-38), 82,3 (C-6), 73,5 (C-22), 56,5, 56,5, 52,9, 48,0, 45,3, 43,3, 42,8, 40,2, 37,2, 35,2, 34,9, 33,3, 30,5, 28,5, 26,8, 26,4, 25,3, 24,9, 24,1, 22,7, 21,5, 20,9, 19,2, 13,0, 12,2, 12,1. **IR** (pur,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>)) 2935, 2902, 2861, 1736, 1449, 1365, 1223, 1095, 1008. **SMHR** calculée pour C<sub>29</sub>H<sub>46</sub>O<sub>3</sub>S<sub>2</sub> (MH<sup>+</sup>): 506,2894; trouvée : 506,2888. Les données des spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C étaient conformes aux données de la littérature<sup>(46)</sup>.

### 6.3.9 Préparation du (20S, 22R)-22-acétoxy-6β-méthoxy-3α,5-cyclo-24-nor-5α-cholan-23-al (**38**)



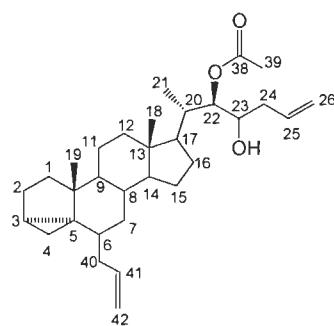
À une solution de **46** (50,0 mg, 0,10 mmol) dans 2,00 mL d'acétone ont été ajoutés 292 mg de BaCO<sub>3</sub> (1,48 mmol, 15,0 éq) à 0 °C dans un bain de glace. Une solution de NBS (263 mg, 1,48 mmol, 15,0 éq) dans 6,00 mL d'un mélange acétone/eau (2 :1) a été ajoutée au mélange et le tout a été agité pendant 45 min à température ambiante. L'acétone a été évaporée sous vide et le résidu a été dilué dans l'ether. Une solution aqueuse saturée de NaHSO<sub>3</sub> a été ajoutée goutte à goutte au mélange (jusqu'à disparition de la couleur jaune) puis la solution a été filtrée sous vide. Le filtrat a été alors extrait à l'éther (3X). La phase organique a été lavée avec une solution aqueuse saturée de NaCl (x 2), séchée avec MgSO<sub>4</sub> puis filtrée. Après évaporation sous vide 38,0 mg (93 %) de **38** pur a été obtenu sous la forme d'un solide poudreux blanc. **T<sub>fus</sub>** (EtOH) 50-52°C **RMN** <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 9,49 (s, 1H, H-23), 5,11 (d, 1H, J = 1,9 Hz, H-22), 3,32 (s, 3H, H-30), 2,76 (s, 1H, H-6), 2,17 (s, 3H, H-39), 2,05-0,82 (m, 27H), 0,76 (s, 3H, H-18), 0,64 (t, 1H, J = 4,8 Hz, H-4), 0,43 (dd, 1H, J = 7,9, 5,1 Hz, H-3). **RMN** <sup>13</sup>C (50,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm), 199,3 (C-23), 170,7 (C-38), 82,3 (C-6), 81,4 (C-22), 56,6, 56,5, 52,0, 47,9, 43,3, 42,7, 40,4, 36,1, 35,2, 35,0, 33,3, 30,6, 28,0, 24,9, 23,9, 22,7, 21,5, 20,6, 19,3, 14,1, 13,1, 12,2. **IR** (pur, ν (cm<sup>-1</sup>)) 2932, 2865, 1736, 1456, 1372, 1227, 1099, 1082, 1018. **SMBR** (m/z, intensité relative) 416 (M<sup>+</sup>) (25), 401 (70), 384 (60), 361 (100). Les données des spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C étaient conformes aux données de la littérature<sup>(46)</sup>.

### 6.3.10 Préparation du (20S, 22R)-22-acétoxy-6β-méthoxy-3α, 5-cyclo-24-nor-5α-cholán-23-ol (**47**)



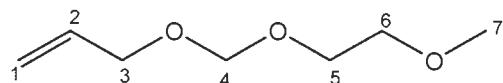
Sous atmosphère de N<sub>2</sub> et en condition anhydre, 20,0 mg de l'aldéhyde **16** (0,06 mmol) ont été dissous dans 2,00 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La solution a été refroidie à -78 °C puis 0,11 mL du chlorure de zinc (ZnCl<sub>2</sub>) (0,12 mmol, 2,00 éq) a été ajouté à l'aide d'une seringue. Le mélange a été laissé sous agitation pendant 15 minutes à -78 °C puis 29 µL d'hydrude de tributylétain (0,12 mmol, 2,00 éq) ont été ajoutés. La solution a été laissée sous agitation pendant 1,5 h à -78 °C puis laissée revenir à température ambiante. 2 mL d'eau a été ajoutée au mélange réactionnel, la phase organique a été séparée et la phase aqueuse a été extraite à l'aide du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La phase organique a été lavée avec une solution aqueuse saturée de NaCl (x 2), et ensuite séchée avec MgSO<sub>4</sub> puis filtrée. Après évaporation sous vide on a obtenu 26,0 mg de **47** sous forme d'une huile jaune. Cette huile a été purifiée par chromatographie éclair en utilisant la méthode de Harrowven<sup>(62)</sup> à l'aide d'un gradient hexane/ether (0 → 20 %) afin d'obtenir 8,6 mg (43 %) de **47** sous forme d'une huile transparente. **RMN** <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 5,04-4,93 (m, 1H, H-22), 3,78-3,57 (m, 2H, H-23), 3,32 (s, 3H, H-30), 2,76 (s, 1H, H-6), 2,10 (s, 3H, H-39), 2,05-0,82 (m, 27H), 0,76 (s, 3H, H-18), 0,64 (t, 1H, J = 4,8 Hz, H-4), 0,43 (dd, 1H, J = 7,9, 5,1 Hz, H-3). **RMN** <sup>13</sup>C (50,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm), 172,4 (C-38), 82,3 (C-6), 78,5 (C-22), 64,9 (C-23), 56,6, 56,4, 52,5, 48,0, 43,3, 42,7, 40,2, 37,5, 35,6, 34,9, 33,3, 30,5, 28,0, 24,9, 24,0, 22,8, 21,5, 21,1, 19,3, 13,3, 13,1, 12,1. **IR** (pur, ν (cm<sup>-1</sup>)) 3400, 2932, 2868, 1736, 1719, 1453, 1372, 1237, 1095, 1021. **SMHR** calculée pour C<sub>26</sub>H<sub>42</sub>O<sub>4</sub> (MH<sup>+</sup>): 418,3085; trouvée : 418,3083.

### 6.3.11 Préparation du composé disubstitué **49**



Sous atmosphère de N<sub>2</sub> et en condition anhydre, 50,0 mg de l'aldéhyde **16** (0,10 mmol) ont été dissous dans 2,00 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La solution a été refroidie à -78 °C puis 25 µL de trifluorure de bore étérate (BF<sub>3</sub>OEt<sub>2</sub>) (0,20 mmol, 2,00 éq) ont été ajoutés à l'aide d'une seringue. Le mélange a été laissé sous agitation pendant 15 minutes à -78 °C puis 61 µL de l'allyltributylstannane (0,20 mmol, 2,00 éq) ont été ajoutés. La solution a été laissée sous agitation pendant 1h à -78 °C. Cette dernière a été ramenée à température ambiante puis laissée sous agitation pendant 1 h. De l'eau a été alors ajoutée au mélange réactionnel, la phase organique a été séparée et la phase aqueuse a été extraite à l'aide du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La phase organique a été lavée avec une solution aqueuse saturée de NaCl (x 2), et ensuite séchée avec MgSO<sub>4</sub> puis filtrée. Après évaporation sous vide on a obtenu 76,0 mg de **49** sous forme d'un solide blanc. Cette huile a été purifiée par chromatographie éclair en utilisant la méthode de Harrowven<sup>(62)</sup> à l'aide d'un gradient hexane/ether (0 → 20 %) afin d'obtenir 15,0 mg (27 %) de **49** sous la forme d'un solide blanc. **RMN** <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 5,97–5,56 (m, 2H, H-25 et H-41), 5,26–5,08 (m, 2H, H-26 et H-42), 4,92 (m, 3H, H-26, H-42 et H-22), 3,68 (m, 1H, H-23), 2,10 (s, 3H, H-39), 2,05–0,82 (m, 27H), 0,76 (s, 3H, H-18), 0,64 (t, 1H, J = 4,8 Hz, H-4), 0,43 (dd, 1H, J = 7,9, 5,1 Hz, H-3). **RMN** <sup>13</sup>C (50,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm), 170,6 (C-38), 139,2 (C-25), 134,1 (C-41), 119,3 (C-26), 114,8 (C-42), 76,4 (C-22), 68,7 (C-23), 56,4, 52,6, 48,1, 42,9, 42,7, 40,7, 40,2, 38,5, 37,5, 37,4, 36,4, 33,8, 32,8, 30,4, 28,2, 26,4, 25,3, 24,2, 22,7, 21,0, 20,2, 12,7, 12,2, 12,0. **IR** (pur, ν (cm<sup>-1</sup>)) 3488, 3073, 2938, 2864, 1637, 1439, 1362, 1240, 1216, 1017, 913. **SMHR** calculée pour C<sub>31</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub> (MH<sup>+</sup>): à venir

### 6.3.12 3-(2-méthoxy-éthoxyméthoxy)-propène (**53**)

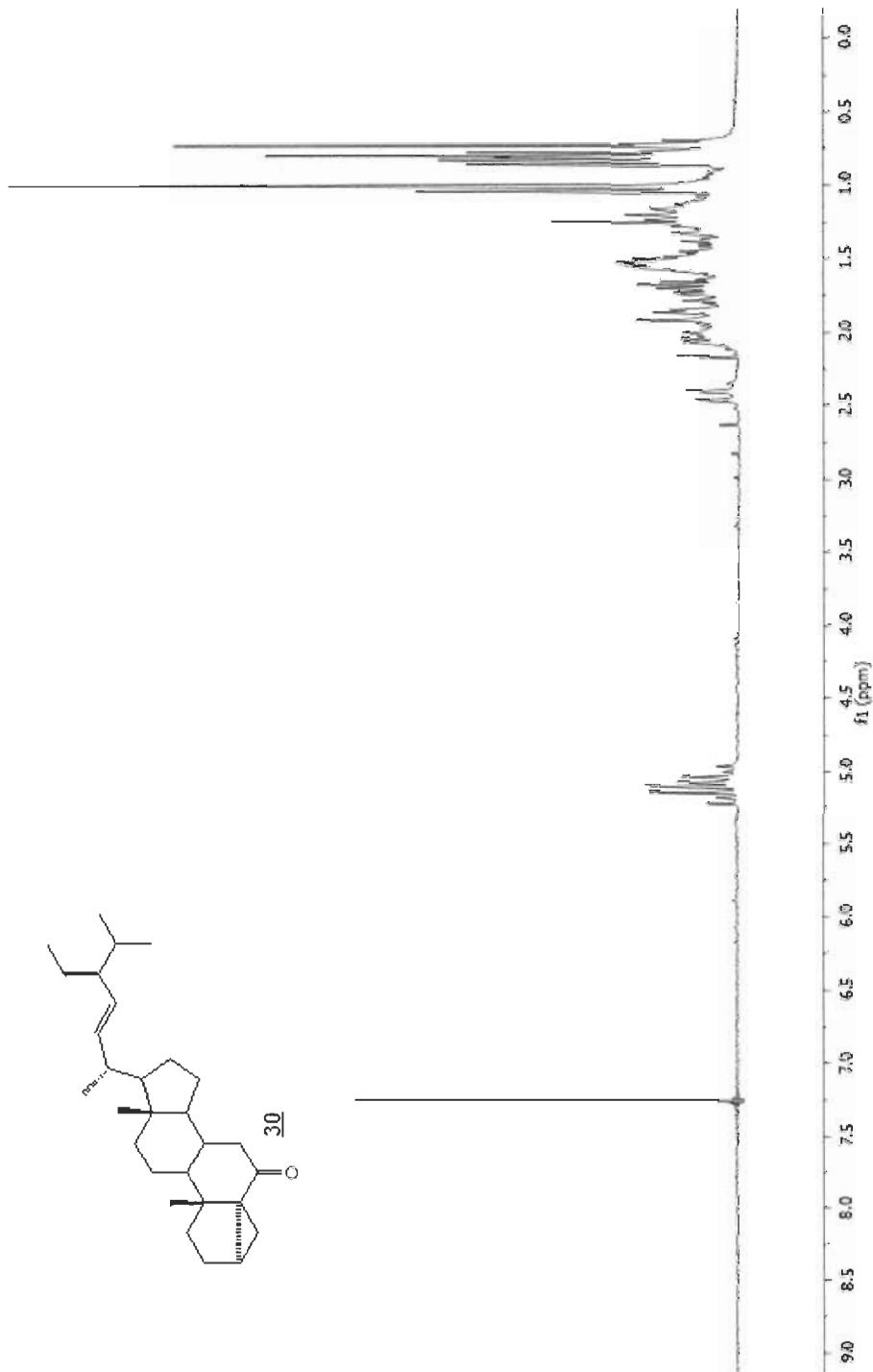


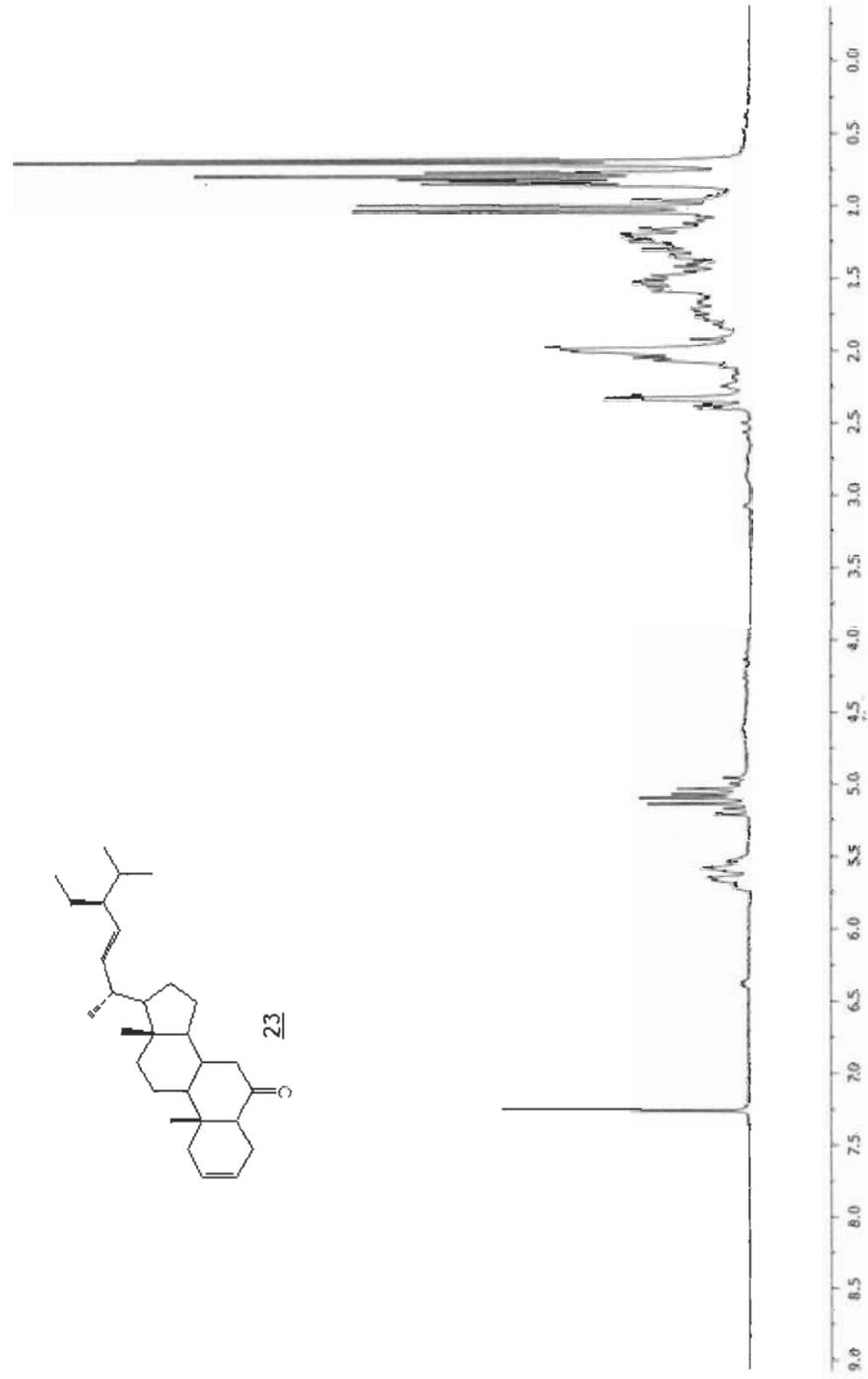
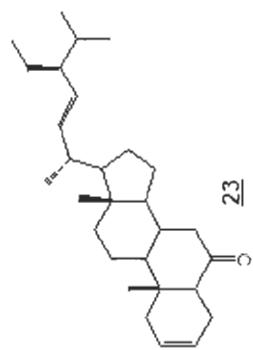
Sous atmosphère de N<sub>2</sub> et en condition anhydre, 6,80 mL de l'alcool allylique (1,00 mol) et 19,0 mL de N,N-diisopropylethylamine (1,10 mol, 1,10 éq) ont été

refroidis à 0 °C dans un bain de glace sous agitation. À cette solution 12,6 mL de chlorure de méthoxyethoxyméthyle (1,10 mol, 1,10 éq) ont été ajoutés goutte à goutte et le mélange a été laissé pendant 15 min à 0 °C avant de le laisser graduellement revenir à température ambiante. La solution a été laissée sous agitation à température ambiante pendant 3 h. De l'eau a été ajoutée au mélange réactionnel et la phase aqueuse a été extraite à l'aide de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (X 3). La phase organique a été ensuite lavée avec une solution aqueuse saturée de NaCl (x 2), séchée avec MgSO<sub>4</sub> puis filtrée. Après évaporation sous vide 12,7 g (87 %) de **53** pur a été obtenu sous forme d'un liquide jaune. **RMN** <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 5.91 (ddt, 1H, *J* = 17.2, 10.5, 5.6 Hz, H-2), 5.39 – 5.05 (m, 2H, H-1), 4.80 – 4.64 (m, 2H, H-4), 4.08 (dt, 2H, *J* = 5.6, 1.4 Hz, H-3), 3.70 (dt, 2H, *J* = 6.7, 4.0 Hz, H-5 ou H-6), 3.58 – 3.49 (m, 2H, H-5 ou H-6), 3.42 – 3.31 (m, 3H, H-7). **RMN** <sup>13</sup>C (50,6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm), 134,3 (C-2), 117,1 (C-1), 94,7 (C-4), 71,8 (C-6), 68,3 (C-3), 66,8 (C-5), 59,0 (C-7). **IR** (pur,  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>)) 3080, 2979, 2929, 2881, 2817, 1105, 1041, 991, 927. **SMBR** (*m/z*, intensité relative) 105 (10), 89 (60), 73 (45), 71 (80), 59 (100).

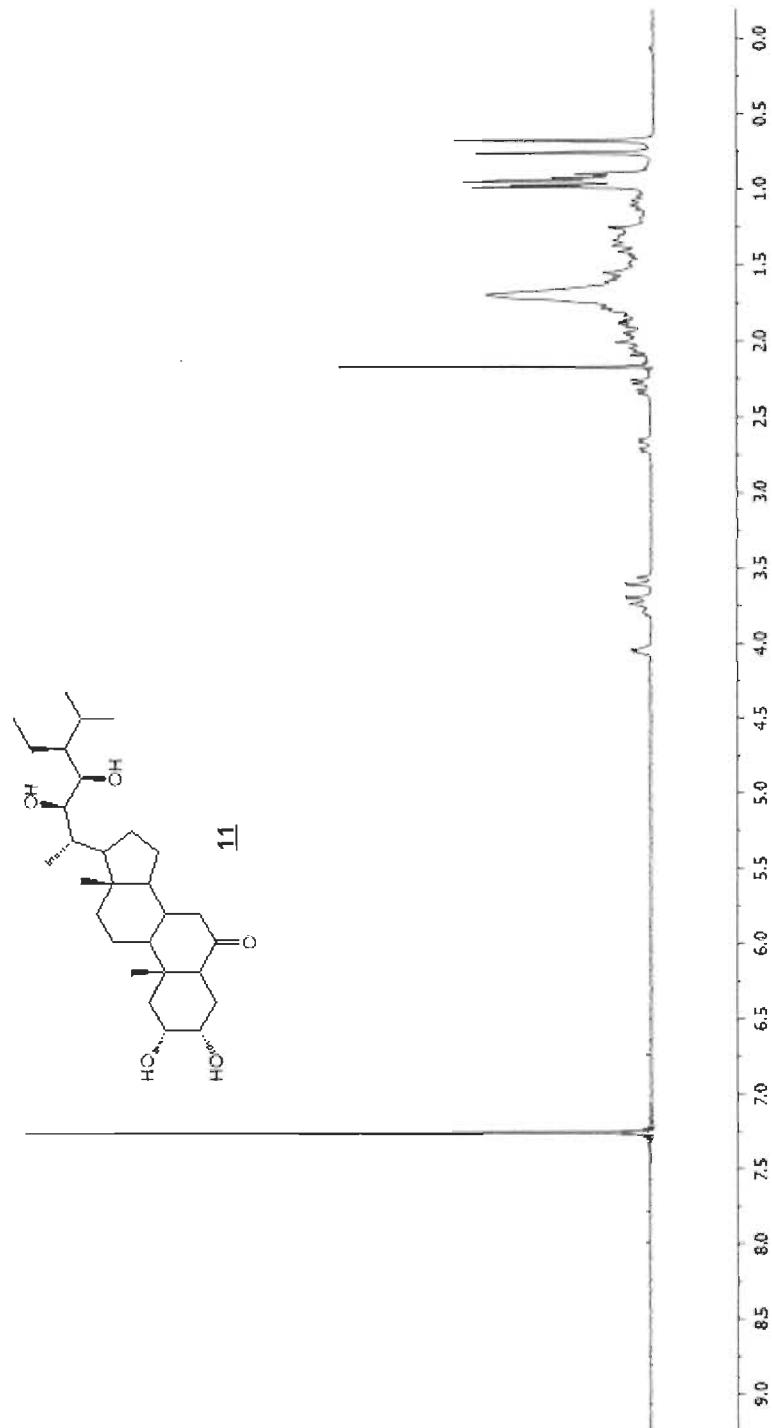
ANNEXE A

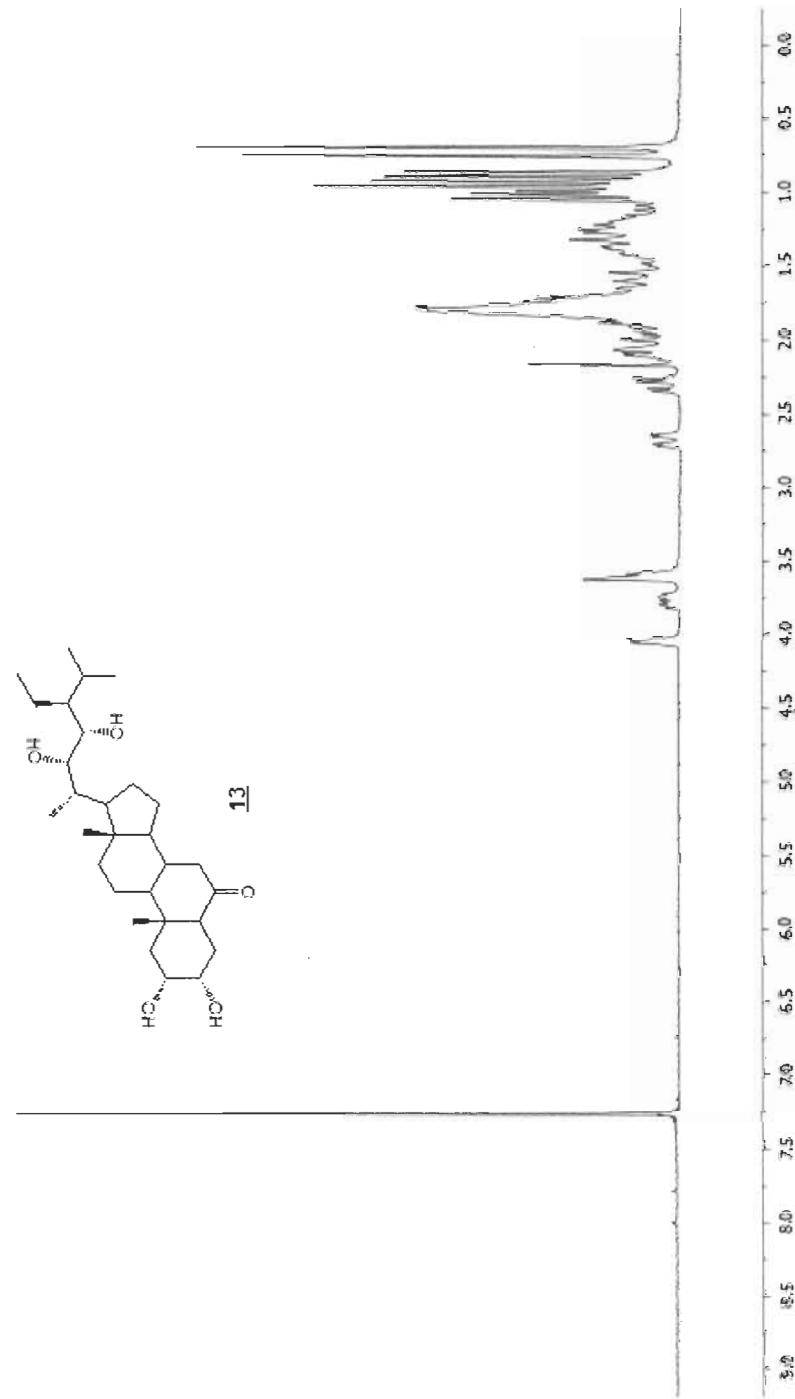
SPECTRES RMN  $^1\text{H}$

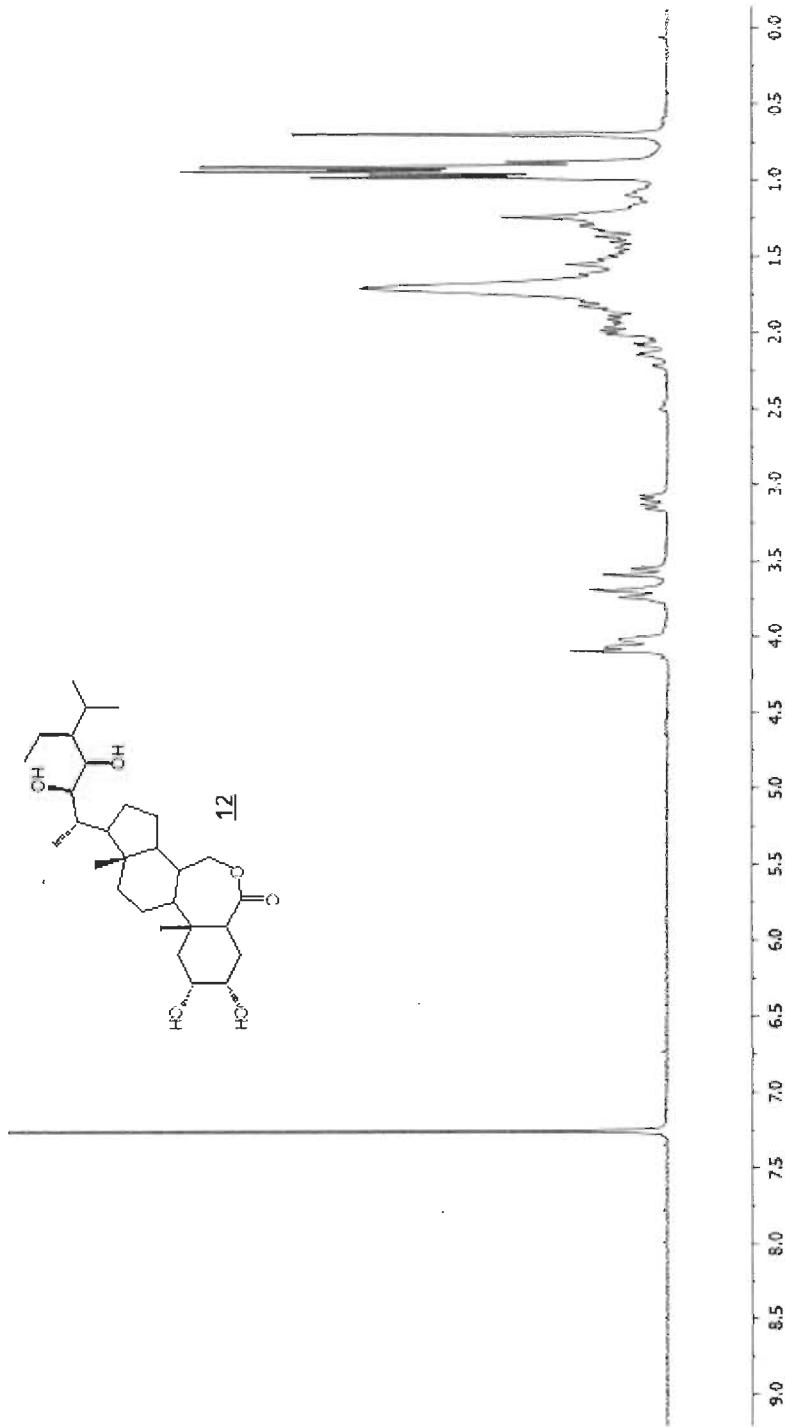
Spectre A.1 (22E, 24S)-3 $\alpha$ , 5-cyclo-stigmast-22-en-6-one (**30**)

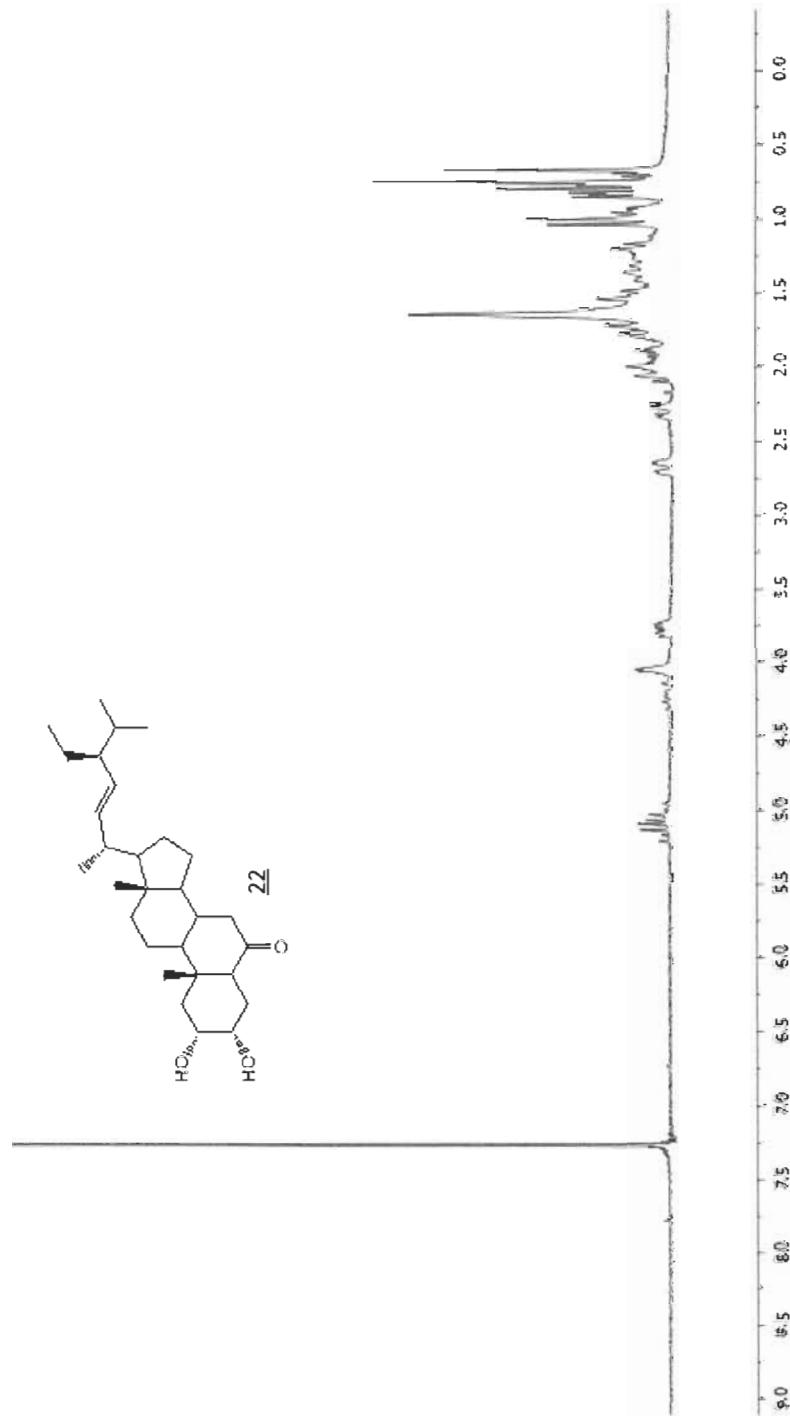
Spectre A.2 (22E, 24S)-stigmasta-2, 22-dién-6-one (23)

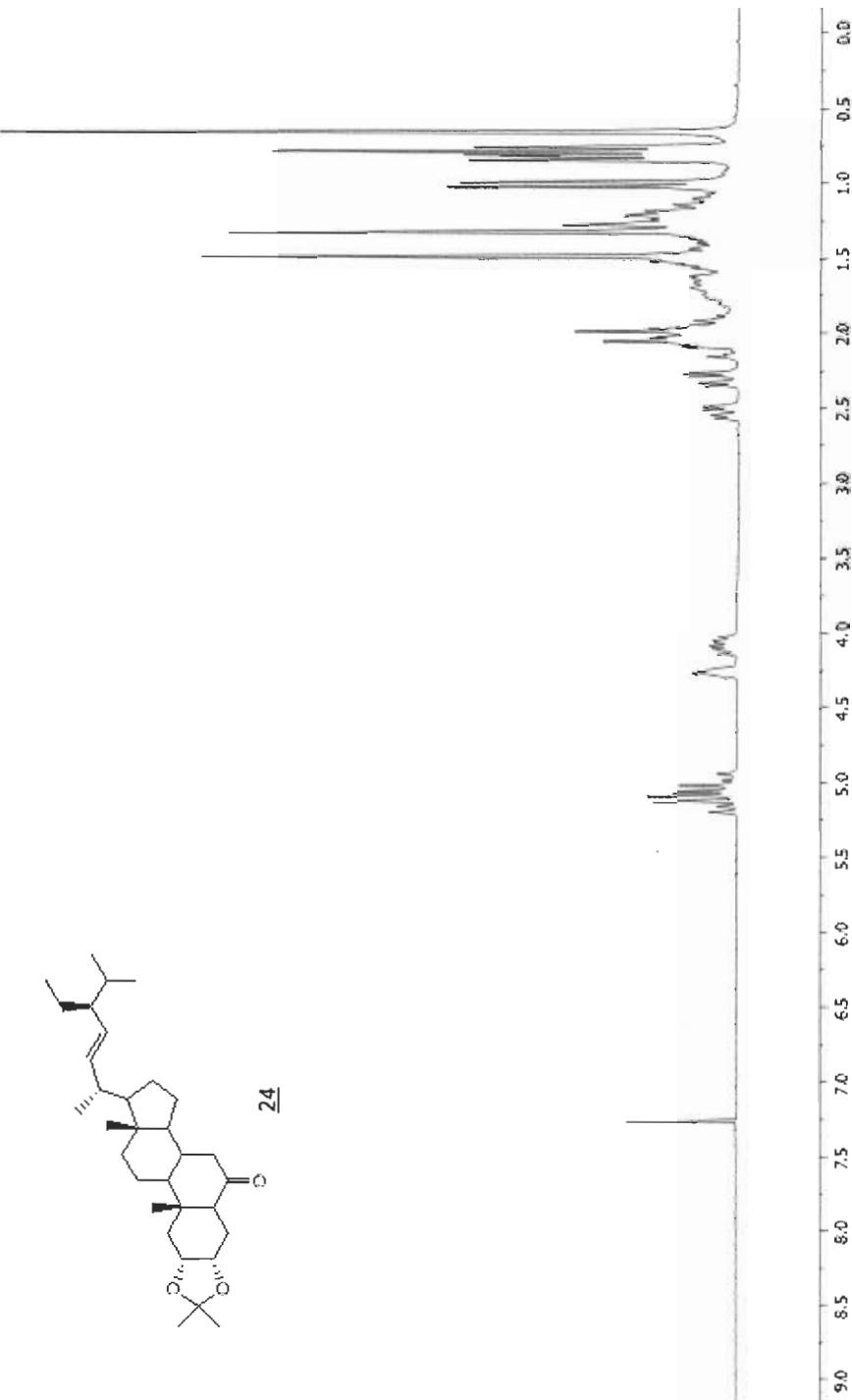
### Spectre A.3 22R, 23R-homocastastérone (11)

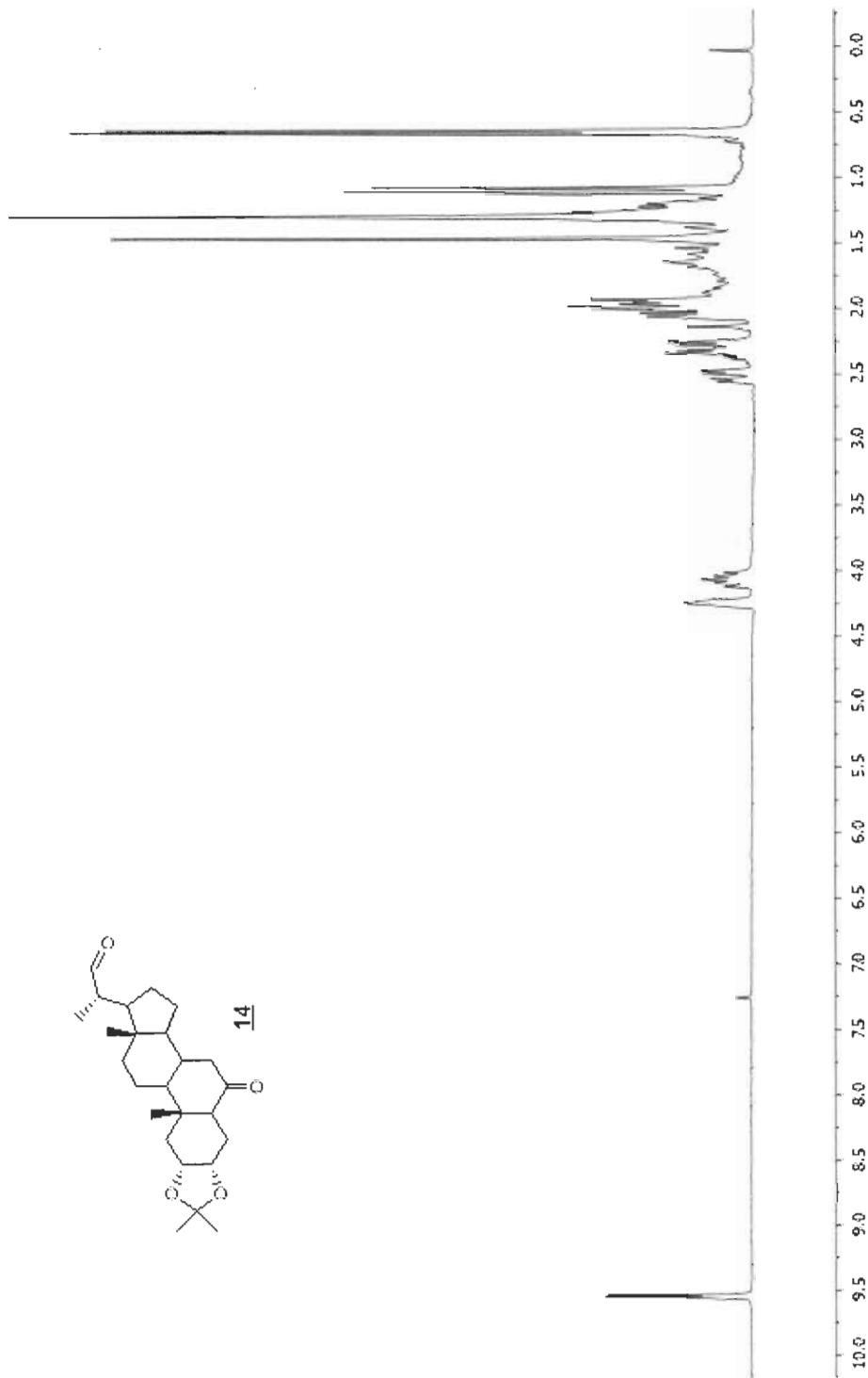


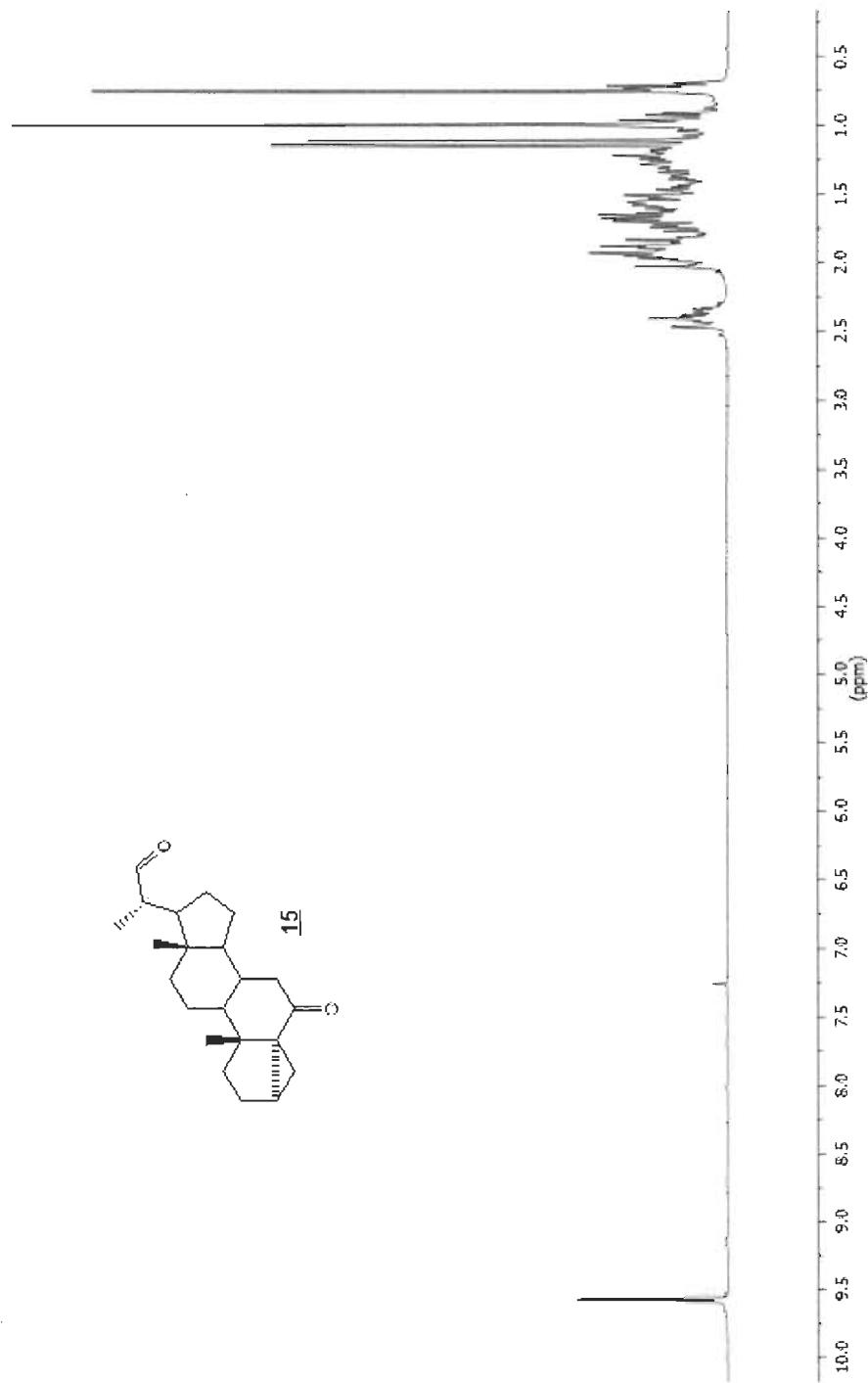
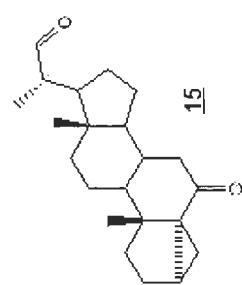
Spectre A.4 22S, 22S-homocastastérone (13)

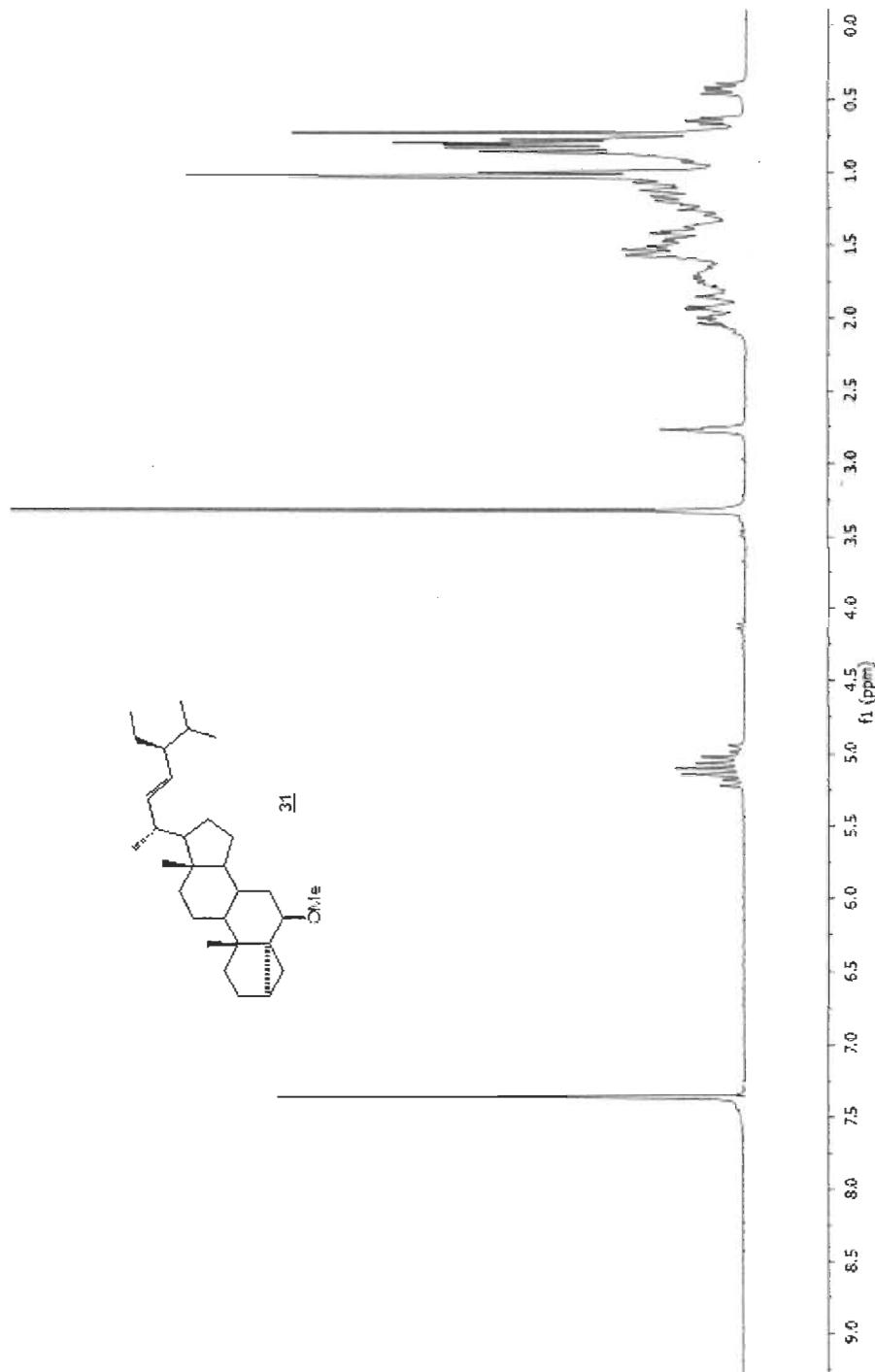
Spectre A.5 22R-23R-homobrassinolide (**12**)

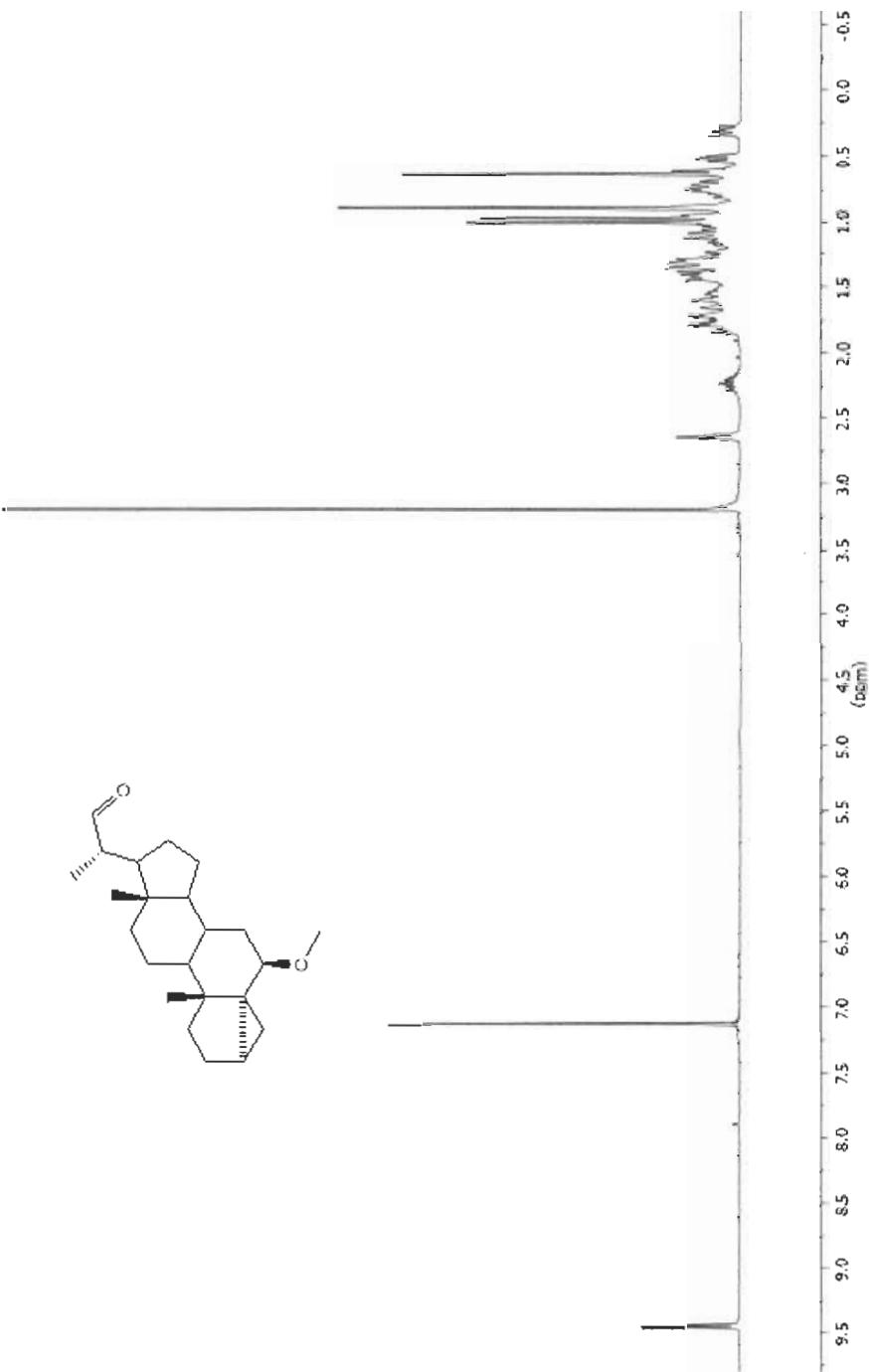
Spectre A.6 (22E, 24S)-2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one (**22**)

Spectre A.7 (22E, 24S)-2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -stigmastan-6-one, 2,3-acétonide (**24**)

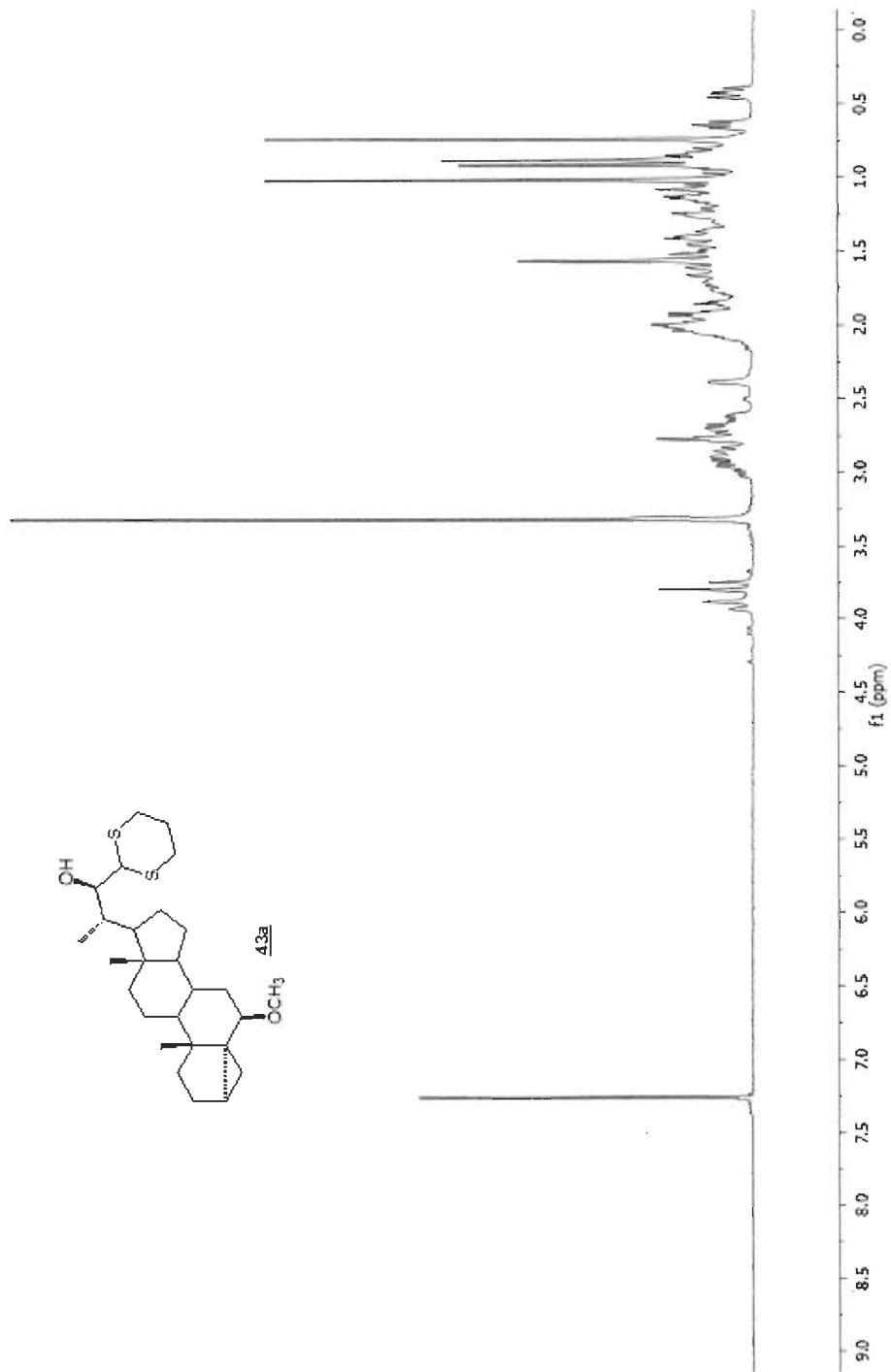
Spectre A.8 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -dihydroxy-6-oxo-5 $\alpha$ -stigmastan-22-al 2,3-acétonide (**14**)

Spectre A.9 (20S)-3 $\alpha$ -5-cyclo-6-oxo-5 $\alpha$ -pregnane-20-carboxaldéhyde (**15**)

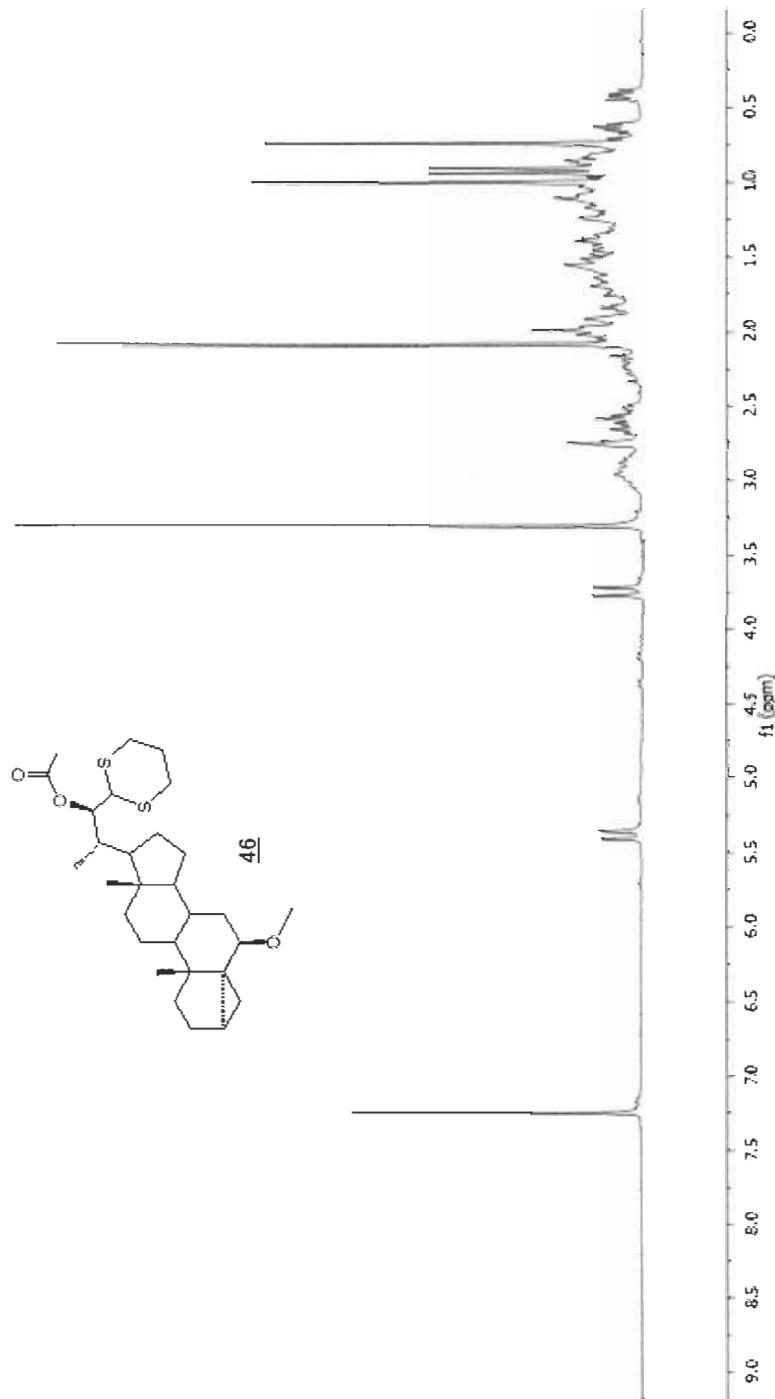
Spectre A.10 i-stigmasteryl méthyl éther (**31**)

Spectre A.11 (20S)-3 $\alpha$ -5-cyclo-6 $\beta$ -méthoxy-5 $\alpha$ -pregnane-20-carboxaldéhyde (**16**)

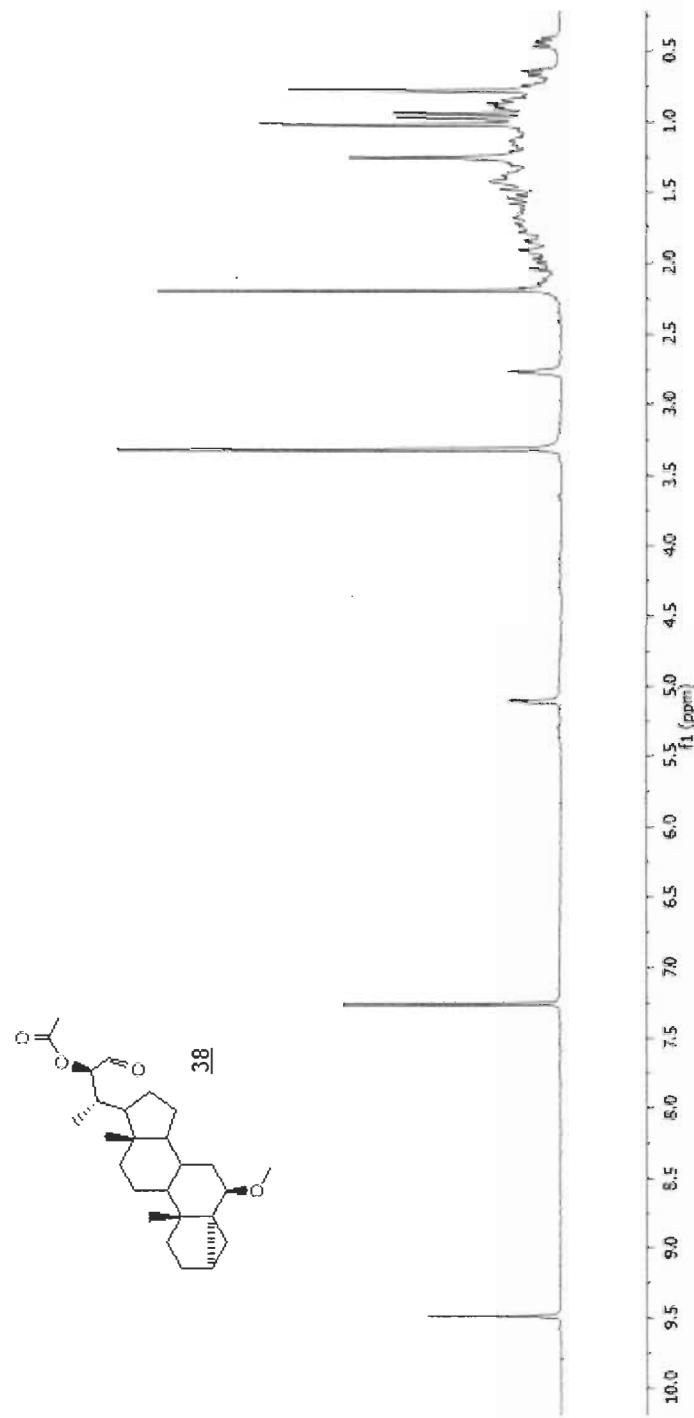
Spectre A.12 (20S, 22R)-22-hydroxy-6 $\beta$ -méthoxy-3 $\alpha$ ,5-cyclo-24-nor-5 $\alpha$ -cholan-23-al triméthylénedithioacétal (43a)



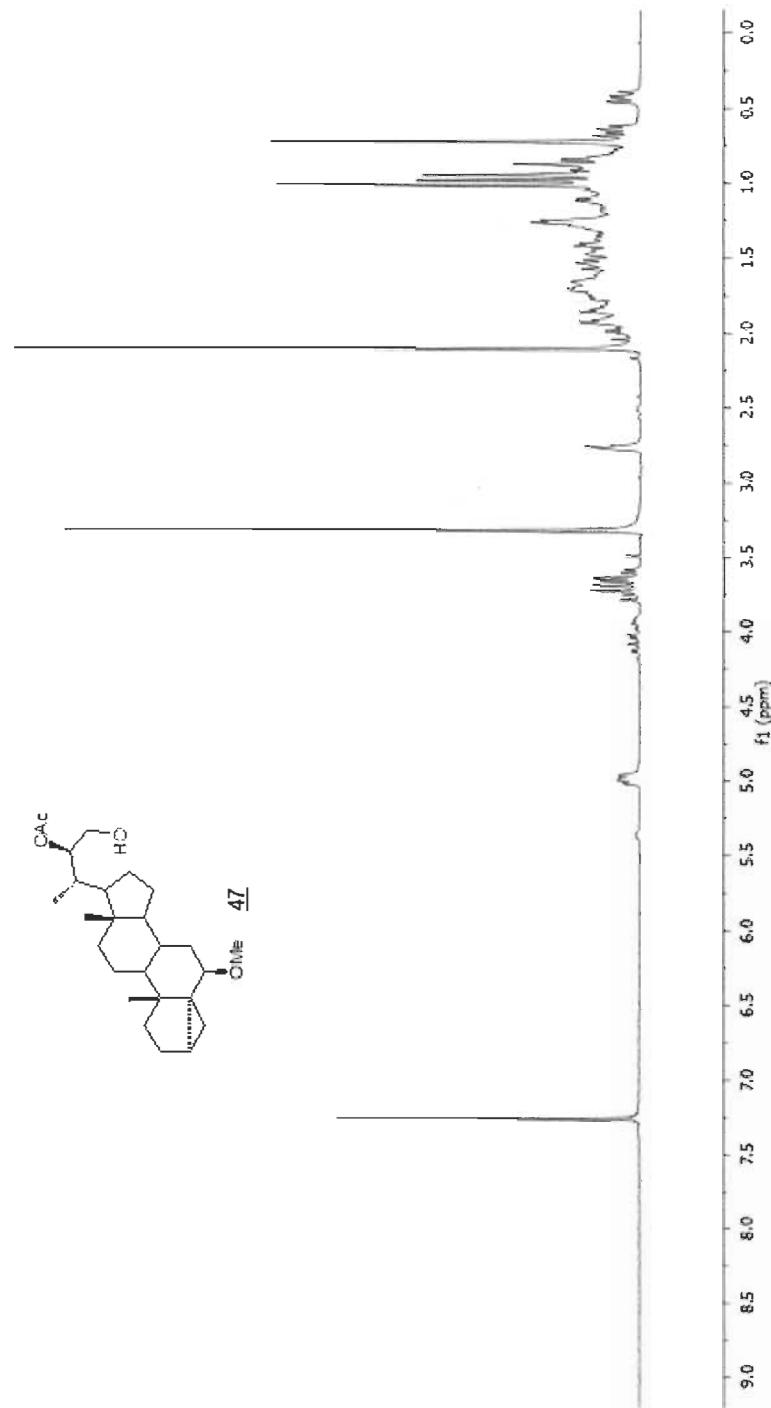
Spectre A.13 (20S, 22R)-22-acétoxy-6 $\beta$ -méthoxy-3 $\alpha$ ,5-cyclo-24-nor-5 $\alpha$ -cholan-23-al triméthylènedithioacétal (46)



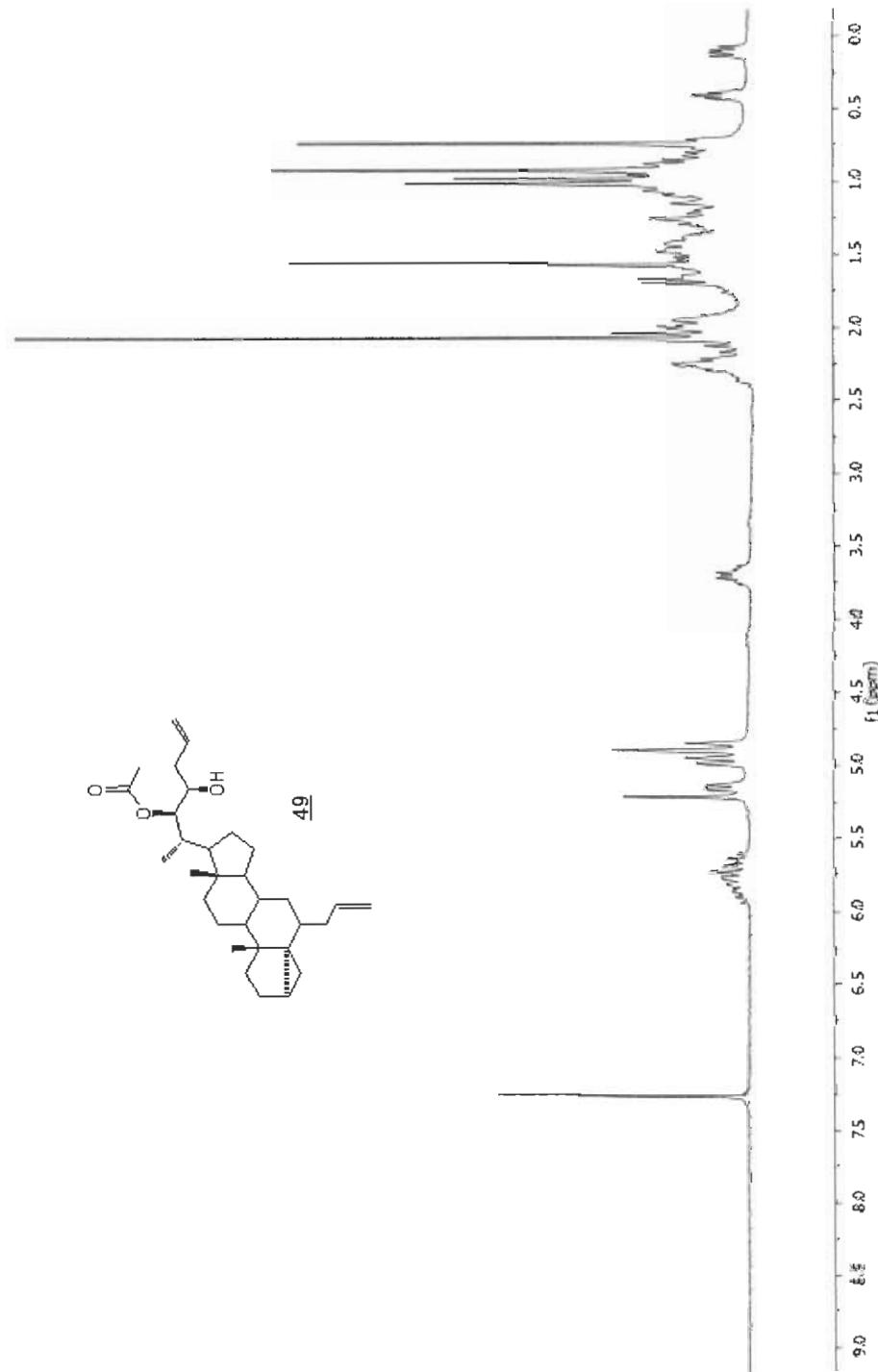
Spectre A.14 (20S, 22R)-22-acétoxy-6 $\beta$ -méthoxy-3 $\alpha$ ,5-cyclo-24-nor-5 $\alpha$ -cholan-23-al (**38**)

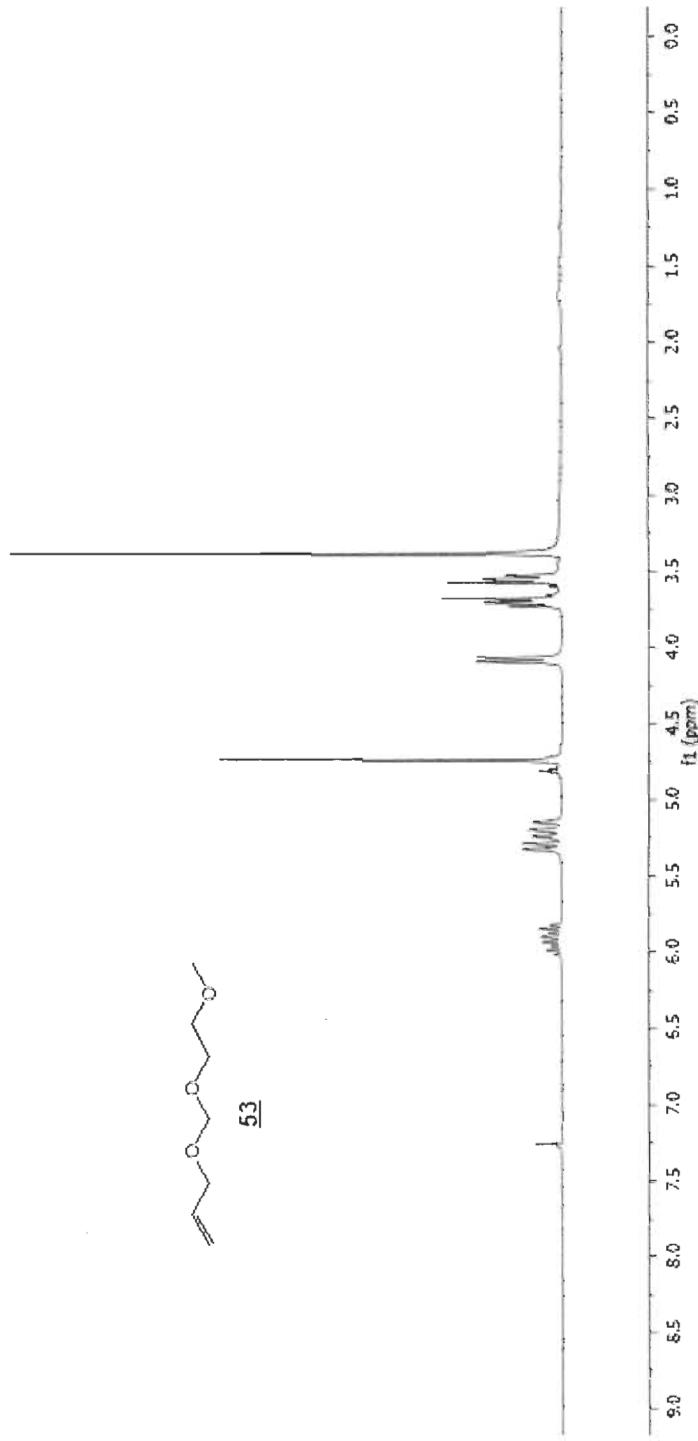


Spectre A.15 (20S, 22R)-22-acétoxy-6 $\beta$ -méthoxy-3 $\alpha$ , 5-cyclo-24-nor-5 $\alpha$ -cholan-23-ol (**47**)



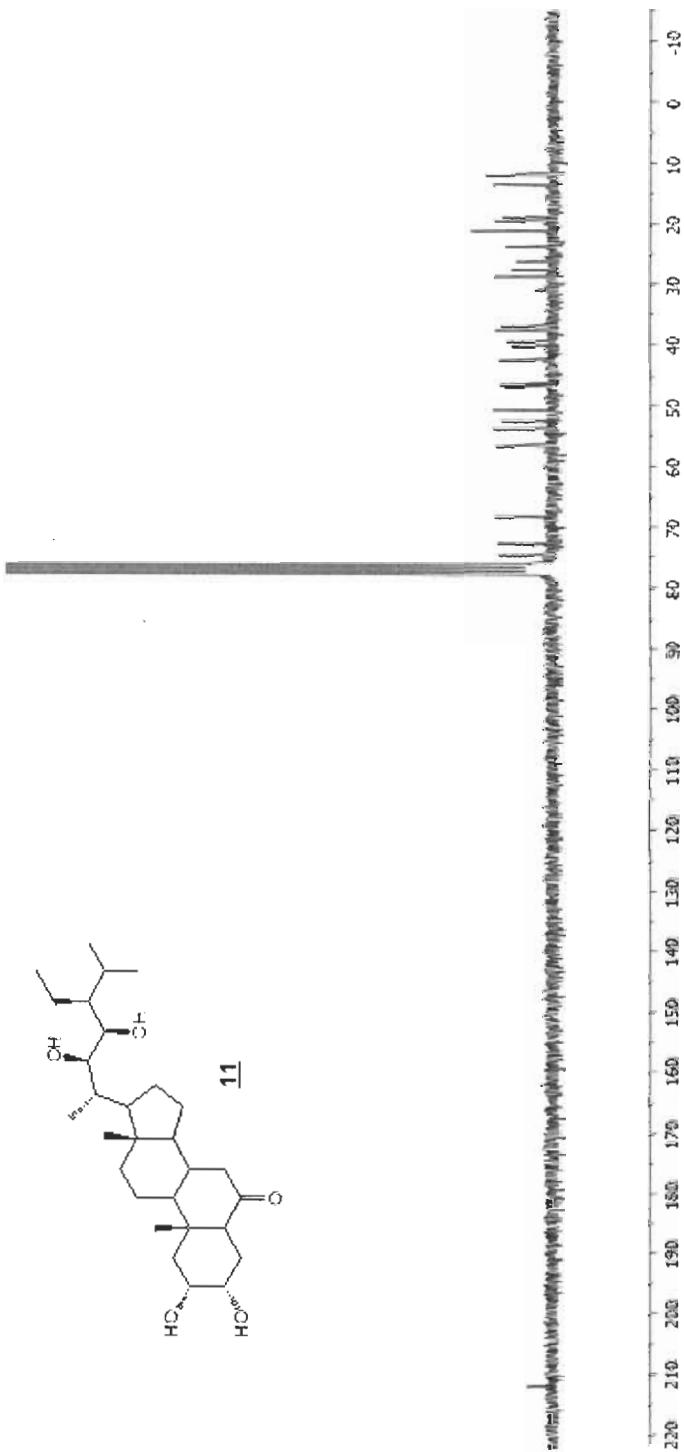
### Spectre A.16 Diadduit 49

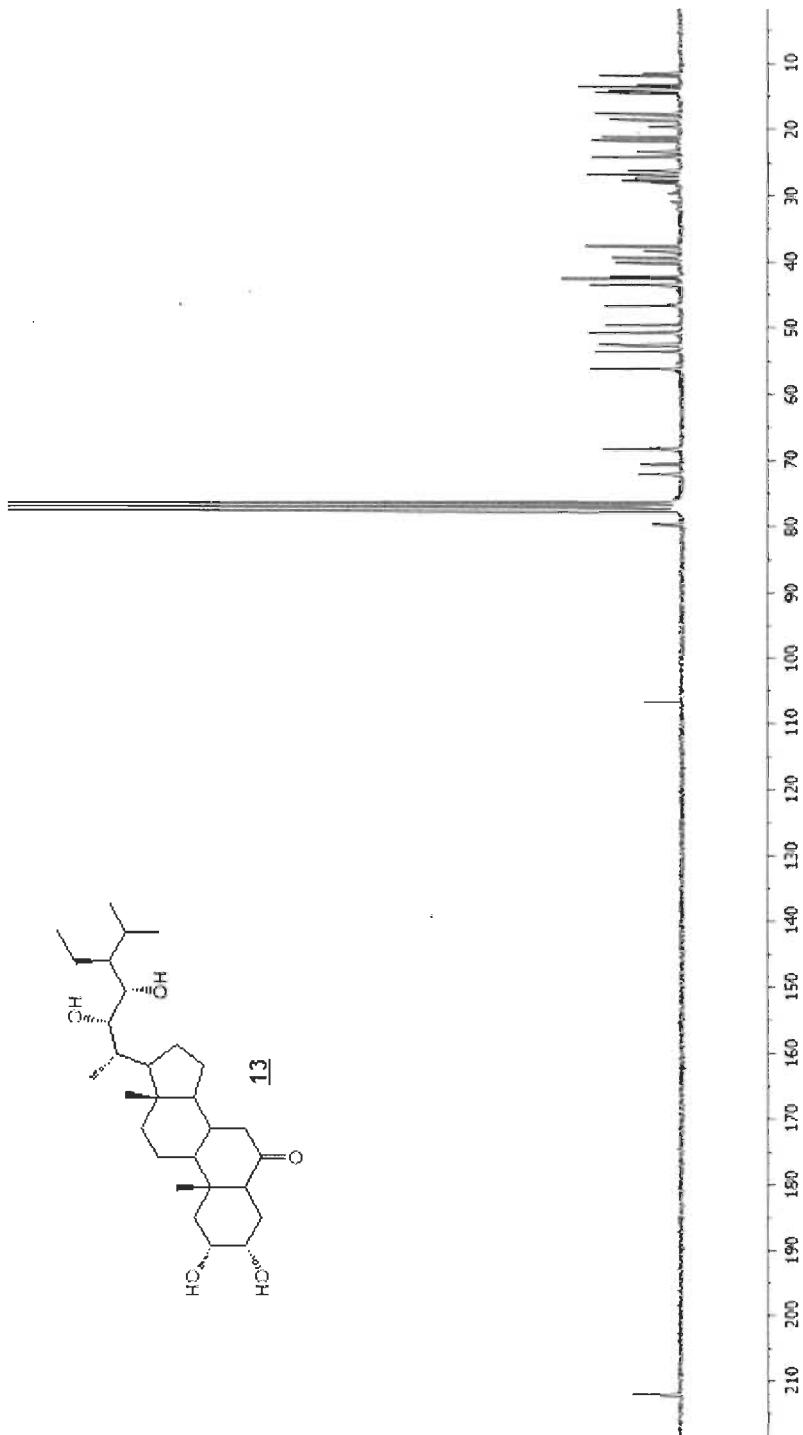


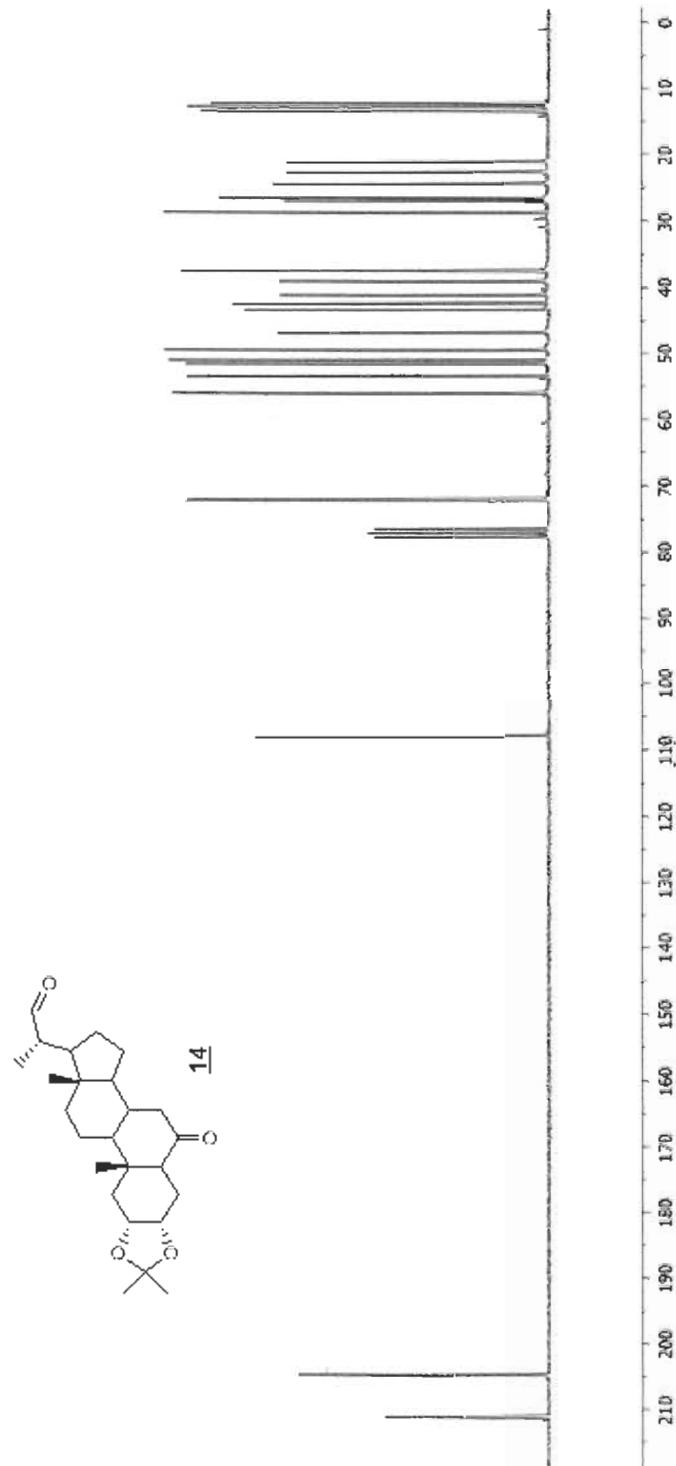
Spectre A.17 3-(2-méthoxy-éthoxyméthoxy)-propène (53)

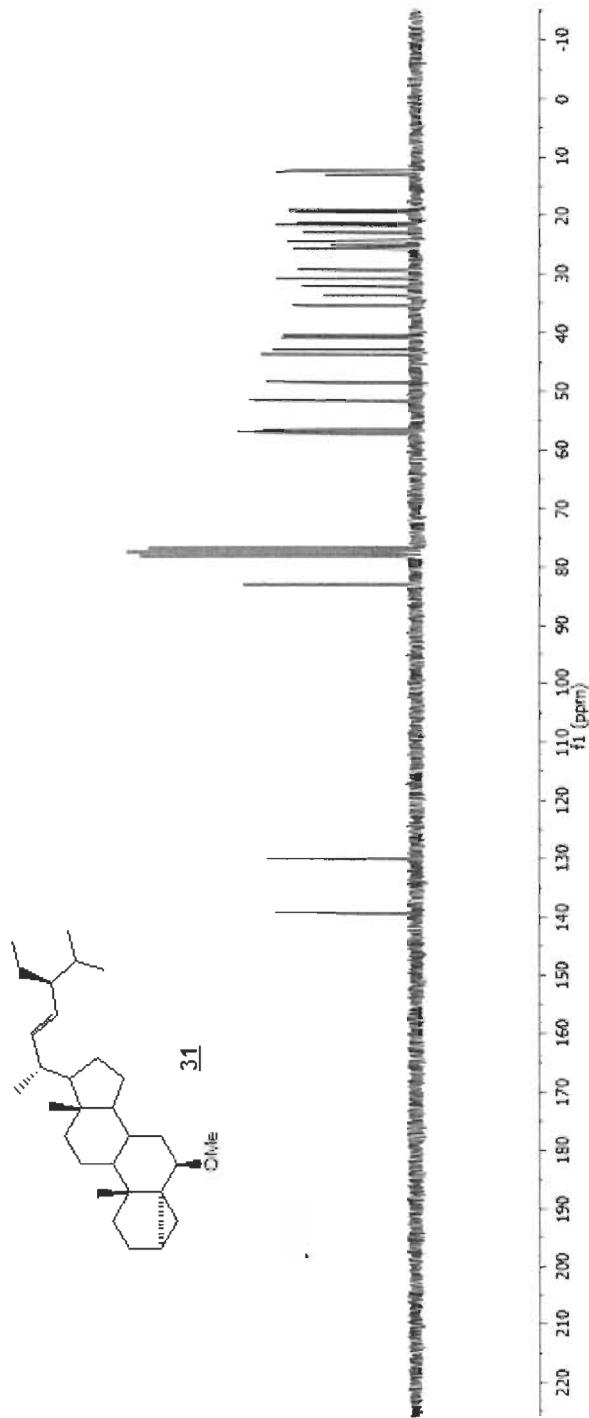
ANNEXE B

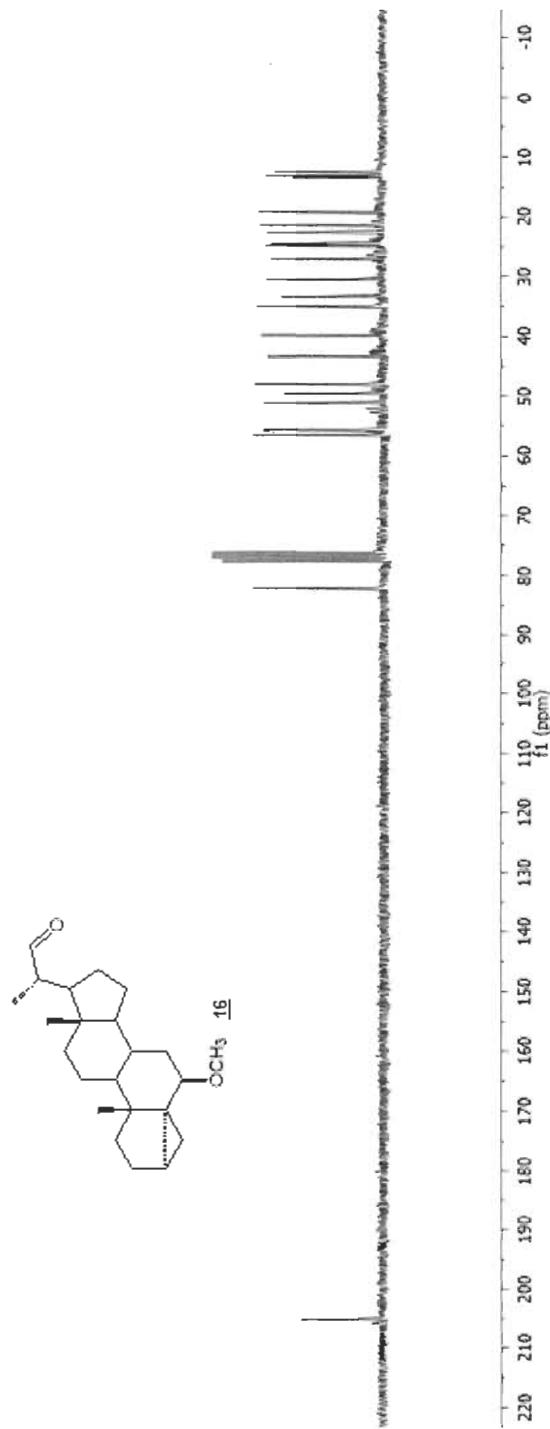
SPECTRES RMN  $^{13}\text{C}$

Spectre B.1 22R, 23R-homocastastérone (**11**)

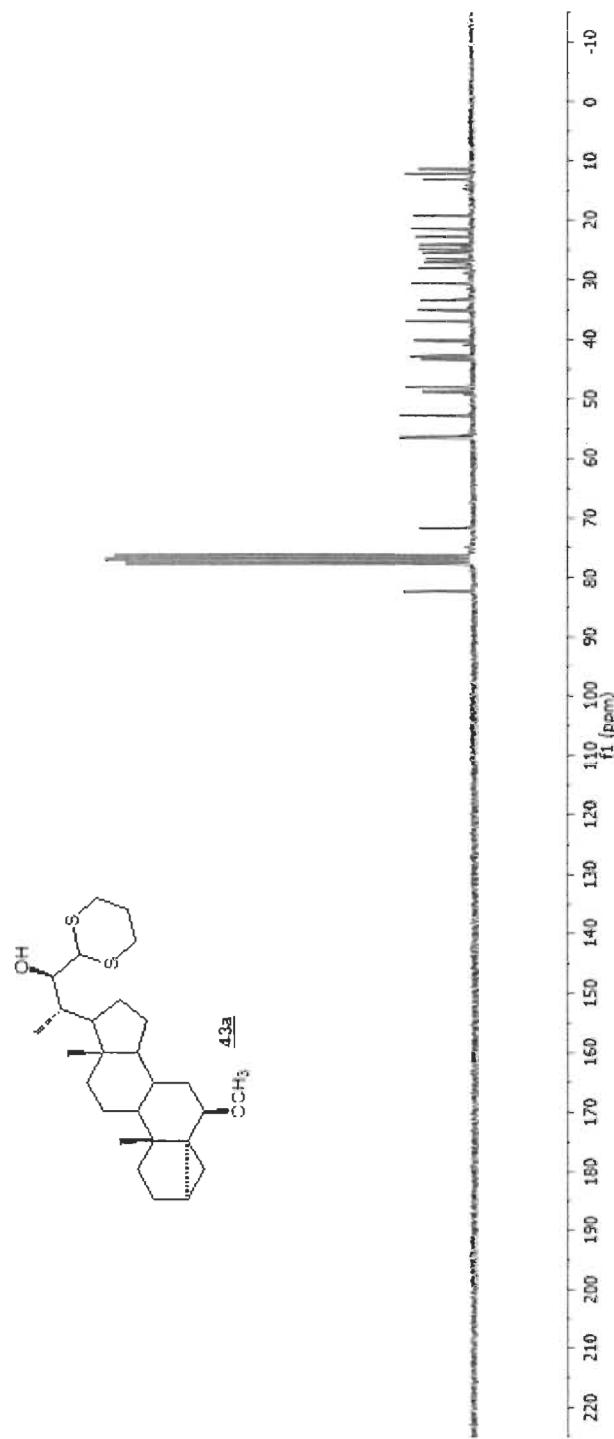
Spectre B.2 22S, 22S-homocastastérone (**13**)

Spectre B.3 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -dihydroxy-6-oxo-5 $\alpha$ -stigmastan-22-al 2,3-acétonide (**14**)

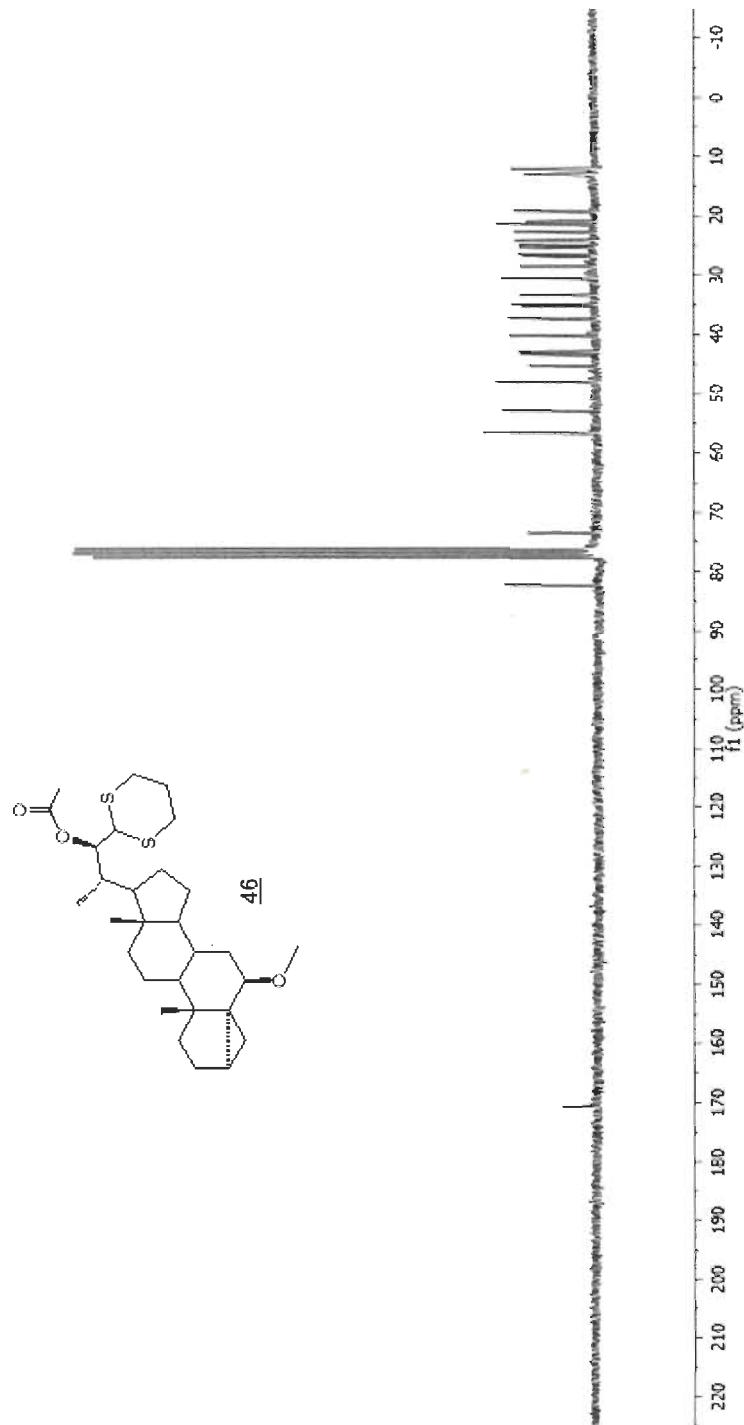
Spectre B.4 i-stigmasteryl méthyl éther (**31**)

Spectre B.5 (20S)-3 $\alpha$ -5-cyclo-6 $\beta$ -méthoxy-5 $\alpha$ -pregnane-20-carboxaldéhyde (16)

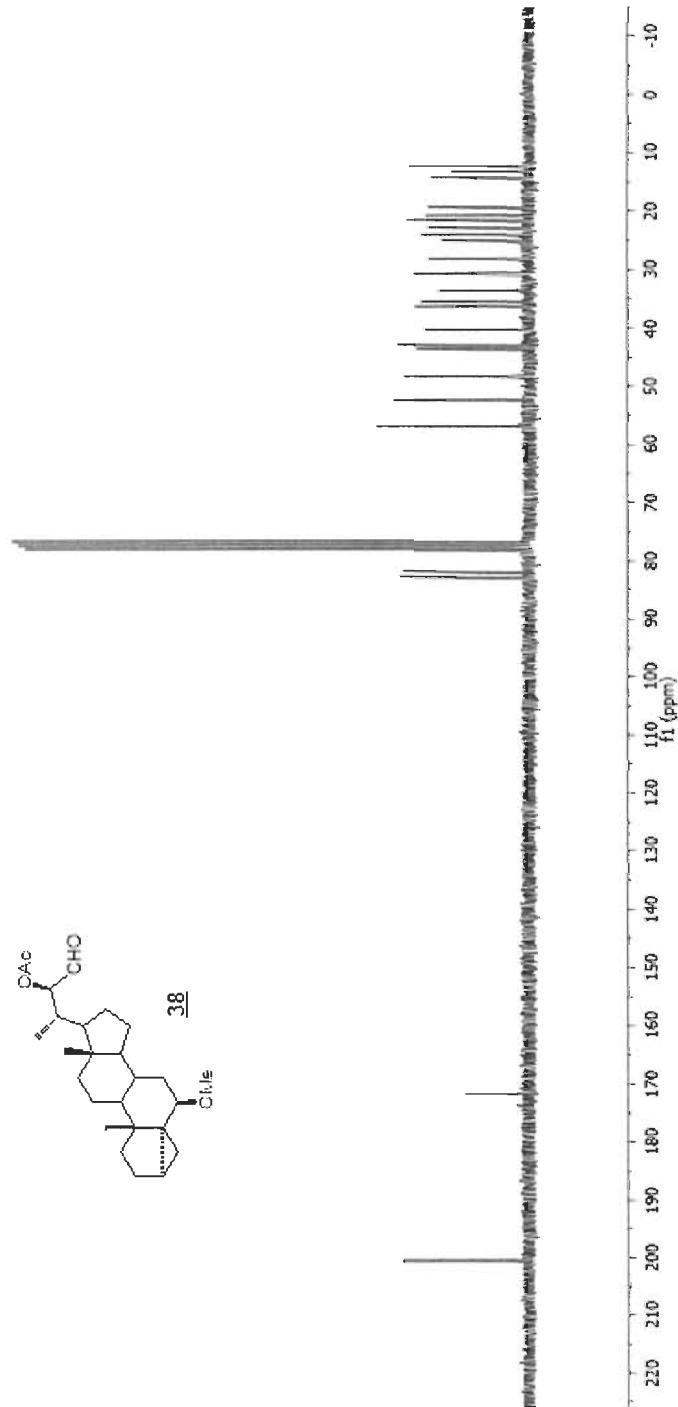
Spectre B.6 (20S, 22R)-22-hydroxy-6 $\beta$ -méthoxy-3 $\alpha$ ,5-cyclo-24-nor-5 $\alpha$ -cholan-23-al triméthylénedithioacétal (**43a**)



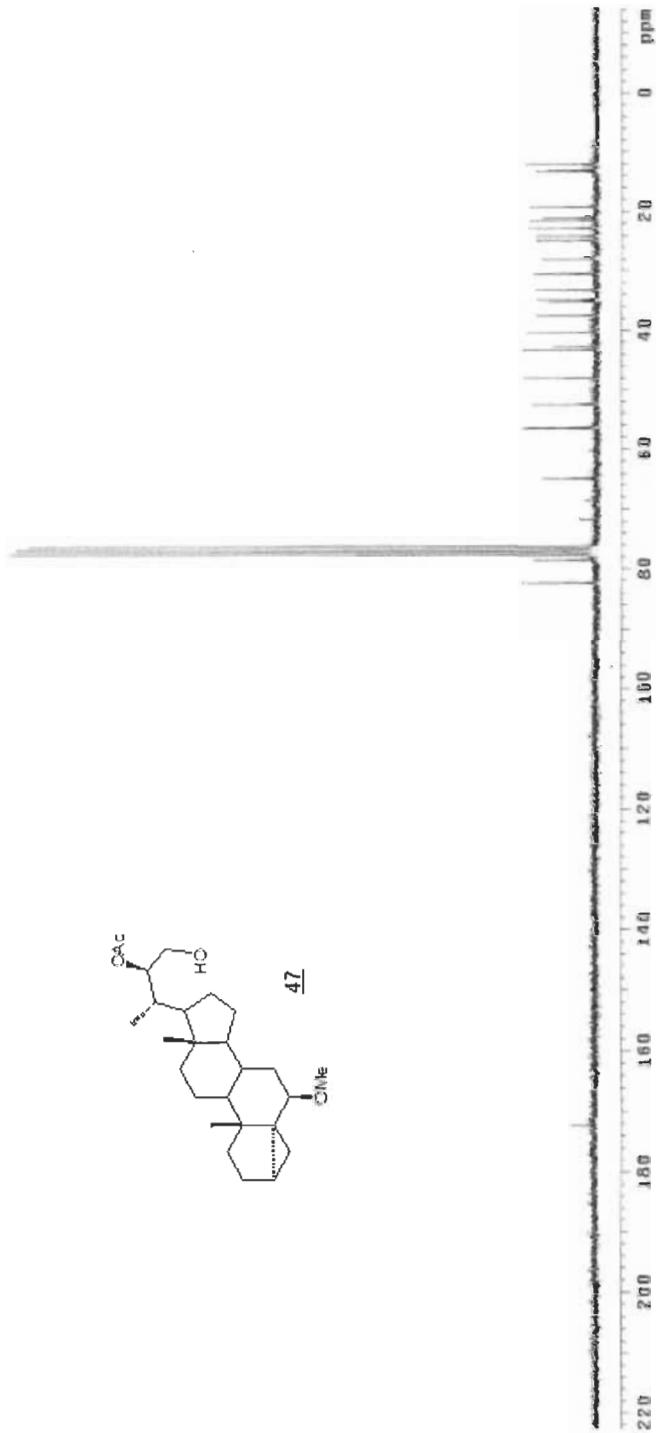
Spectre B.7 (20S, 22R)-22-acétoxy-6 $\beta$ -méthoxy-3 $\alpha$ ,5-cyclo-24-nor-5 $\alpha$ -cholan-23-al triméthylènedithioacétal (**46**)

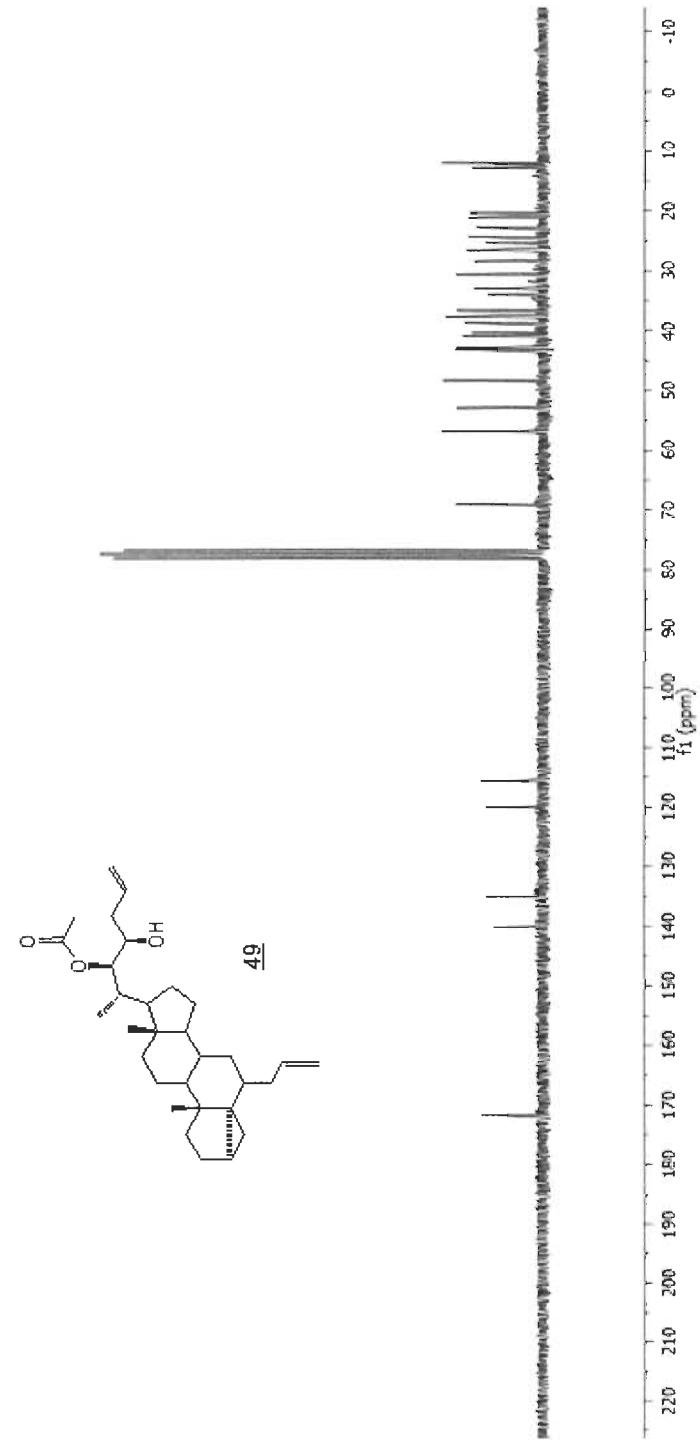


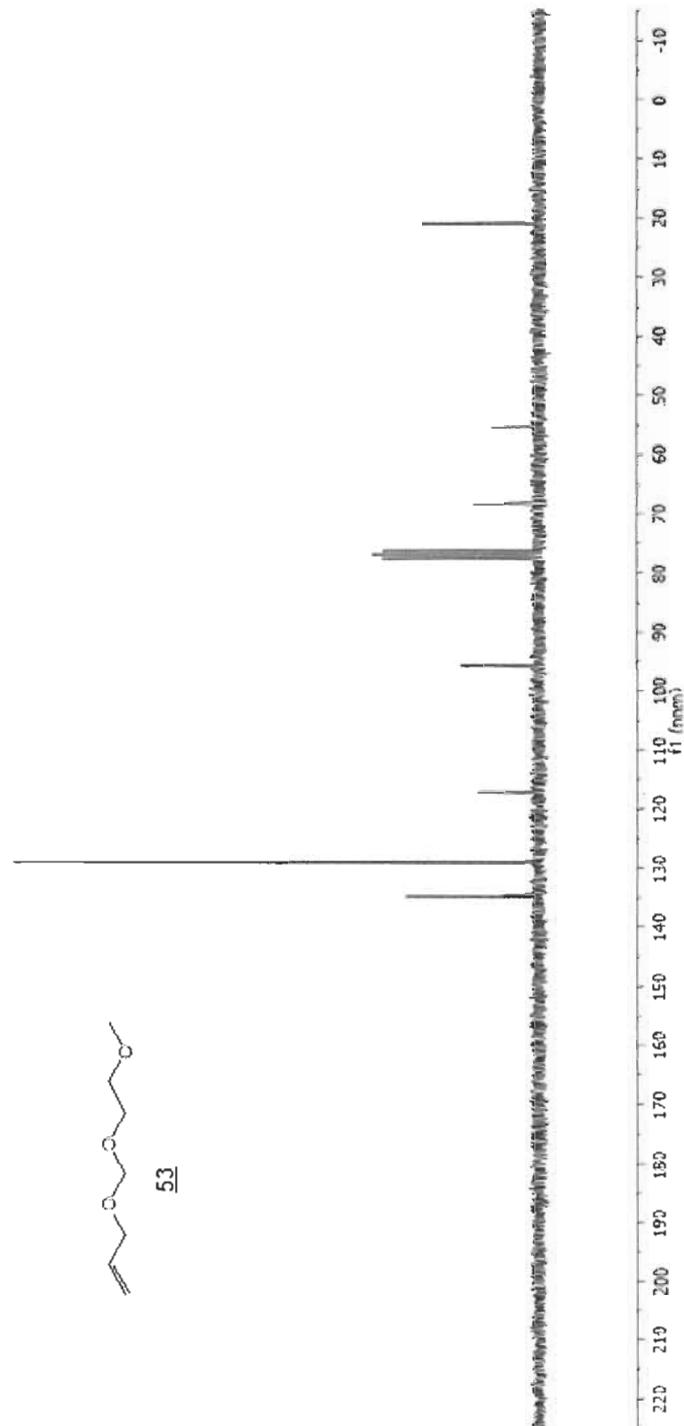
Spectre B.8 (20S, 22R)-22-acétoxy-6 $\beta$ -méthoxy-3 $\alpha$ ,5-cyclo-24-nor-5 $\alpha$ -cholan-23-al  
**(38)**



Spectre B.9 (20S, 22R)-22-acétoxy-6 $\beta$ -méthoxy-3 $\alpha$ , 5-cyclo-24-nor-5 $\alpha$ -cholan-23-ol (**47**)



Spectre B.10 Diadduit 49.

Spectre B.11 3-(2-méthoxy-éthoxyméthoxy)-propène (53)

## RÉFÉRENCES

1. Lees, A.J.; «Unresolved Issues Relating to the Shaking Palsy on the Celebration of James Parkinson's 250<sup>th</sup> Birthday», *Movement Disorders* 2007, 22, p. S327-S334.
2. Dauer, W.; Przedborski, S.; «Parkinson's Disease: Mechanisms and Models», *Neuron*, 2003, 39, p. 889-909.
3. Fahn, S.; «The History of Dopamine and Levodopa in the Treatment of Parkinson's Disease», *Movement Disorders* 2008, 23, p. S497-S508.
4. Site web de la Société Parkinson Québec  
<http://www.parkinsonquebec.ca/fr/frhome.htm>
5. Bové, J.; Prou, D.; Perier, C.; Przedborski, S.; «Toxin-Induced Models of Parkinson's Diseases», *NeuroRx*, 2005, 2, p. 484-494.
6. Sayre, L.; Perry, G.; Smith, M.A.; «Oxidative Stress and Neurotoxicity», *Chem. Res. Toxicol.*, 2008, 21, p. 172-188.
7. Sayre, L.; Smith, M.A.; Perry, G.; «Chemistry and Biochemistry of Oxidative Stress in Neurodegenerative Disease», *Curr. Med. Chem.*, 2001, 8, p. 721-738.
8. Gilgun-Sherki, Y.; Melamed, E.; Offen, D.; «Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier», *Neuropharmacology*, 2001, 40, p. 959-975.
9. Singh, R. P.; Sharad, S.; Kapur, S.; «Free Radicals and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: Relevance of Dietary Antioxidants», *J. Indian Academy of Clinical Medicine*, 2004, 5, p. 218-225.
10. Zhao, B. «Natural Antioxidants for Neurodegenerative Diseases», *Mol. Neurobiology*, 2005, 31, p. 283-293.

11. Garcia-Segura, L.M., Azcoitia I.; DonCarlos, L.L.; «Neuroprotection by estradiol», *Progress. Neurobiol.*, 2001, 63, p. 29-60.
12. Behl, C.; «Oestrogen as a neuroprotective hormone», *Nat. Rev. Neurosci.*, 2002, 3, p. 433-442.
13. Nunez, M.; Mazzafera, P.; Mazorra, L.M.; Siqueira, W.J.; Zullo, M.A.T.; «Influence of brassinosteroid analogue on antioxidant enzymes in rice grown in culture medium with NaCl», *Biologia Plantarum*, 2003, 47, p. 67-70.
14. Marcelo, M.; Pedro, C.; «Broad Bean (*Vicia Faba*) — A Natural Source of L-Dopa—Prolongs “On” Periods in Patients With Parkinson’s Who Have “On-Off” Fluctuations», *Movement Disorders*, 2000, 15, p. 164-166.
15. Khrapach, V.; Zhabinskii, V.; De Groot, A.; «Twenty Years of Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones Warrant Better Crops for the XXI Century», *Annals of Botany*, 2000, 86, p. 441-447.
16. Mitchell, J.W.; Mandava, N.; Worley, J.F.; Plimmer, J.R.; Smith, M.V.; «Brassins—a new family of plant hormones from rape pollen», *Nature*, 1970, 225, p. 1065-1066.
17. Grove, M.D.; Spencer, G.F.; Rohwedder, W.K.; Mandava, N.; Worley, J.F.; Warthen, J.D.; Steffens, G.L.; Flippen-Anderson, J.L.; Cook, J.C., Jr; «Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen», *Nature*, 1979, 281, p. 216-217.
18. Khrapach, V.A.; Zhabinskii, V.N.; de Groot, A.E.; «Brassinosteroids: a new class of plant hormones», Éditions Academic press, 1999, p. 7-25.
19. Yokata, T.; Arima, M.; Takahashi, N.; «Castasterone, a new phytosterol with plant-hormone potency, from chestnut insect gall», *Tetrahedron Lett.*, 1982, 23, p. 1127-1278.
20. Bajguz, A.; Tretyn, A.; «The chemical characteristic and distribution of brassinosteroids in plants», *Phytochem.*, 2003, 62, p. 1027-1046.
21. Bajguz, A.; «Metabolism of brassinosteroids in plants», *Plant Physiology and Biochemistry*, 2007, 45, p. 95-107.

22. Yokota, T.; Ogino, Y.; Takahashi, N.; Saimoto, H.; Fujioka, S.; Sakurai, A.; «Brassinolide is biosynthesized from castasterone in *Catharanthus roseus* crown gall cells», *Agric. Biol. Chem.*, 1990, 54, p. 1107-1108.
23. Kim, S-K.; «Natural occurrences of brassinosteroids », *Brassinosteroids: Chemistry, Bioactivity and Applications*, ACS symposium series 474, Am. Chem. Soc. Washington, DC, 1991, p. 26-35.
24. Bajguz, A.; Czerpak, R.; «Physiological and biochemical role of brassinosteroids and their structure-activity relationship in the green alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Chlorophyceae)», *J. Plant Growth Regul.*, 1998, 17, p. 131-139.
25. Braun, P.; Wild, A.; «The influence of brassinosteroid on growth and parameters of photosynthesis of wheat and mustard plants», *J. Plant Physiol.*, 1984, 116, p. 189-196.
26. Wu, Y.D.; Lou, Y.J.; «Brassinolide, a plant sterol from pollen of *Brassica napus* L., induces apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells», *Pharmazie*, 2007, 62, p. 392-395.
27. Malikova, J.; Swaczynova, J.; Kolar, Z.; Stnard, M.; «Anticancer and antiproliferative activity of natural brassinosteroids», *Phytochem.*, 69, p. 418-426.
28. Hamdy, A.H.; Aboutabl, E.A.; Sameer, S.; Hussein, A.A.; Diaz-Marrero, A.R.; Darias, J.; Cueto, M.; «3-Keto-22-epi-28-nor-cathasterone, a brassinosteroid-related metabolite from *Cystoseira myrica*», *Steroids*, 2009, 74, p. 927-930.
29. Ramirez, J.A.; Teme Centurion, O.M.; Gros, E.G.; Galagovsky, L.R.; «Synthesis and bioactivity evaluation of brassinosteroid analogs», *Steroids*, 2000, 65, p. 329-337.
30. Michelini, F.M.; Ramirez, J.A.; Berra, A.; Galagovsky, L.R.; Alché, L.E.; «In vitro and in vivo antiherpetic activity of three new synthetic brassinosteroid analogues», *Steroids*, 2004, 69, p. 713-720.
31. Sayre, L.M.; Smith, M.A.; Perry, G.; «Chemistry and Biochemistry of Oxidative Stress in Neurodegenerative Disease», *Curr. Med. Chem.*, 2001, 8, p. 721-738.

32. Carange, J.; Longpré, F.; Daoust, B.; Martinoli, M-G, «24-Epibrassinolide, a phytosterol from the brassinosteroid family, protects dopaminergic cells against MPP+-induced oxidative stress and apoptosis», *J. Toxicology*, 2011, Article ID 392859, 13 pages doi:10.1155/2011/392859.
33. Ismaili, J.; Boisvert, M.; Longpré, F.; Le Gall, C.; Martinoli, M-G.; Daoust, B.; «Brassinosteroids and analogs as neuroprotectors : Synthesis and structure-activity relationships», *Steroids*, 2012, 71, p. 91-99.
34. Dinan, L.; Harmatha, J.; Lafont, R.; «Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids», *J. Chromatography A.*, 2001, 935, p. 105-123.
35. Boisvert, M.; «Synthèse de brassinostéroïdes et étude de leur effet neuroprotecteur», Mémoire UQAM, 2009.
36. Noe, M.C.; Letavec, M.A.; Snow, S.L.; «Asymmetric Dihydroxylation of Alkenes», *Organic Reactions*, 2005, 66, p106-213.
37. McMorris, T.C.; Chavez, R.G.; Patil, A.P.; «Improved synthesis of brassinolide», *J. Chem. Soc, Perkin Trans. I*, 1996, 3, p. 295-301.
38. Sharpless, K.B.; Amberg, W.; Bennani, Y.L.; Crispino, G.A.; Hartung, J.; Jeong, K-S.; Kwong, H-L.; Morikawa, K.; Wang, Z-M.; Xu, D.; Zhang, X-L.; «Osmium Catalyzed Asymmetric Dihydroxylation : A New Ligand Class and a Process», *J. Org. Chem.*, 1992, 57, p. 2768-2771.
39. Organic Chemistry Web Partial: The Sharpless Dihydroxylation, <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/sharpless-dihydroxylation.shtml>
40. Silvestein R.M; Webster, M.; Kiemle, F.X.; «Identification spectrométrique de composés organiques», Traduction de la 1<sup>e</sup> édition Américaine, Éditions De Boeck Université, Bruxelles, 2007.
41. Winstein, S.; Adams, R.; «Role of neighboring groups in replacement reactions. XIV. The 5,6-double bond in cholesteryl p-toluenesulfonate as a neighboring group», *J. Am. Chem. Soc*, 1948, 70, p. 838-840.
42. Miller, B.; «Advanced Organic Chemistry», Chapitre 7, seconde édition, Pearson Education Edition, New Jersey, 2003.

43. McMorris, T.C.; Patil, A.P.; Chavez, R.G.; Baker, M.E.; Clouse, S.D.; «Synthesis and Biological Activity of 28-Homobrassinolide and Analogues», *Phytochem.*, 1994, 36, p. 585-589.
44. Steele, J.A.; Mosettig, E.; «The Solvolysis of Stigmasteryl Tosylate», *J. Org. Chem.*, 1963, 28, p. 571-572.
45. Takatsuto, S.; Ikekawa, N.; «Stereoselective Synthesis of the Plant-growth-promoting Steroids Dolicholide and Dolichosterone», *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1983, p. 2133-2137.
46. Hazra, B.G.; Joshi, P.L.; Argade, N.P.; Pore, V.S.; Chordia, M.D.; «Stereoselective synthesis of (22R, 23R, 24S)-3 $\beta$ -hydroxy-5-ene-22,23-dihydroxy-24-methyl-cholestane : A brassinolide intermediate from 16-dehydro-pregnenolone acetate», *Tetrahedron*, 1994, 50, p. 2523-2532.
47. Raghavan, S.; Krishnaian, V.; «A short stereoselective synthesis of (+)-boronolide», *Tetrahedron Lett.*, 2006, 47, p. 7611-7614.
48. Karplus, M.; «Vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance», *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, 85, p. 2870-2871.
49. Mikami, K.; Kawamoto, K.; Loh, T-P.; Nakai, T.; «Anomalous *threo*-diastereoselectivity in allylic silane- or stannane-aldehyde condensation reactions: new interpretation of the antiperiplanar vs. synclinal problem on the transition-state conformations», *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1990, p. 1161-1163.
50. Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S.; Wothers, P.; «Organic Chemistry», 1st Edition, Oxford University Press, 2000.
51. Wu, J.; «Studies of  $\alpha$ -silyl radical cyclizations and their applications to the synthesis of Brassinolide», Thèse University of Michigan, 1996.
52. Reetz, T.M.; «Chelation or Non-Chelation Control in Addition Reactions of Chiral  $\alpha$ - and  $\beta$ - Alkoxy Carbonyl Compounds [New Synthetic Methods (44)]», *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1984, 23, p. 556-569.
53. Breit, B.; «1,3-Asymmetric induction in stereoselective rhodium-catalyzed hydroformylation of homomethallylic alcohols», *Eur. J. Org. Chem.*, 1998, p. 1123-1134.

54. Rabasso, N.; «Chimie Organique : Hétéroéléments, Stratégies de Synthèse et Chimie Organométallique», Éditions De Boeck Université, Bruxelles, 2006, 426 pages.
55. Roush, W.R.; «Allyl Organometallics », *Comprehensive Organic Synthesis*, 1991, 2, p. 1-53.
56. Brown, H.C.; Jadhav, P.K.; Bhat, K.S.; «Chiral synthesis via organoboranes. 13. A highly diastereoselective and enantioselective addition of [(Z)- $\gamma$ -alkoxyallyl]diisopinocampheylboranes to aldehydes», *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110, p. 1535-1538.
57. Roush, W.R.; Walts, A.E.; Hoong, L.K.; «Diastereo- and enantioselective aldehyde addition reactions of 2-allyl-1,3,2-dioxaborolane-4,5-dicarboxylic esters, a useful class of tartrate ester modified allylboronates», *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, 107, p. 8186-8190.
58. Felpin, F-X.; Bertrand, M-J.; Lebreton, J.; «Enantioselective reduction of heteroaromatic  $\beta,\gamma$ -unsaturated ketones as an alternative to allylboration of aldehydes. Application: asymmetric synthesis of SIB-1508Y», *Tetrahedron*, 2002, 58, p. 7381-7389.
59. Brown, H.C.; Jadhav, P.K.; «B-Allyldiisocaranylborane: a new, remarkable enantioselective allylboration agent for prochiral aldehydes. Synthesis of homoallylic alcohols approaching 100% enantiomeric purities», *J. Org. Chem.*, 1984, 49, p. 4089-4091.
60. Chandra, J.S.; Venkat, M.; Reddy, R.; «Stereoselective allylboration using (B)- $\gamma$ -alkoxyallyl diisopinocampheylboranes: highly selective reactions for organic synthesis», *Arkivoc*, 2007, ii, p. 121-144.
61. Brosa, C.; «Synthesis of new brassinosteroids with potential activity as antiecdysteroids», *Steroids*, 1994, 59, p. 463-467.
62. Harrowven, D.C.; Curran, D.P.; Kostiuk, S.L.; Wallis-Guy, I.L.; Whiting, S.; Stenning, K.J.; Tang, B.; Packard, E.; Nanson, L.; «Potassium carbonate-silica: a highly effective stationary phase for the chromatographic removal of organotin impurities», *Chem. Commun.*, 2010, 46, p. 6335-6337.