

Université de Montréal

Design et synthèse d'antibiotiques aminoglycosidiques

par
Janek Szychowski
Département de chimie
Faculté des arts et des sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D.)
en chimie

Mai, 2007

©Janek Szychowski, 2007



QD
3
U54
2008
V. 010

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Design et synthèse d'antibiotiques aminoglycosidiques

présentée par
Janek Szychowski

est présentée à un jury composé des personnes suivantes:

Prof. James D. Wuest
Président-rapporteur

Prof. Stephen Hanessian
Directeur de recherche

Prof. Yvan Guindon
Membre du jury

Prof. Karine Auclair
Examinatrice externe

Prof. James D. Wuest
Représentant du doyen de la FES

Résumé

En 1944, la recherche intensive de composés antibiotiques a mené à l'isolation d'un premier antibiotique aminoglycosidique: la streptomycine. De nombreux aminoglycosides ont ensuite été découverts, interférant avec le processus vital qu'est la biosynthèse protéique en se liant au site-A du ribosome procaryote. Toutefois, leur utilisation routinière en milieu clinique a favorisé l'apparition de souches bactériennes résistantes. Avec le temps, l'apparition de ces souches exprimant différentes enzymes qui désactivent les aminoglycosides est devenue la principale limitation à l'utilisation des ces puissants antibiotiques. Nos efforts pour trouver une modification structurelle des aminoglycosides qui permettrait de restaurer l'activité antibiotique contre les souches résistantes sont décrits.

La superposition des cycles I et II de la tobramycine à ceux de la paromomycine, à partir de leur structure rayon X respectives lorsqu'elles sont liées au site-A a mené au design d'aminoglycosides hybrides qui seraient préparés en fonctionnalisant les groupements O6 et O2'' de la paromomycine afin d'atteindre l'espace normalement occupé par le cycle III de la tobramycine. Les analogues de la paromomycine fonctionnalisés à la position O2'' par une réaction d'allylation hautement régiosélective ont démontré de bonnes activités antibactériennes. Les structures rayon X obtenues pour certains de ces analogues liés à un modèle du site-A ont révélé un nouveau mode de liaison que nous avons exploré et qui nous a mené à la préparation d'aminoglycosides semi-synthétiques dotés d'activités antibactériennes égales à, sinon meilleures que, celles de la paromomycine. L'efficacité *in vivo* pour deux de ces analogues a été démontrée par leur habilité à protéger des souris infectées par *S. aureus*.

Puisqu'il a été déterminé que la face de l'antibiotique qui interagit avec le site-A n'est pas la même que celle qui interagit avec l'APH(3')-IIIa, une enzyme qui procure la résistance bactérienne, nous avons tenté d'empêcher la désactivation de l'aminoglycoside par l'APH(3')-IIIa en bloquant la face de la paromomycine qui interagit avec l'enzyme. En observant la topologie de la paromomycine dans sa

conformation bioactive, l'orientation spatiale des fonctions 6-OH et 6'''-NH₂ a été considérée afin de les relier en utilisant la réaction de fermeture de cycle par métathèse. Les aminoglycosides macrocycliques obtenus n'ont pas démontré d'activités antibactériennes appréciables et sont des substrats de l'APH(3')-IIIa. Toutefois, ces études ont démontré le potentiel de la réaction de fermeture de cycle par métathèse dans le domaine des aminoglycosides pour la première fois.

L'impact de la fonctionnalisation de la paromomycine à la positions O6, O3', O2'', O5'' ou N6''' sur l'affinité pour l'APH(3')-IIIa a été évalué. À notre grande satisfaction, les analogues de la paromomycine fonctionnalisés à la position O2'' ou O5'' ont démontré une importante baisse d'affinité pour l'APH(3')-IIIa, et se sont même avérés en mesure de l'inhiber. Ces antibiotiques seraient donc actifs contre des souches de bactéries qui sont résistantes en exprimant l'APH(3')-IIIa et pourraient même protéger les autres aminoglycosides contre l'effet néfaste de cette enzyme d'importance clinique.

Le développement d'une voie synthétique permettant de fonctionnaliser la sisomicine à la position C6' et/ou N6' a été réalisé. L'azoturation de l'amine allylique de la sisomicine puis un traitement avec le dioxyde de sélénium a permis la transformation d'un amine allylique en aldéhyde α,β -insaturé en deux étapes. Les activités antibactériennes des analogues de la sisomicine fonctionnalisés à la position C6' ou N6' ont démontré que la fonctionnalisation de la position C6' de la sisomicine s'avère une option prometteuse pour combattre la résistance provoquée par les AAC(6'), une famille d'enzymes qui désactivent les aminoglycosides en acétylant la fonction 6'-NH₂. Les verdamicines C2 et C2a ont été préparées individuellement ce qui permettra d'évaluer leur propriétés biologiques respective.

Mots clés

aminoglycoside, paromomycine, phosphotransférase, APH, macrocycle, sisomicine, verdamicine, oxydation allylique.

Summary

In 1944, the intensive search for antibiotics agents led to the discovery of a first aminoglycoside antibiotic: streptomycin. Many aminoglycosides that interfere with the vital process of protein biosynthesis by their binding to the A-site of prokaryotic ribosome were discovered afterward but their frequent use in clinical environment led to the emergence of resistant strains of bacteria. With time, resistant strains expressing various aminoglycoside deactivating enzymes became the major limitation for the use of these powerful antibiotics. Our efforts to find a structural modification of aminoglycoside antibiotics to restore their antibiotic activity against resistant strains are described.

The superposition of rings I and II of tobramycin to those of paromomycin, from their respective X-ray structures when they are bound to an A-site model of the 30S ribosomal subunit, led to the design of hybrid aminoglycosides that can be prepared by the functionalization of O6 or O2'' position of paromomycin in order to reach the space normally occupied by the ring III of tobramycin. The paromomycin analogues functionalized at the O2'' position by a highly regioselective allylation reaction showed good antimicrobial activities. The X-ray structures obtained for few of these analogues bound to the A-site model revealed a new mode of binding that we exploited further. This led to the preparation of semi-synthetic aminoglycosides with *in vitro* activities equal to, or better than, paromomycin. The *in vivo* efficiency for two of these analogues was demonstrated by their ability to protect mice infected with *S. aureus*.

Previous studies showed that the antibiotic face that interacts with the A-site is different from the one that interacts with APH(3')-IIIa, an enzyme that is responsible for bacterial resistance, we therefore tried to evade aminoglycoside deactivation by APH(3')-IIIa by blocking the face of paromomycin that normally interacts with the enzyme. Considering the spatial orientation of the 6-OH and 6'''-NH₂ groups in the bioactive conformation of paromomycin we connected them by a ring closing metathesis reaction. The obtained macrocyclic aminoglycosides did not show appreciable

antimicrobial activity and were found to be substrates for APH(3')-IIIa. Nevertheless, these studies demonstrated the potential of the ring closing metathesis reaction in the field of aminoglycosides for the first time.

The impact of the functionalization of O6, O3', O2'', O5'' or N6''' position in paromomycin on the APH(3')-IIIa affinity was studied. To our satisfaction, the new paromomycin analogues functionalized at position O2'' or O5'' showed an important decrease in APH(3')-IIIa affinity, and, in addition, they were found to inhibit the enzymatic activity. These analogues would be active against bacteria strains that are resistant by the expression of APH(3')-IIIa. Moreover, they could protect others aminoglycosides normally susceptible to APH(3')-IIIa, from the detrimental effect of this clinically relevant enzyme.

The development of a synthetic scheme to allow the functionalization in sisomicin position C6' and/or N6' was realized. The diazotransfer reaction with the C6' allylic amine to the corresponding azide, followed by oxidation with selenium dioxide allowed the conversion of an allylic amine into an α,β -unsaturated aldehyde in two steps. The antimicrobial activities of the prepared sisomicin analogues functionalized at C6' or N6' position showed that the C6' functionalization is a promising option to reduce the resistance induced by the AAC(6') family of deactivating enzymes that acetylates the 6'-NH₂ group of aminoglycosides. Verdamicin C2 and C2a were individually prepared to allow their respective biological properties.

Key words

aminoglycoside, paromomycin, phosphotransferase, APH, macrocycle, sisomicin, verdamicin, allylic oxidation.

Table des matières

Résumé.....	iii
Summary.....	v
Liste des Figures.....	xxx
Liste des Schémas.....	xxxiv
Liste des Tableaux.....	xxxvi
Liste des abréviations.....	xxxvii
Remerciements.....	xl

Chapitre 1

Introduction aux antibiotiques aminoglycosidiques.....	1
1.1. Historique, structure et classification des aminoglycosides.....	2
1.2. Utilisation des aminoglycosides.....	7
1.3. Antibiotiques aminoglycosidiques semi-synthétiques (1970-1980).....	8
1.4. Mode d'action antibiotique.....	10
1.4.1. Effet sur la traduction de l'ARNm.....	10
1.4.2. Liaison avec le site-A du ribosome procaryote.....	17
1.5. Toxicité et résistance bactérienne des aminoglycosides.....	20
1.5.1. Toxicité des aminoglycosides.....	20
1.5.2. Résistance bactérienne aux aminoglycosides.....	20
1.6. Résumé des objectifs des travaux décrits dans cette thèse.....	28
1.7. Références pour le Chapitre 1.....	30

Chapitre 2

Analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O6 ou O2''.....	43
2.1. Design d'analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O6 ou O2''.....	44
2.2. Exemples choisis dans la littérature décrivant des modifications sélectives d'aminoglycosides.....	49
2.3. Préparation d'analogues de la paromomycine fonctionnalisés à la position O6.....	59

2.4. Activités antibactériennes des analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O6.....	63
2.5. Préparation d'analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O2''.....	64
2.6. Exploration des limites d'un nouveau mode de liaison dans le site-A.	68
2.7. Activités antibactériennes des analogues de la paromomycine fonctionnalisée à position O2''.....	82
2.8. Conclusion pour le Chapitre 2.....	87
2.9. Références pour le Chapitre 2.	88

Chapitre 3

Aminoglycosides semi-synthétiques pour sonder l'enzyme désactivante APH(3')-IIIa..92

3.1. Mécanisme et structure rayon X de l'APH(3')-IIIa.	93
3.2. Design d'analogues macrocycliques de la paromomycine.	98
3.3. Exemples choisis dans la littérature décrivant la préparation d'aminoglycosides macrocycliques.	101
3.4. Préparation d'analogues macrocycliques de la paromomycine reliée aux positions N6''' et O6.	104
3.5. Phosphorylation d'analogues macrocycliques de la paromomycine reliée aux positions N6''' et O6.	108
3.6. Impact de la fonctionnalisation de la paromomycine sur la phosphorylation catalysée par l'APH(3')-IIIa.....	113
3.6.1. Effet de la fonctionnalisation de la position O6 de la paromomycine.....	114
3.6.2. Effet de la fonctionnalisation de la position N6''' de la paromomycine.....	115
3.6.3 Impact de la fonctionnalisation de la position O2'' de la paromomycine.....	117
3.7. Préparation d'analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O5'' ou O3' qui sont normalement ciblées par l'enzyme APH(3')-IIIa.....	118
3.7.1. Préparation d'analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O5''... ..	118
3.7.2. Préparation d'un analogue de la paromomycine méthylée à la position O3'.....	121

3.8. Impact de la fonctionnalisation de la paromomycine aux position O3' ou O5'', normalement ciblées par l'enzyme APH(3')-IIIa sur la phosphorylation catalysée par cette enzyme.	123
3.9. Activités antibactériennes des analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O3', O5'' ou N6'''.....	124
3.10. Conclusion pour le Chapitre 3.....	125
3.11. Références pour le Chapitre 3.	126

Chapitre 4

Inhibition de l'enzyme APH(3')-IIIa par des analogues de la paromomycine..... 132

4.1. Exemples choisis dans la littérature décrivant l'inhibition d'enzyme désactivantes d'aminoglycoside.	133
4.1.1. Inhibiteurs aminoglycosidiques (1979 et 1994-2006).....	134
4.1.2. Inhibiteurs non-aminoglycosidiques.	143
4.2. Inhibitions de l'APH(3')-IIIa par des analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O2''.....	147
4.2.1. Détermination des constantes d'inhibition et du type d'inhibition par rapport à l'amikacine.....	149
4.2.2. Détermination des IC50.....	153
4.2.3. Identification des meilleurs inhibiteurs.	155
4.2.4. Détermination du type d'inhibition par rapport à l'ATP.....	157
4.3. Inhibitions de l'APH(3')-IIIa par des analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O5''.....	161
4.4. Conclusion pour le Chapitre 4.....	162
4.5. Références pour le Chapitre 4.	164

Chapitre 5

Fonctionnalisation de la position N6' ou C6' de la sisomicine..... 168

5.1. Exemples choisis dans la littérature décrivant des modifications de la sisomicine. .	169
5.1.1. Fonctionnalisation de la position N1 de la sisomicine.	169

5.1.2. Fonctionnalisation de la position N6' de la sisomicine.	174
5.1.3. La verdamicine, un analogue de la sisomicine méthylée à la position C6'.	176
5.1.4. Effet de la présence d'un méthyle à la position C6' sur la néphrotoxicité des gentamicines.	178
5.2. Fonctionnalisation de la position C6' ou N6' de la sisomicine.	179
5.2.1. Fonctionnalisation de la position C6' de la sisomicine.	179
5.2.2. Diastéréosélectivité de la fonctionnalisation de la sisomicine à la position C6'.	182
5.2.3. Fonctionnalisation de la position N6' de la sisomicine.	186
5.3. Activités antibactériennes des analogues de la sisomicine fonctionnalisée à la position C6' ou N6'.	187
5.4. Conclusion pour le Chapitre 5.	188
5.5 Références pour le Chapitre 5.	189

Chapitre 6

Partie expérimentale.195

6.1 Notes générales	196
6.2 Procédures expérimentales pour le Chapitre 2.	199
4- <i>O</i> -[<i>{3-O-Benzoyl-4,6-O-benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy-α-D-glucopyranosyl}-5-O-<i>{3-O-(3,4-di-O-benzoyl-2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy-α-L-idopyranosyl)-2,5-di-O-benzoyl-β-D-ribofuranosyl}}</i>]-1,3-di-<i>N</i>-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.36).</i>	199
4- <i>O</i> -[<i>{3-O-Benzoyl-4,6-O-benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy-α-D-glucopyranosyl}-5-O-<i>{3-O-(3,4-di-O-benzoyl-2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy-α-L-idopyranosyl)-2,5-di-O-benzoyl-β-D-ribofuranosyl}}</i>]-6-<i>O</i>-allyl-1,3-di-<i>N</i>-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.37).</i>	200
4- <i>O</i> -[<i>{3-O-Benzoyl-4,6-O-benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy-α-D-glucopyranosyl}-5-O-<i>{3-O-(3,4-di-O-benzoyl-2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy-α-L-idopyranosyl)-2,5-di-O-benzoyl-β-D-ribofuranosyl}}</i>]-6-<i>O</i>-2-éthanal-1,3-di-<i>N</i>-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.38).</i>	201
Procédure générale pour les aminations réductrices suivies du traitement avec le méthanolate de sodium (2.39-2.44).	202

4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl}]-{2- <i>N</i> -(2-benzyloxycarbonylaminoéthyl)-aminoéthyl}-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.39).....	203
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl}]-{2- <i>N</i> -(3-benzyloxycarbonylaminopropyl)-aminoéthyl}-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.40).....	203
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl}]-{2- <i>N</i> -(benzyl)-aminoéthyl}-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.41).....	204
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl}]-{2- <i>N</i> -(2-phényléthyl)-aminoéthyl}-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.42).....	204
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl}]-{2- <i>N</i> -(3-méthylpyridyl)-aminoéthyl}-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.43).....	205
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl}]-{2- <i>N</i> -(4-méthyl-2-tert-butylloxycarbonylaminopyridyl)-aminoéthyl}-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.44).....	205
Procédure générale pour les déprotections finales (2.45-2.50)	206
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-amino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl}]-6- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(2-aminoéthyl)-aminoéthyl}-2-désoxystreptamine (2.45).....	206
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-amino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl}]-6- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(3-aminopropyl)-aminoéthyl}-2-désoxystreptamine (2.46).....	207

4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-amino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl}]-6- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -benzylaminoéthyl}-2-désoxystreptamine (2.47).....	207
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-amino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl}]-6- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(2-phényléthyl)-aminoéthyl}-2-désoxystreptamine (2.48).....	208
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-amino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl}]-6- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(3-méthylpiperidyl)-aminoéthyl}-2-désoxystreptamine (2.49).....	208
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-amino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl}]-6- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(4-méthyl-2-aminopyridyl)-aminoéthyl}-2-désoxystreptamine (2.50).....	209
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl}]-6- <i>O</i> -allyl-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.51).....	210
4- <i>O</i> -(2-Benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl)-6- <i>O</i> -allyl-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.52).....	211
4- <i>O</i> -(3,4,6-Tri- <i>O</i> -acétyl-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl)-5- <i>O</i> -acétyl-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-6- <i>O</i> -propyl-2-désoxystreptamine (2.54).....	212
4- <i>O</i> -[3,4,6-Tri- <i>O</i> -acétyl-2-amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -acétyl-6- <i>O</i> -propyl-2-désoxystreptamine (2.55).....	213
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(-2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.56).....	215
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(-2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -allyl-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.57).....	216
4- <i>O</i> -[3- <i>O</i> -Benzoyl-4,6- <i>O</i> -benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(3,4-di- <i>O</i> -benzoyl-2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-	

didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -allyl-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl- β -D-ribofuranosyl}}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.58).	217
4- <i>O</i> -[3- <i>O</i> -Benzoyl-4,6- <i>O</i> -benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(3,4-di- <i>O</i> -benzoyl-2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -(2-éthanal)- β -D-ribofuranosyl}}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.59).	218
Procédure générale pour les aminations réductrices suivies du traitement avec le méthanolate de sodium (2.60-2.93).....	219
4- <i>O</i> -[2-Benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(4-méthylphénylméthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.60).	220
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -{2,2-di- <i>N</i> -méthylaminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.61).	220
4- <i>O</i> -[2-Benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(2-benzyloxycarbonylaminoéthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.62).	221
4- <i>O</i> -[2-Benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(3-benzyloxycarbonylaminopropyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.63).	221
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -{2-(4-benzyloxycarbonylpiperazyl)-éthyl}- β -D-ribofuranosyl}}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.64).	222
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(5-méthyl-2- <i>tert</i> -butyloxycarbonylaminopyridyl)-	

aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.65).....	222
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(3-méthylpyridyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.66).....	223
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(3-quinolyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.67).....	223
4- <i>O</i> -[2-Benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(1-méthylbenzimidazolyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.68).....	224
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(3-pyridyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.69).....	224
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(phényl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.70).....	225
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(benzyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.71).....	225
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(2-phényléthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.72).....	226

- 4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-{2-*N*-(3-phénylpropyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.73)..... 226
- 4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-{2-*N*-(4-phénylpropyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.74)..... 227
- 4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-{2-*N*-(2-pyridyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.75)..... 227
- 4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-{2-*N*-(3-hydroxyphényl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.76)..... 228
- 4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-{2-*N*-(4-méthyl-2-*tert*-butyloxycarbonylaminopyridyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.77)..... 228
- 4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-{2-*N*-(cyclohexyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.78)..... 229
- 4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-{2-*N*-(1-(1,2,3,4-tétrahydronaphtyl))-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.79)..... 229
- 4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-

butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(3-hydroxyadamantyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}}-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.80).	230
4- <i>O</i> -[{4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -((3 <i>R</i>)-3-amino-3-désoxydihydrocholesterol)-éthyl}- β -D-ribofuranosyl}}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.81).	230
4- <i>O</i> -[{4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(2-phényléthyl)-2- <i>N</i> -(3-phénylpropyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.82).	231
4- <i>O</i> -[{4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -{2,2-di- <i>N</i> -dioctylaminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.83).	231
4- <i>O</i> -[{4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(2-(4-méthoxy)-phényléthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.84).	232
4- <i>O</i> -[{4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(2-(4-trifluorométhyl)-phényléthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.85).	232
4- <i>O</i> -[{4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(2-(3,5-diméthoxy)-phényléthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.86).	233
4- <i>O</i> -[{4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(2-(3,5-trifluorométhyl)-phényléthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.87).	233

4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(2-(4-phényl)-phényléthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.88).	234
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(2-(2-naphtyl)-éthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.89).	234
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(2-(3-pyridyl)-éthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.90).	235
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -{2-éthyl(1,8-naphthalimidyl)}- β -D-ribofuranosyl}}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.91).	235
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(2-(2-norboryl)éthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.92).	236
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(3,3-diméthylbutyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.93).	236
Procédure générale pour les déprotections (2.94-2.131).....	237
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -(2-aminoéthyl)- β -D-ribofuranosyl}}]-2-désoxystreptamine (2.94).	238
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2,2-di- <i>N</i> -diméthylaminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}}]-2-désoxystreptamine (2.95).....	238

4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(2-aminoéthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.96).....	239
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(3-aminopropyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.97).....	239
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -(2-piperazyléthyl)- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.98).....	240
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(5-méthyl-2-aminopyridyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.99).....	240
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(3-méthylpyridyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.100).....	241
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(3-méthylpiperidyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.101).....	241
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(3-quinolyl)-éthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.102).....	242
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(1-méthylbenzimidazolyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.103).....	243
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(3-méthylpyridyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.104).....	243
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(3-piperidyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.105).....	244

4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(phényl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.106).....	244
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(benzyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.107).....	245
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(2-phényléthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.108).....	245
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(3-phénylpropyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.109).....	246
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(4-phénylbutyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.110).....	246
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(2-pyridyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.111).....	247
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(3-hydroxyphényl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.112).....	248
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(4-méthyl-2-aminopyridyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.113).....	248
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(cyclohexyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.114).....	249
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(1-(1,2,3,4-tétrahydronaphtyl))-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.115).....	249

4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(3-hydroxyadamantyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]2-désoxystreptamine (2.116).....	250
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -((3 <i>R</i>)-3-amino-3-désoxydihydrocholesterol)-éthyl}- β -D-ribofuranosyl}]2-désoxystreptamine (2.117).....	250
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(2-phényléthyl)-2- <i>N</i> -(3-phénylpropyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]2-désoxystreptamine (2.118).....	251
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2,2-di- <i>N</i> -dioctylaminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]2-désoxystreptamine (2.119).....	251
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(2-(4-méthoxy)-phényléthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]2-désoxystreptamine (2.120).....	252
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(2-(4-trifluorométhyl)-phényléthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]2-désoxystreptamine (2.121).....	252
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(2-(3,5-diméthoxy)-phényléthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]2-désoxystreptamine (2.122).....	253
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(2-(3,5-ditrifluorométhyl)-phényléthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]2-désoxystreptamine (2.123).....	254
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(2-(4-phényl)-phényléthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]2-désoxystreptamine (2.124).....	254
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(2-(naphtyl)-éthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]2-désoxystreptamine (2.125).....	255

4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(2-(3-pyridyl)-éthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.126).....	255
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2-éthyl(1,8-naphtalimidyl)}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.127).....	256
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(2-(2-norboryl)éthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.128).....	256
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(3,3-diméthylbutyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.129).....	257
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(2-phényléthyl)-2- <i>N</i> -acétylaminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.130).....	258
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(2-phényléthyl)-2- <i>N</i> -benzoylaminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.131).....	259
4- <i>O</i> -(2-Benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl)-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.132).....	260
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{2- <i>O</i> -allyl-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.134).....	261
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -(2-phényléthan-2-ol)- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.135).....	262
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -(5-phénylpen-2,4-diényl)- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.136).....	264

Procédure pour l'obtention des composés (2.137-2.138) :	265
4- <i>O</i> -[{2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-amino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -(2-phényléthan-2-ol)- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.137).	266
4- <i>O</i> -[{2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-amino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -(2-phényléthyl)- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.138).	266
4- <i>O</i> -[{2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-amino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -(5-phénylpentyl)- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.139).	267
4- <i>O</i> -[{4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -cinnamyl- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.140).	268
4- <i>O</i> -[{4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -cinnamyl- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.140).	269
4- <i>O</i> -[{2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-amino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -(3-phénylpropyl)- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.141).	270
4- <i>O</i> -[{3- <i>O</i> -Benzoyl-4,6- <i>O</i> -benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(3,4-di- <i>O</i> -benzoyl-2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -(éthan-2-ol)- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.142).	271
4- <i>O</i> -[{4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -(éthoxycinnamyl)- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.143).	272
4- <i>O</i> -[{2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-amino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -(éthoxy-3-phénylpropyl)- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.144).	273

4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -(éthan-2-ol)- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.145).....	274
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-amino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -(éthan-2-ol))- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.146).....	275
4- <i>O</i> -[3- <i>O</i> -Benzoyl-4,6- <i>O</i> -benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{2- <i>O</i> -allyl-3- <i>O</i> -benzoyl-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl- β -D-ribofuranosyl}]-6- <i>O</i> -benzoyl-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.147).....	276
4- <i>O</i> -[3- <i>O</i> -Benzoyl-4,6- <i>O</i> -benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -benzoyl-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -(2-éthanal)- β -D-ribofuranosyl}]-6- <i>O</i> -benzoyl-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.148).....	277
Procédure générale pour les aminations réductrices suivies du traitement avec le méthanolate de sodium (2.149-2.151).....	278
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(4-méthylbenzyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.149).....	279
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(3-benzyloxycarbonylaminopropyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.150).....	279
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl-2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(2-phényléthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.151).....	280
Procédure générale pour les déprotections (2.142-2.154):	280
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{2- <i>O</i> -(2-aminoéthyl)- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.152).....	281
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(3-aminopropyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.153).....	281

4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{2- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(2-phényléthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl]}-2-désoxystreptamine (2.154).....	282
6.3 Procédures expérimentales pour le Chapitre 3.....	283
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(6-amino-2-benzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl]}-6- <i>O</i> -allyl-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (3.15).....	283
4- <i>O</i> -[3- <i>O</i> -Acétyl-4,6- <i>O</i> -benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(6-amino-3,4-di- <i>O</i> -acétyl-2-benzyloxycarbonylamino-6- <i>N</i> -(3-butényle)-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2,5-di- <i>O</i> -acétyl- β -D-ribofuranosyl]}-6- <i>O</i> -allyl-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (3.16).....	284
Composé 3.17.....	285
Composé 3.1.....	286
4- <i>O</i> -[2-Benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(6-amino-2-benzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl]}-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (3.18).....	287
4- <i>O</i> -[2-Benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2-6-dibenzyloxycarbonylamino-6- <i>N</i> -3-butényle)-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl]}-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (3.19).....	288
4- <i>O</i> -[3- <i>O</i> -Acétyl-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(3,4-di- <i>O</i> -acétyl-2-6-dibenzyloxycarbonylamino-6- <i>N</i> -3-butényle)-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl]}-6- <i>O</i> -allyl-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (3.20).....	289
Composé 3.21.....	290
Composé 3.2.....	291
Expression et purification de l'APH(3')-IIIa.....	292
Cinétique de l'APH(3')-IIIa à 4 °C.....	293
Détermination du site de phosphorylation du composé 3.1.....	294
4- <i>O</i> -[2-Benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(6-amino-2-benzyloxycarbonylamino-6- <i>N</i> -3-phénylpropyle)-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl]}-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (3.36).....	297

4- <i>O</i> -[2-Benzoyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(6-amino-2-benzoyloxycarbonylamino-6,6- <i>N</i> -di-3-phénylpropyl-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di- <i>N</i> -benzoyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (3.37).....	298
Procédure générale pour les déprotections finales (3.38-3.39)	299
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-6- <i>N</i> -(3-phénylpropyl)-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (3.38).....	299
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-6,6-di- <i>N</i> -(3-phénylpropyl)-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (3.39).....	300
4- <i>O</i> -[{3,4,6-Tri- <i>O</i> -acétyl-2-benzoyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(3,4-di- <i>O</i> -acétyl-6-amino-2-benzoyloxycarbonylamino-6- <i>N</i> -(L-tryptophanoyl)-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2,5-di- <i>O</i> -acétyl- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di- <i>N</i> -benzoyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (3.41).....	301
4- <i>O</i> -[{2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-6- <i>N</i> -(L-tryptophanoyl)-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (3.42).....	302
4- <i>O</i> -[{3- <i>O</i> -Benzoyl-4,6- <i>O</i> -benzylidène-2-benzoyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(3,4-di- <i>O</i> -benzoyl-2,6-dibenzoyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -benzoyl-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl- β -D-ribofuranosyl}]-6- <i>O</i> -benzoyl-1,3-di- <i>N</i> -benzoyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (3.43).....	303
4- <i>O</i> -[{3- <i>O</i> -Benzoyl-4,6- <i>O</i> -benzylidène-2-benzoyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(3,4-di- <i>O</i> -benzoyl-2,6-dibenzoyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> -allyl-2- <i>O</i> -benzoyl- β -D-ribofuranosyl}]-6- <i>O</i> -benzoyl-1,3-di- <i>N</i> -benzoyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (3.44).....	304
4- <i>O</i> -[{3- <i>O</i> -Benzoyl-4,6- <i>O</i> -benzylidène-2-benzoyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(3,4-di- <i>O</i> -benzoyl-2,6-dibenzoyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -benzoyl-5- <i>O</i> -(2-éthanal)- β -D-ribofuranosyl}]-6- <i>O</i> -benzoyl-1,3-di- <i>N</i> -benzoyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (3.45).....	305

Procédure générale pour les aminations réductrices suivies du traitement avec méthanolate de sodium (3.46-3.47).....	306
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> -{2,2-di- <i>N</i> -méthylaminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (3.46).....	307
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> -{2- <i>N</i> -(3-phénylpropyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (3.47).....	307
Procédure générale pour les déprotections finales (3.48-3.49)	308
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> -(2- <i>N,N</i> -diméthylaminoéthyl)- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (3.48).....	308
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> -(2- <i>N</i> -(3-phénylpropyl)éthyl)- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (3.49).....	309
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> -cinnamyl- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (3.50).....	310
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> -(3-phénylpropyl)- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (3.51).....	311
4- <i>O</i> -[3- <i>O</i> - <i>tert</i> -Butyldiméthylsilyl-4,6- <i>O</i> -benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldiméthylsilyl- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (3.52).....	312
4- <i>O</i> -[3- <i>O</i> -Triméthylsilyl-4,6- <i>O</i> -benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-	

idopyranosyl)-5- <i>O-tert</i> -butyldiméthylsilyl- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-déoxystreptamine (3.53).....	313
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy-3- <i>O</i> -triméthylsilyl- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(3,4-di- <i>O</i> -benzoyl-2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -benzoyl-5- <i>O-tert</i> -butyldiméthylsilyl- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-déoxystreptamine (3.54).....	315
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(3,4-di- <i>O</i> -benzoyl-2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2- <i>O</i> -benzoyl-5- <i>O-tert</i> -butyldiméthylsilyl- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-déoxystreptamine (3.55).....	316
4- <i>O</i> -[4,6- <i>O</i> -Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy-3- <i>O</i> -méthyl- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5- <i>O-tert</i> -butyldiméthylsilyl- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di- <i>N</i> -benzyloxycarbonyl-2-déoxystreptamine (3.56).....	317
4- <i>O</i> -[2-Amino-2-désoxy-3- <i>O</i> -méthyl- α -D-glucopyranosyl]-5- <i>O</i> -{3- <i>O</i> -(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl}]-2-déoxystreptamine (3.57).....	318
6.4 Procédures expérimentales pour le Chapitre 4.....	319
Cinétique de l'APH(3')-IIIa à 37 °C.	319
Détermination des vitesses de phosphorylation initiales (V_0).	319
Détermination des K_i et K_i' par rapport à l'amikacine.	320
Détermination des IC50.	320
Détermination des K_i par rapport à l'ATP.	321
6.5 Procédures expérimentales pour le Chapitre 5.....	322
4- <i>O</i> -[2,6-Diazido-2,3,4,6-tétradésoxy- α -D-glycéro-hex-4-ènopyranosyl]-6- <i>O</i> -{3- <i>N</i> -acétyl-2- <i>O</i> -acétyl-3-amino-3- <i>N</i> -méthyl-4- <i>C</i> -méthyl-3-désoxy- β -L-arabinopyranosyl]-1,3-diazido-1,3-désamino-2-déoxystreptamine (5.24).....	322
4- <i>O</i> -[2-Azido-5- <i>C</i> -formyl-2,3,4,6-tétradésoxy- α -D-glycéro-hex-4-ènopyranosyl]-6- <i>O</i> -{3- <i>N</i> -acétyl-2- <i>O</i> -acétyl-3-amino-3- <i>N</i> -méthyl-4- <i>C</i> -méthyl-3-désoxy- β -L-arabinopyranosyl]-1,3-diazido-1,3-désamino-2-déoxystreptamine (5.26).....	323

4- <i>O</i> -[2-Azido-6- <i>C</i> -méthyl-2,3,4-tridésoxy- α -D-glycéro-hex-4- ϵ nopyranosyl]-6- <i>O</i> -{3- <i>N</i> -acétyl-2- <i>O</i> -acétyl-3-amino-3- <i>N</i> -méthyl-4- <i>C</i> -méthyl-3-désoxy- β -L-arabinopyranosyl]-1,3-diazido-1,3-désamino-2-désoxystreptamine (5.28-5.29).....	324
4- <i>O</i> -[2-Amino-6-(<i>R</i>)- <i>C</i> -méthyl-2,3,4-tridésoxy- α -D-glycéro-hex-4- ϵ nopyranosyl]-6- <i>O</i> -{3-amino-3- <i>N</i> -méthyl-4- <i>C</i> -méthyl-3-désoxy- β -L-arabinopyranosyl]-2-désoxystreptamine (5.30).....	325
4- <i>O</i> -[2-Amino-6-(<i>S</i>)- <i>C</i> -méthyl-2,3,4-tridésoxy- α -D-glycéro-hex-4- ϵ nopyranosyl]-6- <i>O</i> -{3-amino-3- <i>N</i> -méthyl-4- <i>C</i> -méthyl-3-désoxy- β -L-arabinopyranosyl]-2-désoxystreptamine (5.31).....	326
Verdamicine C2 (5.22).....	328
Verdamicine C2a (5.23).....	328
4- <i>O</i> -[2-Azido-6- <i>O</i> -benzyl-6- <i>C</i> -méthyl-2,3,4-tridésoxy- α -D-glycéro-hex-4- ϵ nopyranosyl]-6- <i>O</i> -{3- <i>N</i> -acétyl-3-amino-2,4-di- <i>O</i> -benzyl-3- <i>N</i> -méthyl-4- <i>C</i> -méthyl-3-désoxy- β -L-arabinopyranosyl]-1,3-diazido-1,3-désamino-2-désoxystreptamine (5.32-5.33).....	329
Composés 5.34 et 5.35.....	330
6- <i>O</i> -(3- <i>N</i> -acétyl-3-amino-2,4-di- <i>O</i> -benzyl-3- <i>N</i> -méthyl-4- <i>C</i> -méthyl-3-désoxy- β -L-arabinopyranosyl)-1,3-diazido-1,3-désamino-2-désoxystreptamine (5.36).....	331
Composés 5.37-5.38.....	331
4- <i>O</i> -[2-Azido-5- <i>C</i> -acétyl-2,3,4,6-tétradésoxy- α -D-glycéro-hex-4- ϵ nopyranosyl]-6- <i>O</i> -{3- <i>N</i> -acétyl-2- <i>O</i> -acétyl-3-amino-3- <i>N</i> -méthyl-4- <i>C</i> -méthyl-3-désoxy- β -L-arabinopyranosyl]-1,3-diazido-1,3-désamino-2-désoxystreptamine (5.39).....	332
Réduction diastéréosélective du composé 5.39.....	333
4- <i>O</i> -[2-Azido-6-(<i>R</i>)- <i>C</i> -méthyl-2,3,4-tridésoxy- α -D-glycéro-hex-4- ϵ nopyranosyl]-6- <i>O</i> -{3- <i>N</i> -acétyl-2- <i>O</i> -acétyl-3-amino-3- <i>N</i> -méthyl-4- <i>C</i> -méthyl-3-désoxy- β -L-arabinopyranosyl]-1,3-diazido-1,3-désamino-2-désoxystreptamine (5.28).....	334
4- <i>O</i> -[2-Azido-6-(<i>S</i>)- <i>C</i> -méthyl-2,3,4-tridésoxy- α -D-glycéro-hex-4- ϵ nopyranosyl]-6- <i>O</i> -{3- <i>N</i> -acétyl-2- <i>O</i> -acétyl-3-amino-3- <i>N</i> -méthyl-4- <i>C</i> -méthyl-3-désoxy- β -L-arabinopyranosyl]-1,3-diazido-1,3-désamino-2-désoxystreptamine (5.29).....	334

4- <i>O</i> -[2-Azido-6- <i>C</i> -éthyl-2,3,4-tridésoxy- α -D-glycéro-hex-4-énopyranosyl]-6- <i>O</i> -{3- <i>N</i> -acétyl-2- <i>O</i> -acétyl-3-amino-3- <i>N</i> -méthyl-4- <i>C</i> -méthyl-3-désoxy- β -L-arabinopyranosyl]-1,3-diazido-1,3-désamino-2-désoxystreptamine (5.42).....	335
4- <i>O</i> -[2-Azido-6- <i>C</i> -isopropyl-2,3,4-tridésoxy- α -D-glycéro-hex-4-énopyranosyl]-6- <i>O</i> -{3- <i>N</i> -acétyl-2- <i>O</i> -acétyl-3-amino-3- <i>N</i> -méthyl-4- <i>C</i> -méthyl-3-désoxy- β -L-arabinopyranosyl]-1,3-diazido-1,3-désamino-2-désoxystreptamine (5.43).....	336
4- <i>O</i> -[2,6-Diazido-6- <i>C</i> -éthyl-2,3,4,6-tétradésoxy- α -D-glycéro-hex-4-énopyranosyl]-6- <i>O</i> -{3- <i>N</i> -acétyl-2- <i>O</i> -acétyl-3-amino-3- <i>N</i> -méthyl-4- <i>C</i> -méthyl-3-désoxy- β -L-arabinopyranosyl]-1,3-diazido-1,3-désamino-2-désoxystreptamine (5.44).....	337
4- <i>O</i> -[2,6-Diazido-6- <i>C</i> -isopropyl-2,3,4,6-tétradésoxy- α -D-glycéro-hex-4-énopyranosyl]-6- <i>O</i> -{3- <i>N</i> -acétyl-2- <i>O</i> -acétyl-3-amino-3- <i>N</i> -méthyl-4- <i>C</i> -méthyl-3-désoxy- β -L-arabinopyranosyl]-1,3-diazido-1,3-désamino-2-désoxystreptamine (5.45).....	338
4- <i>O</i> -[2,6-Diamino-6- <i>C</i> -éthyl-2,3,4,6-tétradésoxy- α -D-glycéro-hex-4-énopyranosyl]-6- <i>O</i> -{3-amino-3- <i>N</i> -méthyl-4- <i>C</i> -méthyl-3-désoxy- β -L-arabinopyranosyl]-2-désoxystreptamine (5.46).....	339
4- <i>O</i> -[2,6-Diamino-6- <i>C</i> -isopropyl-2,3,4,6-tétradésoxy- α -D-glycéro-hex-4-énopyranosyl]-6- <i>O</i> -{3-amino-3- <i>N</i> -méthyl-4- <i>C</i> -méthyl-3-désoxy- β -L-arabinopyranosyl]-2-désoxystreptamine (5.47).....	340
Procédure générale pour les aminations réductrices suivies des déprotections finales (composés 5.18 et 5.48).....	341
Antibiotique G-52 (5.18).....	341
4- <i>O</i> -[2,6-Diamino-6,6- <i>N</i> -diméthyl-2,3,4,6-tétradésoxy- α -D-glycéro-hex-4-énopyranosyl]-6- <i>O</i> -{3-amino-3- <i>N</i> -méthyl-4- <i>C</i> -méthyl-3-désoxy- β -L-arabinopyranosyl]-2-désoxystreptamine (5.50).....	342
6.6 Références pour le Chapitre 6.....	343
Annexe A.....	345
Annexe B.....	353

Liste des Figures

Figure 1.1. Structure de la streptomycine.	2
Figure 1.2. Structures des aminoglycosides de la classe A.	4
Figure 1.3. Structures des aminoglycosides de la classe B.....	5
Figure 1.4. Structures d'aminoglycosides atypiques.	6
Figure 1.5. Structures d'aminoglycosides semi-synthétiques utilisés cliniquement.	9
Figure 1.6. Structure rayon X de la sous unité 30S du ribosome procaryote avec la paromomycine liée au site-A.	10
Figure 1.7. Les différentes étapes de l'élongation lors de la biosynthèse protéique.	12
Figure 1.8. Changement de conformation du ribosome en présence du bon couple codon- anticodon ou de la paromomycine.	14
Figure 1.9. Déplacement de certaines bases azotées de l'ARNr du site-A lors de la sélection des bons ARNt.	16
Figure 1.10. Structure rayon X de la paromomycine dans un modèle du site-A;.....	18
Figure 1.11. Modification d'aminoglycosides par des enzymes désactivantes.	23
Figure 1.12. Structure rayon X du dimère des complexes tertiaires formés de l'ANT(4')- Ia, de la kanamycine et d'un analogue de l'ATP.	24
Figure 1.13. Structure rayon X du dimère des complexes tertiaires formés de AAC(6')- Iy, de CoA et de ribostamycine.	25
Figure 1.14. Structure rayon X du dimère des complexes formés de l'APH(3')-IIa et de la kanamycine A.	26
Figure 2.1. Superposition de la structure rayon X la tobramycine à celle de la paromomycine.....	45
Figure 2.2. Paromomycine fonctionnalisée à la position O2'' ou O6 pour imiter le cycle III de la tobramycine.	46
Figure 2.3. Constante de dissociation (K_d) entre un aminoglycoside (AG) et le site-A du ribosome procaryote.	46
Figure 2.4. Concentration inhibitrice minimum (CIM) d'un antibiotique.....	47
Figure 2.5. Structures d'analogues de la néomycine B fonctionnalisée à la position O5'' ou C5'' préparés par Baasov et Tor.	52

Figure 2.6. Chaînes latérales des composés 2.39-2.44	61
Figure 2.7. Chaînes latérales des composés 2.60-2.93	66
Figure 2.8. a) Structure rayon X de l'analogue 2.97 dans un oligonucléotide modèle du site-A.....	69
Figure 2.9. Variation du motif 1,3-diaminopropane dans la chaîne latérale à la position O2'' de la paromomycine.	70
Figure 2.10. Structure rayon X de l'analogue 2.100 dans un oligonucléotide modèle du site-A.....	71
Figure 2.11. Variation de la chaîne latérale O2'' qui sort du sillon majeur.	72
Figure 2.12. Relation entre la structure et l'activité de la chaîne latérale phénylalcane-amine (analogues 2.106-2.110) à la position O2'' de la paromomycine.....	73
Figure 2.13. Structures rayon X des analogues 2.108 et 2.113 dans un oligonucléotide modèle du site-A.....	74
Figure 2.14. Analogues préparés (2.139 et 2.144) pour évaluer l'importance de l'azote dans la chaîne latérale des analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O2''	75
Figure 3.1. Phosphorylation des aminoglycosides par l'APH(3')-IIIa.....	94
Figure 3.2. Structure rayon X du complexe tertiaire formé de l'APH(3')-IIIa, de l'ADP et de la néomycine B.....	95
Figure 3.3. Mécanisme de l'APH(3')-IIIa et mécanisme de la liaison des aminoglycosides avec l'APH(3')-IIIa.	96
Figure 3.4. Superposition des structures rayon X de la paromomycine dans un modèle du site-A du ribosome procaryote sur celle de la néomycine B liée à l'APH(3')-IIIa..	97
Figure 3.5. Les interactions de van der Waals entre l'ARNr et la paromomycine sont sur la face opposée à celles entre l'APH(3')-IIIa et la néomycine B.....	98
Figure 3.6. Sélection de groupements fonctionnels de la paromomycine pour le design d'aminoglycosides macrocycliques.	100
Figure 3.7. Méthode utilisée pour la détermination du taux de la phosphorylation d'aminoglycosides catalysée par l'APH(3')-IIIa.	108
Figure 3.8. Phosphorylation de la paromomycine et de son analogue macrocyclique 3.1 en présence de l'APH(3')-IIIa.....	109

Figure 3.9. Structure proposée pour le produit de la mono-phosphorylation de la l'analogue macrocyclique 3.1	110
Figure 3.10. Fragments observés pour les produits mono-phosphorylés de la paromomycine.	111
Figure 3.11. Structures des analogues 2.46 et 2.48 choisis pour évaluer l'impact de la fonctionnalisation de la position O6 de la paromomycine sur la phosphorylation catalysée par l'APH(3')-IIIa.....	114
Figure 3.12. Structures des analogues 3.38 et 3.42 choisis pour évaluer l'impact de la fonctionnalisation de la position N6''' sur la phosphorylation catalysée par l'APH(3')-IIIa.	116
Figure 4.1. Aminoglycosides naturels qui sont des inhibiteurs d'enzymes désactivantes d'aminoglycosides.....	133
Figure 4.2. Étude entre la structure et l'activité des inhibiteurs de l'AAC(6')-Ii préparés par Auclair <i>et al.</i>	138
Figure 4.3. Résumé schématique de l'étude entre la structure et l'activité des inhibiteurs de l'AAC(6')-Ii préparés par Auclair <i>et al.</i>	138
Figure 4.4. Mécanisme d'action proposé pour un inhibiteur irréversible des APH(3')-Ia et -Iia, préparé par Mobashery <i>et al.</i>	140
Figure 4.5. Mécanisme proposé pour la phosphorylation-régénération d'un aminoglycoside semi-synthétique préparé par Mobashery <i>et al.</i>	142
Figure 4.6. La 7-hydroxytropolone (4.52) inhibe une ANT(2'') selon Allen <i>et al.</i>	143
Figure 4.7. Évaluation du potentiel d'inhibiteurs de kinases eucaryotes à inhiber l'APH(3')-IIIa ainsi que l'enzyme bifonctionnelle AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia par Wright <i>et al.</i>	144
Figure 4.8. Évaluation du potentiel inhibiteur d'antibiotiques peptidiques polycationiques par Wright <i>et al.</i>	145
Figure 4.9. Le 1-(bromométhyl)phénanthrène (4.63) est un inhibiteur irréversible de l'AAC(6')-Ie selon Wright <i>et al.</i>	146
Figure 4.10. Impact des analogues 2.106 et 2.108 sur la vitesse de la phosphorylation de l'amikacine.....	150

Figure 4.11. Variation des $K_m(\text{app})$ et $V_{\text{max}}(\text{app})$ de l'amikacine pour l'APH(3')-IIIa en fonction de la concentration des inhibiteurs 2.106 et 2.108	151
Figure 4.12. Mécanisme proposé pour l'inhibition non-compétitive mixte de l'APH(3')-IIIa par rapport à la phosphorylation de l'amikacine pour les inhibiteurs 2.106 et 2.108	156
Figure 4.13. Relation entre la vitesse de phosphorylation relative (V_{rel}) et le IC_{50} des analogues de la paromomycine fonctionnalisés à la position O2''	156
Figure 4.14. Impact de l'analogue 2.108 sur la vitesse de la phosphorylation de l'amikacine catalysée par l'APH(3')-IIIa à différentes concentrations d'ATP.....	157
Figure 4.15. Régressions non linéaires pour la détermination des $K_m(\text{app})$ et $V_{\text{max}}(\text{app})$ de l'ATP en présence de l'inhibiteur 2.108	158
Figure 4.16. Variation du $V_{\text{max}}(\text{app})$ et du $K_m(\text{app})$ à différentes concentrations d'ATP lors de la phosphorylation de l'amikacine catalysée par l'APH(3')-IIIa en fonction de la concentration de l'inhibiteur 2.108	160
Figure 4.17. Vitesses relatives de phosphorylation et IC_{50} des composés 3.49 et 3.51	161
Figure 4.18. Application potentielle de l'inhibiteur 2.108 pour restaurer l'activité antibactérienne de l'amikacine contre les souches de bactéries qui expriment l'APH(3')-IIIa.	163
Figure 5.1. Aminoglycosides semi-synthétiques fonctionnalisés à la position N1 préparés entre 1972 et 1975.	170
Figure 5.2. Structures des gentamicines et des verdamicines.....	176
Figure 6.1 Spectre RMN COSY du composé 2.55	214
Figure 6.2 Gel SDS-PAGE de l'APH(3')-IIIa purifiée.....	293
Figure 6.3. Fragments observés en spectrométrie de masse pour la paromomycine et le composé 3.1 phosphorylés.....	296
Figure 6.4. Fragments observés en spectrométrie de masse pour le composé 3.53	314

Liste des Schémas

Schéma 2.1. Formation d'acétals de la paromomycine <i>N</i> -protégée par Hanessian <i>et al.</i>	50
Schéma 2.2. Préparation du composé 2.6 par Hanessian <i>et al.</i>	51
Schéma 2.3. Fonctionnalisation de la position C5'' de la paromomycine par Vasella <i>et al.</i>	52
Schéma 2.4. Préparation d'analogues visant à imiter le cycle IV de la néomycine B par Wong <i>et al.</i>	53
Schéma 2.5. Préparation d'analogues visant à imiter le cycle I de la paromomycine par Hanessian <i>et al.</i>	55
Schéma 2.6. Préparation d'analogues visant à imiter les cycles III et IV de la néomycine B par Wong <i>et al.</i>	56
Schéma 2.7. Préparation d'analogues visant à imiter les cycles III et IV de la paromomycine par Hanessian <i>et al.</i>	57
Schéma 2.8. Préparation d'un analogue visant à imiter le cycle III de la néomycine B par Chang <i>et al.</i>	58
Schéma 2.9. Préparation des composés 2.45-2.50	60
Schéma 2.10. Dégradation chimique du composé 2.37	62
Schéma 2.11. Préparation des composés 2.94-2.131	65
Schéma 2.12. Preuve de structure du composé 2.57 par dégradation chimique	67
Schéma 2.13. Préparation des composés 2.137-2.139	77
Schéma 2.14. Préparation du composé 2.141	78
Schéma 2.15. Préparation des composés 2.144 et 2.146	79
Schéma 2.16. Préparation des composés 2.152-2.154	81
Schéma 3.1. Liaison directe entre les positions N2' et C5'' de la néomycine B par Tor <i>et al.</i>	101
Schéma 3.2. Liaison des positions N2' et C5'' de la néomycine B avec des chaînes de longueurs différentes par Acensio <i>et al.</i>	103
Schéma 3.3. Préparation de l'analogue macrocyclique 3.1 en reliant les positions N6''' et O6 de la paromomycine	105

Schéma 3.4. Préparation de l'analogue macrocyclique 3.2 en reliant les positions N6''' et O6 de la paromomycine.....	107
Schéma 3.5. Préparation des analogues 3.38 , 3.39 et 3.52	115
Schéma 3.6. Préparation des analogues 3.48 et 3.49	119
Schéma 3.7. Préparation de l'analogue 3.51	120
Schéma 3.8. Préparation de l'analogue 3.57	122
Schéma 4.1. Préparation d'un inhibiteur de l'AAC(3)-I par Northrop <i>et al.</i>	134
Schéma 4.2. Préparation d'inhibiteurs des APH(3')-Ia et -IIa par Mobashery <i>et al.</i>	135
Schéma 4.3. Préparation d'un inhibiteur de l'AAC(6')-Ii par Auclair <i>et al.</i>	137
Schéma 4.4. Préparation d'un inhibiteur des APH(3')-Ia et -IIa par Mobashery <i>et al.</i> .	139
Schéma 4.5. Préparation d'un inhibiteur irréversible de l'APH(3')-IIa par Mobashery <i>et al.</i>	140
Schéma 4.6. Préparation de l'aminoglycoside semi-synthétique 4.49 par Mobashery <i>et al.</i>	142
Schéma 5.1. Fonctionnalisation de la position N1 de la sisomicine par Boxler <i>et al.</i> ...	171
Schéma 5.2. Préparation récente de l'isepamicine par Moon <i>et al.</i>	172
Schéma 5.3. Préparation récente de la nétilmicine par Nam <i>et al.</i>	173
Schéma 5.4. Fonctionnalisation de la position N6' de la sisomicine par Davies <i>et al.</i> ...	174
Schéma 5.5. Préparation du composé 5.26	180
Schéma 5.6. Mécanisme de l'oxydation allylique par le dioxyde de sélénium.	180
Schéma 5.7. Préparation du mélange 1:1 des deux épimères en C6' de la verdamicine (5.22-5.23).	181
Schéma 5.8. Dégradation chimique pour déterminer le ratio diastéréomérique du mélange 5.28-5.29	182
Schéma 5.9. Diastéréosélectivité de la réduction du composé 5.37 avec le complexe formé avec le borane et le composé 5.38 ou 5.39	183
Schéma 5.10. Préparation individuelle des verdamicines C2 (5.22) et C2a (5.23).	184
Schéma 5.11. Préparation des C6'-éthyle- (5.46) et C6'-isopropyle- (5.47) sisomicines	185
Schéma 5.12. Préparation des composés 5.18 et 5.50	186

Liste des Tableaux

Tableau I. Isolation des aminoglycosides à partir de micro-organismes.....	3
Tableau II. Constantes de vitesse pour les étapes de sélection des ARNt par le ribosome lors de l'élongation.	13
Tableau III. Contacts entre la paromomycine et l'ARNr du site-A.....	19
Tableau IV. Activités antibactériennes et affinités pour le site-A du ribosome procaryote de certains aminoglycosides.....	47
Tableau V. Activités antibactériennes des composés 2.45-2.50	63
Tableau VI. Activités antibactériennes des composés 2.94-2.131	83
Tableau VII. Activités antibactériennes des composés 2.137-2.139, 2.141, 2.144 et 2.146	84
Tableau VIII. Activités antibactériennes des composés 2.152-2.154	85
Tableau IX. Protection offerte par les composés 2.100 et 2.108 pour des souris infectées par <i>S. aureus</i>	86
Tableau X. Paramètres cinétiques déterminés à 4 °C pour la phosphorylation de la paromomycine et de l'analogue 3.1	110
Tableau XI. Paramètres cinétiques déterminés à 4 °C pour la phosphorylation des analogues 2.46 et 2.48	114
Tableau XII. Paramètres cinétiques déterminés à 4 °C pour la phosphorylation des analogues 3.38 et 3.42	117
Tableau XIII. Paramètres cinétiques pour la phosphorylation de l'analogue 3.57	123
Tableau XIV. Activités antibactériennes des analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O3', O5'' ou N6'''.	124
Tableau XV. Vitesses relatives pour la phosphorylation des analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O2''.....	148
Tableau XVI. K _i ' et K _i des analogues 2.106 et 2.108	152
Tableau XVII. IC ₅₀ des analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O2''.....	154
Tableau XVIII. Activités antibactériennes des composés 5.18, 5.22-5.23 et 5.50	188

Liste des abréviations

δ :	Déplacement chimique en ppm (rmn)
2D :	Deux dimensions
A :	Adénine
AAC :	Aminoglycoside acétyle transférase
Ac :	Acétyle
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADP :	Adénosine diphosphate
ANT :	Aminoglycoside nucléotidyle transférase
APH :	Aminoglycoside phosphotransférase
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
ARNr :	Acide ribonucléique ribosomal
ARNt :	Acide ribonucléique de transfert
ARNt-aa :	Acide ribonucléique de transfert amino-acylé
ATP :	Adénosine triphosphate
atm :	Atmosphère
ATTC :	American type culture collection
Bn :	Benzyle
Bu :	Butyle
Bz :	Benzoyle
Boc :	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyle
C :	Cytosine
cat :	Catalytique
Cbz :	Benzyloxycarbonyle
CCM :	Chromatographie sur couche mince
CIM :	Concentration inhibitrice minimum
CoA :	Co-Enzyme A
COSY :	Spectroscopie corrélée
DCC :	Dicyclohexylcarbodiimide

DMAP :	Diméthylaminopyridine
DMF :	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMS :	Diméthyle sulfide
DMSO :	Diméthyle sulfoxyde
EDC :	Hydrochlorure de 1-Éthyl-3-(3-diméthyllaminopropyl)carbodiimide
EF-Tu :	Facteur d'élongation de type Tu
Et :	Éthyle
G :	Guanine
GDP :	Guanosine diphosphate
GTP :	Guanosine triphosphate
h :	Heure
HOAt :	1-hydroxy-7-azabenzotriazole
HOBt:	1-Hydroxybenzotriazole
HPLC :	Chromatographie liquide haute performance
Hz :	Hertz
IC ₅₀ :	Concentration inhibitrice à 50%
ⁱ Pr :	Isopropyle
IR :	Spectroscopie infrarouge
k _{cat} :	Constante catalytique
KHMDS :	<i>N,N</i> -Bis(triméthylsilyl)amidure de potassium
K _i :	Constante d'inhibition
K _m :	Constante de Michaelis
L :	Ligand
LiHMDS :	<i>N,N</i> -Bis(triméthylsilyl)amidure de lithium
M :	Molaire
mCPBA:	Acide <i>meta</i> -chloropéroxybenzoïque
Me :	Méthyle
min :	Minute
mmol :	Millimole
mol :	Mole
MOM :	Méthoxyméthyle

Ms :	Méthanesulfonyle
SM :	Spectrométrie de masse (basse résolution)
SMHR:	Spectrométrie de masse à haute résolution
Pf:	Point de fusion
Ph :	Phényle
pNBz :	<i>para</i> -Nitrobenzoyle
Pr :	Propyle
PSI :	Livre par pouce carré
RCM :	Fermeture de cycle par métathèse (ou RCM)
RMN :	Résonance magnétique nucléaire (ou rmn)
SAR :	Relation structure-activité
TBAF :	Fluorure de tétrabutylammonium
TBS :	tert-Butyldiméthylsilyle
TEMPO :	2,2,6,6-Tétraméthyl-pipéridin-1-oxyle
Tf :	Trifluorométhanesulfonyle
TFA :	Acide trifluoroacétique
THF :	Tétrahydrofurane
TIBS :	2,4,6-Triisopropylbenzenesulfonyle
TIPS :	Triisopropylsilyle
TMS :	Triméthylsilyle
Ts :	Toluènesulfonyle
TsOH:	Acide <i>p</i> -toluènesulfonique
U :	Uracile
V ₀ :	Vitesse initiale
V _{rel} :	Vitesse relative

Remerciements

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères à mon directeur de recherche, le professeur Stephen Hanessian. Je lui suis très reconnaissant de m'avoir accepté dans son groupe et de m'avoir confié un projet de recherche si passionnant. Je le remercie pour avoir mis à ma disposition tout ce qui était nécessaire afin que je puisse atteindre mes objectifs, et même les surpasser. Je voudrais aussi le remercier pour m'avoir laissé beaucoup de liberté à l'intérieur de ce projet de recherche, ce qui m'a permis de m'épanouir en chimie, mais aussi en biochimie. Enfin, je le remercie pour ses nombreux conseils, sa motivation, pour avoir partagé ses connaissances avec moi et surtout pour m'avoir transmis sa passion pour la recherche.

Je désire également remercier le professeur Jeffrey W. Keillor pour avoir accepté de collaborer à ce projet de recherche. Je lui suis reconnaissant pour ses conseils et pour le généreux partage de ses connaissances en biochimie.

Je veux également remercier les membres du groupe de recherche du professeur Hanessian qui ont su agrémente l'environnement de travail et les réunions de groupe. Je désire particulièrement souligner ma reconnaissance à mes collègues Martin Tremblay, Susanta S. Adhikari, Pachamuthu Kandasamy, Ellen Klegraf, Alexandre Giguère et Pablo Maianti pour leur motivation et leur aide indispensables. Je remercie également Nathalie Beatriz Campos-Reales du groupe du professeur Keillor pour son aide considérable.

Je souhaite remercier mesdames Carol St-Vincent Major et Éline Fournelle pour leur support et leur collaboration grandement appréciés. Je remercie également le personnel de l'université pour leur service professionnel: Dalbir S. Sekhon, Dre Alexandra Furtos, Karine Venne, Dr Minh Tan Phan Viet et Sylvie Bilodeau ainsi que tout le personnel des services de bibliothèques, spectroscopie RMN, spectrométrie de masse, diffraction rayons X, atelier mécanique/électronique, et secrétariat.

Je voudrais tout spécialement exprimer ma gratitude aux compagnies Isis Pharmaceuticals et Achaogen pour la détermination des activités antibactériennes. Je tiens à remercier le professeur Éric Westhof et Boris François pour avoir déterminé les structures de complexes aminoglycosides-ARN par diffraction des rayons X et pour leur accueil chaleureux lors de mon séjours de six semaines dans le groupe du professeur Westhof, à Strasbourg. Je désire également remercier les Drs Eric E. Swayze, Heinz Moser, James Aggen, Adam Goldblum et Mike Migawa pour leur implication et leur collaboration.

Je remercie l'université de Montréal, la compagnie Boehringer-Ingelheim (Canada) et le Centre de Coopération Inter-Université France-Québec pour m'avoir appuyé tout au long de mes études graduées en m'offrant différentes bourses d'étude.

Finalement, je remercie mes parents qui ont toujours été disponibles et prêts à m'aider et je tiens à remercier spécialement mon épouse Vickie pour ses encouragements continuels et pour la révision de ce document.

Chapitre 1
Introduction aux antibiotiques aminoglycosidiques

1.1. Historique, structure et classification des aminoglycosides.

Stimulée par la découverte de la pénicilline en 1929¹, la recherche intensive de composés antibiotiques mena en 1944 à l'isolation du premier antibiotique aminoglycosidique, la streptomycine, à partir du micro-organisme *Streptomyces griseus* par Selman A. Waksman qui a mérité le prix Nobel de physiologie et de médecine en 1952 (Figure 1.1).² Toujours à la recherche d'antibiotiques, plusieurs chercheurs ont, entre 1949 et 1970, isolé une série d'aminoglycosides de différents micro-organismes (Tableau I). Par la suite, quelques analogues semi-synthétiques ont été préparés dans le but de contrer l'apparition de souches résistantes. Avant d'aborder ces antibiotiques semi-synthétiques, classons les aminoglycosides naturels selon leurs propriétés structurales et définissons la nomenclature spécifique à leur structure.

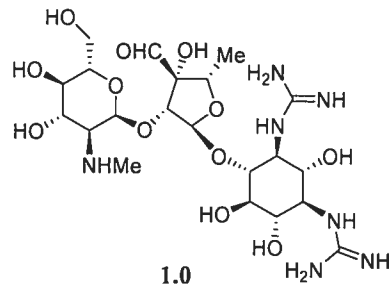


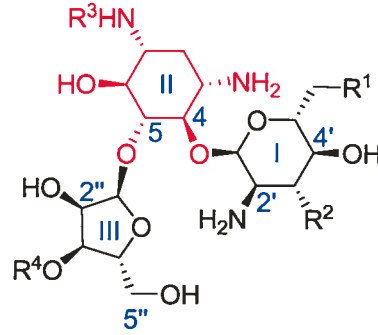
Figure 1.1. Structure de la streptomycine.

Aminoglycoside ^a	Source	Année	Référence
Néomycine B	<i>Streptomyces fradiae</i>	1949	3
Kanamycines A, B et C	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	1957	4
Paromomycine	différents <i>Streptomyces</i>	1958	5
Gentamicines C1, C1a, C2 et B	<i>Micromonospora purpurea</i>	1963	6
Tobramycine	<i>Streptomyces tenebrarius</i>	1967	7
Butirosine	<i>Bacillus circulans</i>	1969	8
Ribostamycine	<i>Streptomyces ribosidificus</i>	1969	9
Sisomicine	<i>Micromonospora inyoensis</i>	1970	10
Lividomycines A et B	<i>Streptomyces lividus</i>	1970	11

^a La terminologie détermine que les aminoglycosides isolés des *Streptomyces* se terminent en 'ycine', alors que ceux issus d'autres sources se terminent en 'icine'.

Tableau I. Isolation des aminoglycosides à partir de micro-organismes.

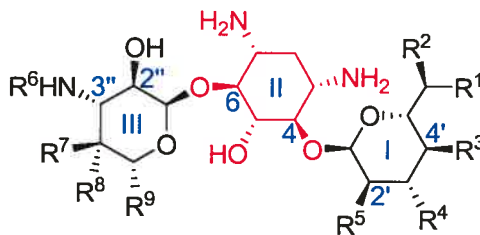
La majorité des antibiotiques aminoglycosides peuvent être inclus dans une des deux classes, A ou B, selon l'ordre de la substitution de la 2-déoxystreptamine, qui est l'unité centrale de ces molécules. La classe A est constituée des membres pour lesquels la 2-déoxystreptamine est substituée aux positions 4 et 5 (Figure 1.2), alors que la classe B est composée de ceux où elle est substituée aux positions 4 et 6 (Figure 1.3).



Nom	No.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
Ribostamycine	1.1	NH ₂	OH	H	H
Butirosine	1.2	NH ₂	OH		H
Paromomycine	1.3	OH	OH	H	
Néomycine B	1.4	NH ₂	OH	H	
Lividomycine A	1.5	OH	H	H	
Lividomycine B	1.6	OH	H	H	

^a La 2-déoxystreptamine est montrée en rouge et quelques aspects de nomenclature sont indiqués en bleu.

Figure 1.2. Structures des aminoglycosides de la classe A. ^a



Nom	No.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸	R ⁹
Kanamycine A	1.7	NH ₂	H	OH	OH	OH	H	OH	H	CH ₂ OH
Kanamycine B	1.8	NH ₂	H	OH	OH	NH ₂	H	OH	H	CH ₂ OH
Kanamycine C	1.9	OH	H	OH	OH	NH ₂	H	OH	H	CH ₂ OH
Gentamicine C1	1.10	NHMe	Me	H	H	NH ₂	Me	Me	OH	H
Gentamicine C1a	1.11	NH ₂	H	H	H	NH ₂	Me	Me	OH	H
Gentamicine C2	1.12	NH ₂	Me	H	H	NH ₂	Me	Me	OH	H
Gentamicine C2a	1.13	Me	NH ₂	H	H	NH ₂	Me	Me	OH	H
Gentamicine B	1.14	NH ₂	H	OH	OH	OH	Me	Me	OH	H
Tobramycine	1.15	NH ₂	H	OH	H	NH ₂	H	OH	H	CH ₂ OH
Sisomicine ^b	1.16	NH ₂	H	^b	H	NH ₂	Me	Me	OH	H

^a La 2-déoxystreptamine est montrée en rouge et quelques aspects de nomenclature sont indiqués en bleu.

^b La sisomicine a une insaturation entre les positions C4' et C5'.

Figure 1.3. Structures des aminoglycosides de la classe B.^a

Puisque ces antibiotiques sont des molécules polyfonctionnelles constituées de plusieurs cycles, une nomenclature spécifique a évidemment dû être développée. Que ce soit dans la classe A ou B, le cycle lié à la position 4 de la 2-déoxystreptamine est nommé cycle I, la 2-déoxystreptamine est nommé cycle II, le cycle lié aux positions 5 ou 6 de la 2-déoxystreptamine est nommé cycle III, s'il y a un cycle lié au cycle III, on le nomme cycle IV et ainsi de suite (Figures 1.2 et 1.3). Les groupements fonctionnels du cycle I portent la mention prime, ceux du cycle II ne portent pas de mention particulière ceux du cycle III portent la mention double prime, ceux du cycle IV portent la mention triple prime, etc. (Figures 1.2 et 1.3).

Les rares antibiotiques aminoglycosidiques qui n'entrent pas dans les classes A ou B sont tout simplement catégorisés comme étant atypiques. Ils incluent la streptomycine (**1.0**) (Figure 1.1), la fortimicine A (**1.17**),¹² la spectinomycine (**1.18**),¹³ l'apramycine (**1.19**),¹⁴ l'hygromycine B (**1.20**)¹⁵ ainsi que la seldomycine (**1.21**)¹⁶ (Figure 1.4) et ne seront pas discutés d'avantage dans ce document.

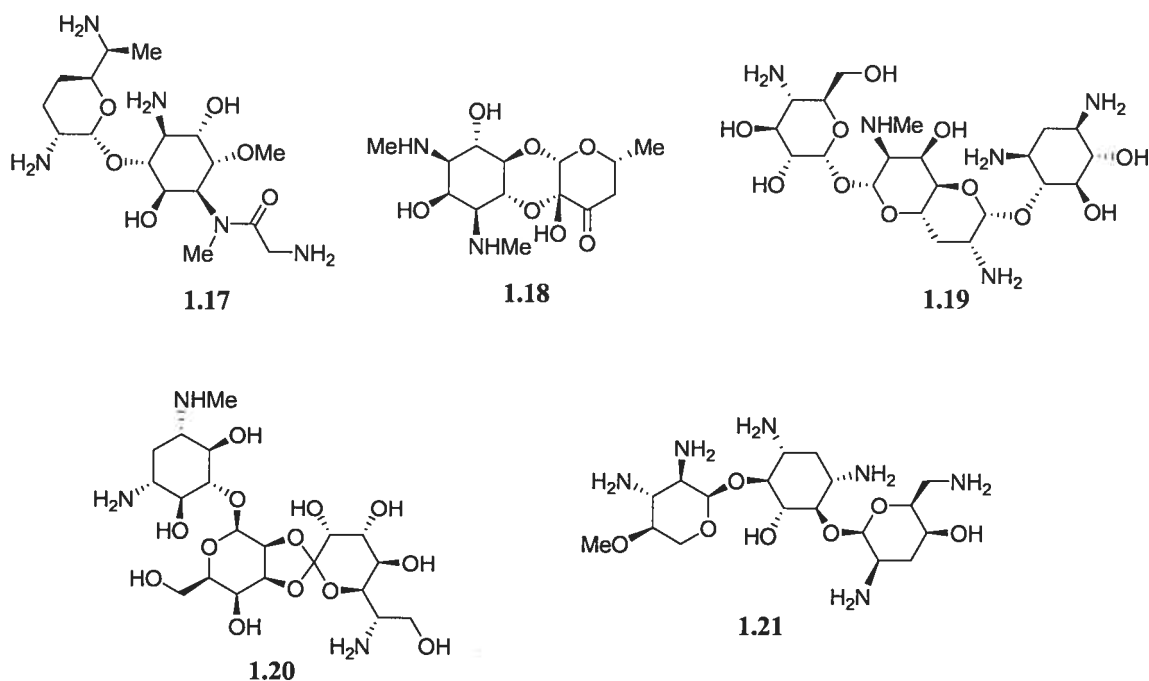


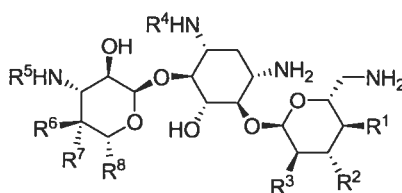
Figure 1.4. Structures d'aminoglycosides atypiques.

1.2. Utilisation des aminoglycosides.

Les aminoglycosides font partie des antibiotiques qui ont été les plus utilisés en situation clinique depuis les soixante dernières années.¹⁷ Leur effet est bactéricide, c'est-à-dire qu'ils n'empêchent pas seulement la multiplication des bactéries (effet bactériostatique), mais qu'ils déciment les colonies bactériennes (effet bactéricide). Ce sont des antibiotiques qui appartiennent à la catégorie dite 'concentration-dépendant', c'est-à-dire que leurs propriétés antibiotiques sont reliées à la concentration plasmiqque atteinte plutôt qu'à la durée totale de l'exposition. Ils sont actifs contre la plupart des souches bactériennes Gram-négatives, qu'ils pénètrent plus facilement que les souches Gram-positives, mais ils sont tout de même utilisés contre certaines souches de bactéries Gram-positives. Par exemple, l'utilisation d'antibiotiques de type β -lactame en combinaison avec des aminoglycosides est connue pour provoquer des effets synergiques, car les β -lactames permettent aux aminoglycosides de pénétrer les bactéries plus facilement.¹⁸ Bien que n'ayant pas d'effet sur les bactéries anaérobiques, qu'ils n'arrivent pas à pénétrer, les aminoglycosides demeurent classés dans le groupe très sélect des antibiotiques à large spectre d'action.¹⁹ Étant des molécules très hydrophiles, leur absorption est mauvaise lorsqu'ils sont administrés oralement. Les voies parentérales sont la meilleure option pour atteindre la concentration plasmiqque désirée.¹⁹ L'emploi des aminoglycosides est limité par leur ototoxicité (oreille) et leur néphrotoxicité (rein), mais c'est l'émergence de souches de bactéries résistantes provoquée par leur mauvaise utilisation qui restreint surtout leur usage.^{17,19}

1.3. Antibiotiques aminoglycosidiques semi-synthétiques (1970-1980).

Au cours de la décennie ayant suivi l'isolation des derniers aminoglycosides naturels, la recherche d'antibiotiques aminoglycosidiques semi-synthétiques avait comme objectif principal d'élargir leur spectre d'action, car leur utilisation fréquente a mené à l'apparition de bactéries résistantes aux aminoglycosides. Puisqu'on avait remarqué que les gentamicines C1, C1a et C2 (1.10-1.12) étaient actives contre des souches de bactéries résistantes aux kanamycines (1.7-1.9), on a tenté d'introduire le motif 3',4'-didésoxy retrouvé chez ces premières à la kanamycine B (1.8). Ainsi, la 3',4'-didésoxy kanamycine B, nommée la dibekacine (1.22), a été préparée en 1971 (Figure 1.5).²⁰ On avait également remarqué que les propriétés antibactériennes de la butirosine (1.2) étaient plus intéressantes que celles de la ribostamycine (1.1), alors qu'ils diffèrent seulement par la présence de la chaîne acide (2*S*)-4-amino-2-hydroxybutanoïque à la position N1 chez la butirosine. On a donc introduit la chaîne acide (2*S*)-4-amino-2-hydroxybutanoïque à la position N1 de la kanamycine A (1.7) pour obtenir l'amikacine (1.23), en 1972.²¹ Un an plus tard, la même chose a été faite avec la dibekacine (1.22) pour obtenir l'arbekacine (1.24).²² Ces aminoglycosides fonctionnalisés à la position N1 ont mené, en 1975, à la synthèse de la N1-éthylsisomicine, nommée nétilmicine (1.25).²³ La N1-[(2*S*)-3-amino-2-hydroxypropanoyl]-gentamicine B, nommée isepamicine (1.26), a été obtenue la même année.²⁴ D'autres aminoglycosides semi-synthétiques ont été préparés au cours de la décennie 1970-1980, pendant laquelle la recherche était très active dans ce domaine. Cependant, ceux mentionnés ci-haut ont été les seuls à trouver une application clinique notable.



Nom	No.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸
Dibekacine	1.22	H	H	NH ₂	H	H	OH	H	CH ₂ OH
Amikacine	1.23	OH	OH	OH		H	OH	H	CH ₂ OH
Arbekacine	1.24	H	H	NH ₂		H	OH	H	CH ₂ OH
Nétilmicine ^a	1.25	H ^a	H	NH ₂	Et	Me	Me	OH	H
Isepamicine	1.26	OH	OH	OH		Me	H	OH	H

^a La nétilmicine a une insaturation entre les positions C4' et C5'.

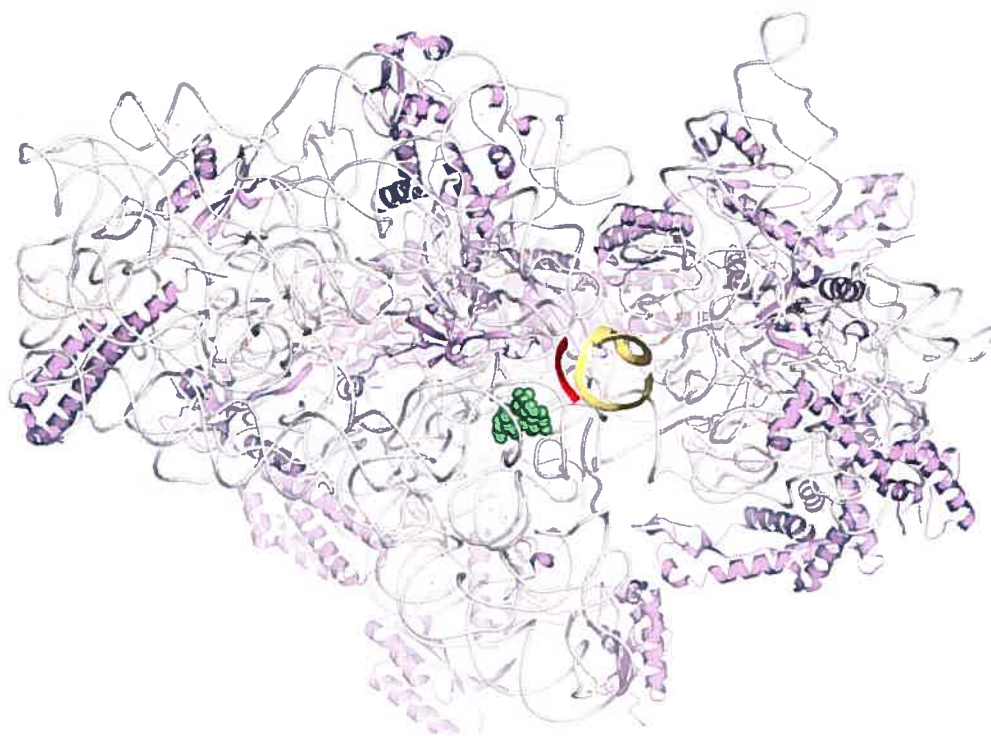
Figure 1.5. Structures d'aminoglycosides semi-synthétiques utilisés cliniquement.

La plupart des modifications structurales fructueuses des années 1970-1975 consistaient essentiellement à introduire des fonctionnalités d'un aminoglycoside sur un autre aminoglycoside. Parmi les antibiotiques semi-synthétiques obtenus de cette manière, seuls quelques analogues de la classe B ont trouvé une application clinique. Une réduction des activités reliées à la recherche d'analogues aminoglycosidiques, et des autres antibiotiques en général, a ensuite été observée pendant plusieurs années. Les généralités du mécanisme d'action des aminoglycosides étaient connues²⁵ (comme nous le verrons ci-dessous), mais le manque d'informations structurales précises sur la cible biologique des aminoglycosides ne permettait pas de rationaliser des modifications structurelles susceptibles d'améliorer leurs propriétés biologiques.

1.4. Mode d'action antibiotique.

1.4.1. Effet sur la traduction de l'ARNm.

Grâce à des études biochimiques, on sait depuis plusieurs décennies que les aminoglycosides interfèrent avec le processus vital qu'est la biosynthèse protéique en se liant à la sous unité 30S du ribosome procaryote.^{25,26} La validité de ces études, qui ont permis de comprendre le mécanisme d'action des aminoglycosides, a été étayée par la détermination des structures rayon X de la sous unité 30S du ribosome procaryote, avec²⁷ et sans²⁸ antibiotique aminoglycosidique lié au site-A (Figure 1.6).



^a L'ARNr est gris, les protéines sont violettes, un fragment d'ARNt est jaune, un fragment d'ARNm est rouge et la paromomycine est verte.

Figure 1.6. Structure rayon X de la sous unité 30S du ribosome procaryote avec la paromomycine liée au site-A.^{a, 27}

Pour bien comprendre le mécanisme d'action des aminoglycosides, il est essentiel d'avoir une bonne compréhension du fonctionnement de la biosynthèse protéique. La biosynthèse des protéines se divise en deux processus, la traduction et la transcription.²⁹ La transcription consiste à la production d'ARNm à partir de l'ADN. Cette étape est suivie par la traduction, qui consiste à la synthèse de protéines à partir de l'ARNm. La traduction se divise à son tour en trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. L'initiation et la terminaison correspondent respectivement au début et à la fin de la synthèse d'une protéine dans la cellule. Lors de l'élongation, le ribosome se déplace de codon en codon sur l'ARNm et associe chaque codon à un ARNt lui correspondant, qui apporte le bon acide aminé au peptide en croissance. Chaque cycle d'élongation permet d'ajouter un acide aminé. Puisque les aminoglycosides affectent l'élongation lors de la traduction, il est nécessaire d'approfondir ce processus pour comprendre le mécanisme d'action de ces antibiotiques.

On peut distinguer sept étapes lors de l'élongation (Figure 1.7).³⁰ 1) La première est la liaison initiale (k_1) entre le ribosome et l'ARNt sous la forme d'un complexe tertiaire composé d'ARNt-aminoacylé (ARNt-aa), d'un facteur d'élongation (EF-Tu) et de la guanosine triphosphate (GTP). Ce complexe tertiaire a une plus grande affinité pour le ribosome que l'ARNt-aa seul et sa liaison initiale avec le ribosome est réversible. 2) Ensuite, il y a la reconnaissance du codon pendant laquelle le complexe tertiaire ARNt-aa·EF-Tu·GTP se place dans le site-AT du ribosome (k_2). Le départ, aussi réversible, de l'ARNt-désaminoacylé présent dans le site-E a lieu simultanément. C'est probablement après plusieurs allées et venues de complexes tertiaires ARNt-aa·EF-Tu·GTP dans le site-AT et d'ARNt-désaminoacylé dans le site-E, que la troisième étape est amorcée.³¹ 3) Lorsqu'un ARNt dont l'interaction codon-anticodon avec l'ARNm est parfaite se présente dans le site-AT du ribosome, l'activation réversible de EF-Tu (k_3), une GTPase, est provoquée. 4) L'activation de EF-Tu permet l'hydrolyse irréversible de la GTP en guanosine diphosphate (GDP) (k_4). 5) Le complexe EF-Tu·GDP quitte irréversiblement le ribosome et libère l'ARNt-aa (k_5). 6) À ce point, l'ARNt-aa peut être irréversiblement éjecté du ribosome (k_6) ou 7) L'ARNt-aa peut se positionner irréversiblement dans le site-AA du ribosome (k_7) et former alors le lien peptidique

(k_{pep}). Le passage de l'ARNt du site-AT au site-AA du ribosome est appelé l'accommodation de l'ARNt.

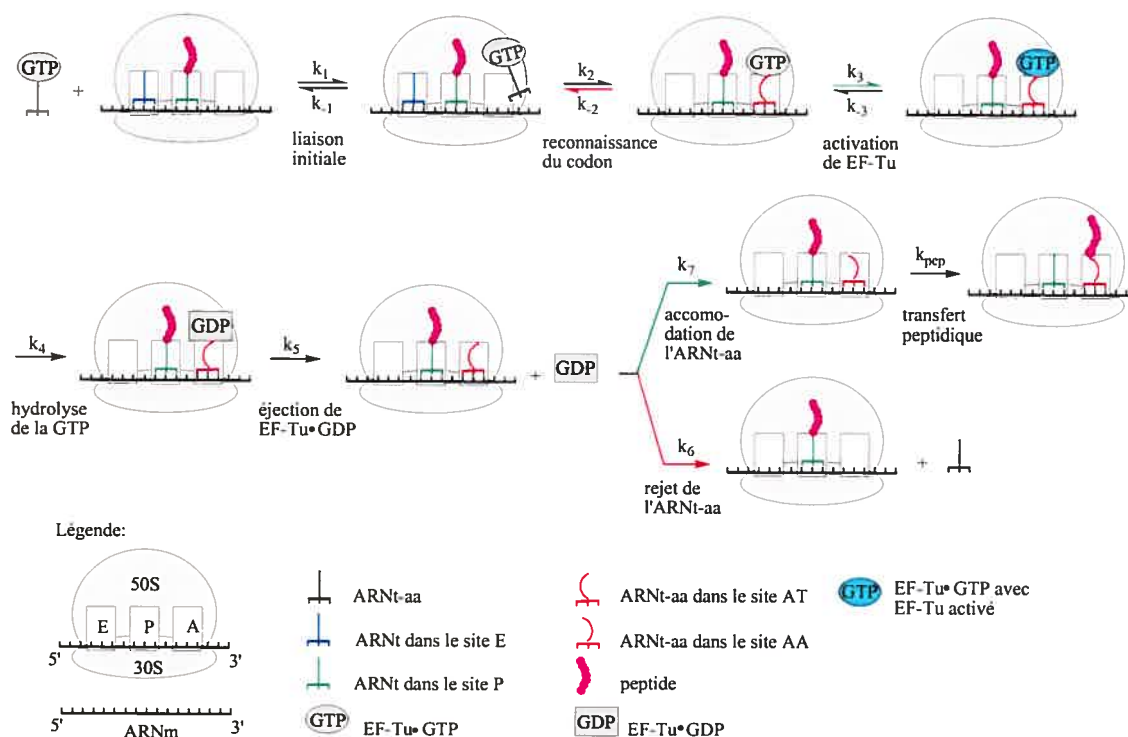


Figure 1.7. Les différentes étapes de l'élongation lors de la biosynthèse protéique.³⁰

Lors de l'élongation, le ribosome doit sélectionner les bons ARNt exclusivement afin qu'ils parviennent à l'étape de la formation du lien peptidique. En effet, le ribosome doit rejeter les mauvais ARNt, qui mèneraient à des protéines mal codées. La première étape de sélection des ARNt a lieu lors de l'activation de EF-Tu par le ribosome (Figure 1.7, flèche verte k_3) qui mène à l'hydrolyse de la GTP par EF-Tu. Si ce n'est pas le bon complexe tertiaire qui se présente, l'activation de EF-Tu est beaucoup moins favorable et le complexe tertiaire est éventuellement éjecté du site-AT (Figure 1.7, flèche rouge k_2). L'autre étape de sélection des ARNt a lieu lors de l'accommodation de l'ARNt-aa (Figure 1.7, flèche verte k_7) ou de son éjection irréversible du ribosome (Figure 1.7, flèche rouge k_6). Des études cinétiques ont précisé que c'est lors de ces deux étapes de sélection des ARNt que les aminoglycosides ont un impact (Tableau II).³²⁻³⁴

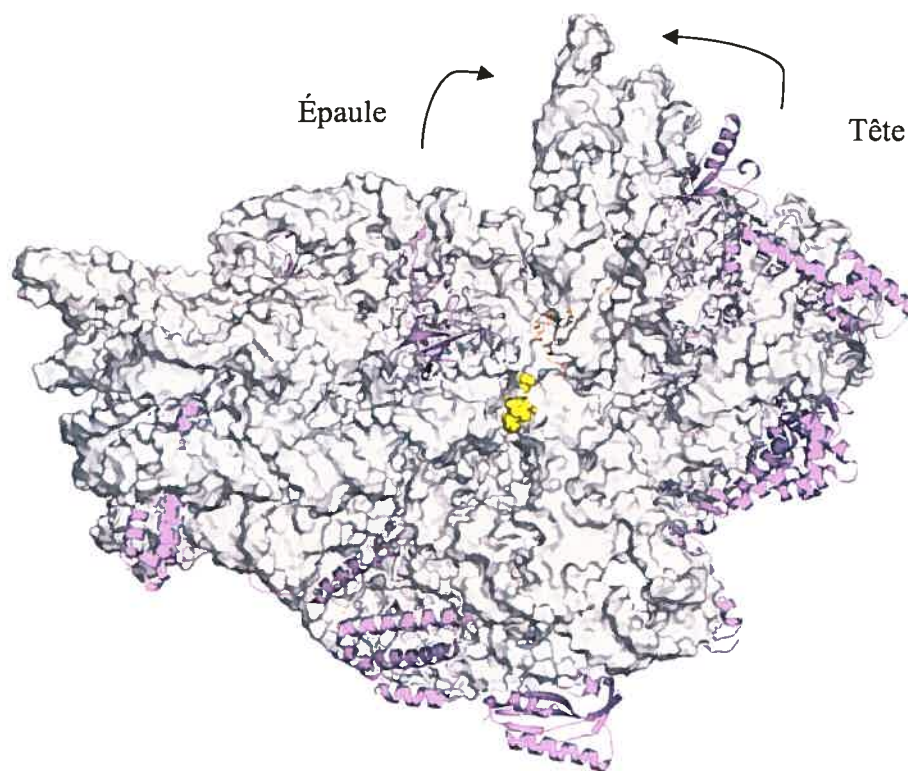
Étape		Constante de vitesse (s^{-1})		
		Codon-anticodon parfait	Codon-anticodon presque parfait	Codon-anticodon presque parfait + paromomycine
Activation de EF-Tu et hydrolyse de la GTP ^a	(k_3-k_4)	500 ± 100	50 ± 20	> 500
Accommodation des ARNt-aa et transfert peptidique ^a	(k_7-k_{pep})	7 ± 2	0.1 ± 0.03	1 ± 0.1
Rejet des ARNt-aa	(k_6)	< 0.3	6 ± 1	0.9 ± 0.2

^a Étapes combinées parce que la première est limitante et la deuxième est très rapide.

Tableau II. Constantes de vitesse pour les étapes de sélection des ARNt par le ribosome lors de l'élongation.³²⁻³⁴

Comme on peut s'en douter, le taux d'activation de EF-Tu (k_3) s'est avéré beaucoup plus élevé avec le bon complexe tertiaire ARNt-aa·EF-Tu·GTP qu'avec le mauvais (Tableau II).^{32,33} En présence de paromomycine, le taux d'activation de EF-Tu (k_3) d'un mauvais complexe tertiaire est accéléré au point qu'il devient aussi grand que lorsqu'un bon complexe tertiaire est présent, menant ainsi à la synthèse de protéines non fonctionnelles.³⁴ Lors de la deuxième étape de sélection des ARNt dans le ribosome, le taux d'accommodation (k_7) est évidemment plus élevé pour les bons ARNt-aa que les mauvais. Aussi, le taux du rejet des ARNt-aa (k_6) est plus élevé pour les mauvais que pour les bons.^{32,33} Le taux d'accommodation (k_7) des mauvais ARNt-aa est augmenté par la présence de paromomycine, alors que celui du rejet des mauvais ARNt-aa (k_6) est diminué.³⁴ Donc lorsque la paromomycine est liée au site-A du ribosome, tous ces facteurs contribuent à favoriser l'incorporation de mauvais acides aminés dans les protéines.

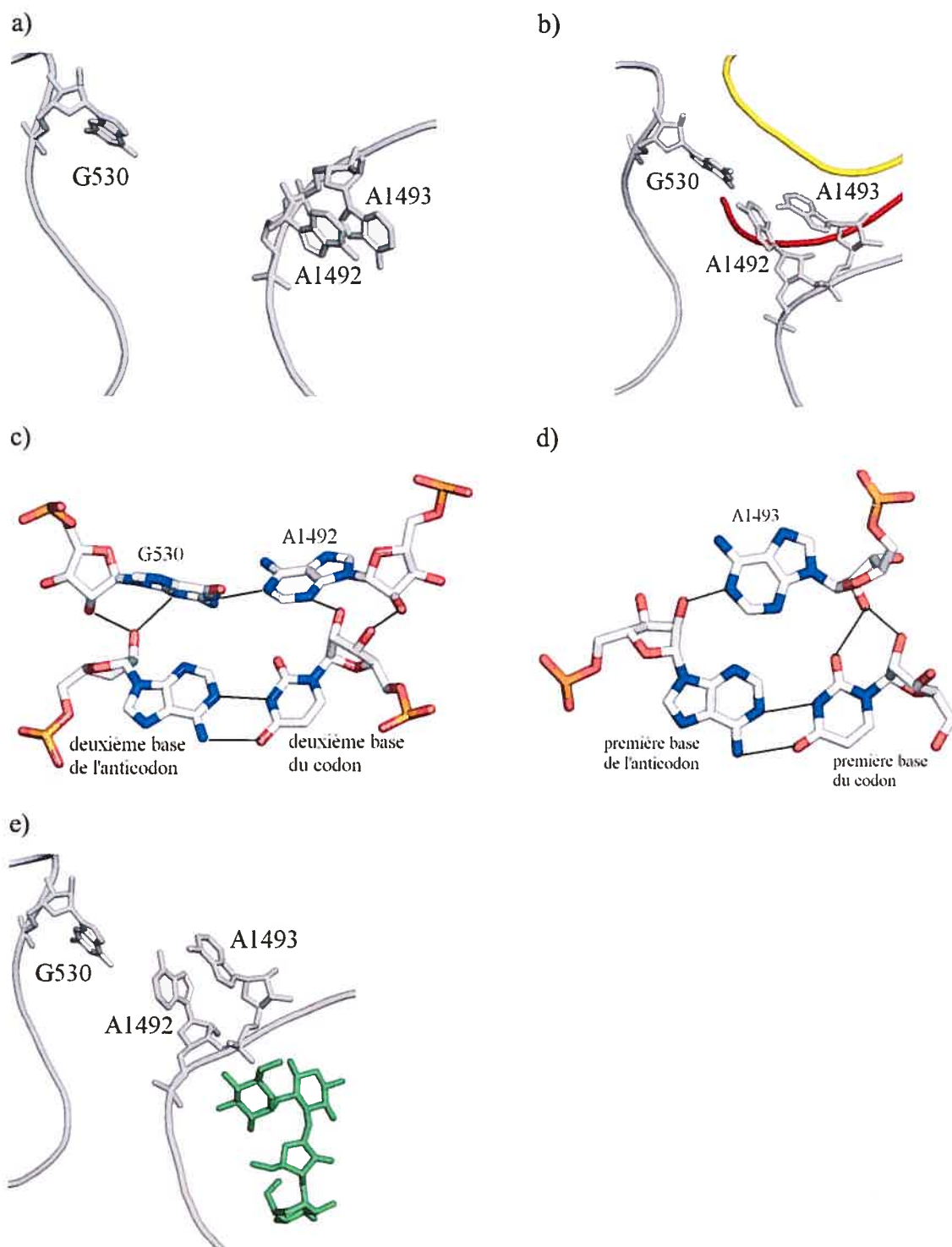
Les résultats obtenus par les études cinétiques énoncées ci-haut ont été rationalisés par la comparaison des trois structures rayon X de la sous unité 30S du ribosome suivantes : 1) celle contenant un fragment d'ARNm et un fragment d'ARNt dont l'interaction codon – anticodon est parfaite; 2) celle contenant un fragment d'ARNm et la paromomycine et 3) celle contenant un fragment d'ARNm et un fragment d'ARNt dont l'interaction codon – anticodon est presque parfaite.³⁵ Ogle *et al.* ont alors observé que le ribosome change de conformation en présence du bon ARNt ou de la paromomycine, ce qu'il ne fait pas en présence de mauvais ARNt. En effet, lorsque le bon ARNt ou la paromomycine sont présents, la tête et l'épaule du ribosome se rapprochent (Figure 1.8). Comme nous allons le voir, ce changement de conformation du ribosome serait responsable des deux étapes de sélection des bons ARNt, soit l'activation de EF-Tu (k_3 , Figure 1.7) et l'accommodation des l'ARNt-aa (k_7 , Figure 1.7).



^a L'ARNr est gris, les protéines sont violettes, la paromomycine est jaune. Les résidus de l'ARNr C1407, A1408, C1409 et G1410 ne sont pas montrés pour plus de clarté.

Figure 1.8. Changement de conformation du ribosome en présence du bon couple codon-anticodon ou de la paromomycine.³⁵

Le déplacement de quelques bases azotées dans le ribosome, dont G530, A1492 et A1493 (numérotation *E. coli*) accompagne le changement de conformation du ribosome (Figure 1.9). Lorsqu'il y a un ARNt dont l'interaction codon – anticodon n'est pas parfaite, les bases A1492 et A1493 sont à l'intérieur du sillon majeur de l'ARNr du site-A (Figure 1.9a). Par contre, en présence du bon couple ARNt-ARNm, A1492 et A1493 sortent du sillon majeur (Figure 1.9b). Ces bases du site-A, accompagnées de G530, forment un réseau de ponts hydrogène spécifiques avec certaines bases du codon de l'ARNm et de l'anticodon de l'ARNt (Figure 1.9c-d). Ce réseau de ponts hydrogène constituerait une sonde pour inspecter le couple codon-anticodon.^{30,35,36} Or, il a été observé que la paromomycine, un aminoglycoside typique, expulse les bases azotées A1492 et A1493 du sillon majeur, comme si le bon ARNt était présent (Figure 1.9e). Ainsi, l'expulsion de A1492 et de A1493 par la paromomycine, qui prend leur place, accompagne un changement de conformation du ribosome semblable à celui observé lorsqu'un bon anticodon est présent.^{30,35,36}



^a L'ARNr est gris, le fragment d'ARNt est jaune, le fragment d'ARNm est rouge et la paromomycine est verte.

Figure 1.9. Déplacement de certaines bases azotées de l'ARNr du site-A lors de la sélection des bons ARNt.^{a,30,25,36}

Le ribosome peut donc être considéré comme un interrupteur moléculaire : dans sa conformation fermée, il provoque l'activation de EF-Tu et facilite l'accommodation des ARNt-aa alors que dans sa conformation ouverte, il rejette les complexes tertiaires ARNt-aa·EF-Tu·GTP ainsi que les ARNt-aa. Les aminoglycosides, comme la paromomycine, se lient au ribosome et le figent en conformation fermée. Le ribosome peut alors accepter des mauvais ARNt et la synthèse de protéines mal codées s'ensuit, provoquant la mort de la cellule.^{30,36}

1.4.2. Liaison avec le site-A du ribosome procaryote.

Suite à la détermination de la structure cristalline de la paromomycine dans la sous unité 30S du ribosome (Figure 1.6),²⁷ des co-cristallisations d'aminoglycosides dans un oligonucléotide ont permis d'obtenir des structures rayon X de plusieurs de ces antibiotiques dans un modèle du site-A. Cette approche est beaucoup plus simple expérimentalement que la cristallisation de la sous unité 30S du ribosome et a ouvert la voie à l'obtention rapide de structures rayon X d'analogues semi-synthétiques.³⁷ Ces structures rayon X ont complété les résultats préalablement obtenus visant à comprendre la structure de complexes aminoglycosides-ARN par des méthodes biochimiques³⁸ et spectroscopiques³⁹ ainsi qu'en spectrométrie de masse⁴⁰ et résonance magnétique.⁴¹

La structure obtenue par diffraction des rayons X d'un complexe paromomycine – modèle du site-A (Figure 1.10),^{37e} révèle que la paromomycine maintient A1492 et A1493 à l'extérieur du sillon majeur de l'ARN. En absence d'aminoglycoside, il a été déterminé que la position des bases A1492 et A1493 est à l'équilibre entre à l'intérieur et à l'extérieur du sillon majeur. En se liant dans le site-A, les aminoglycosides prennent la place de ces bases et leur position extérieure est favorisée.⁴² Comme nous le verrons ultérieurement, le fait que les aminoglycosides favorisent la position extérieure pour A1492 et A1493 est à l'origine de leur activité antibiotique, mais voyons d'abord les éléments qui stabilisent la liaison des aminoglycosides dans le site-A.

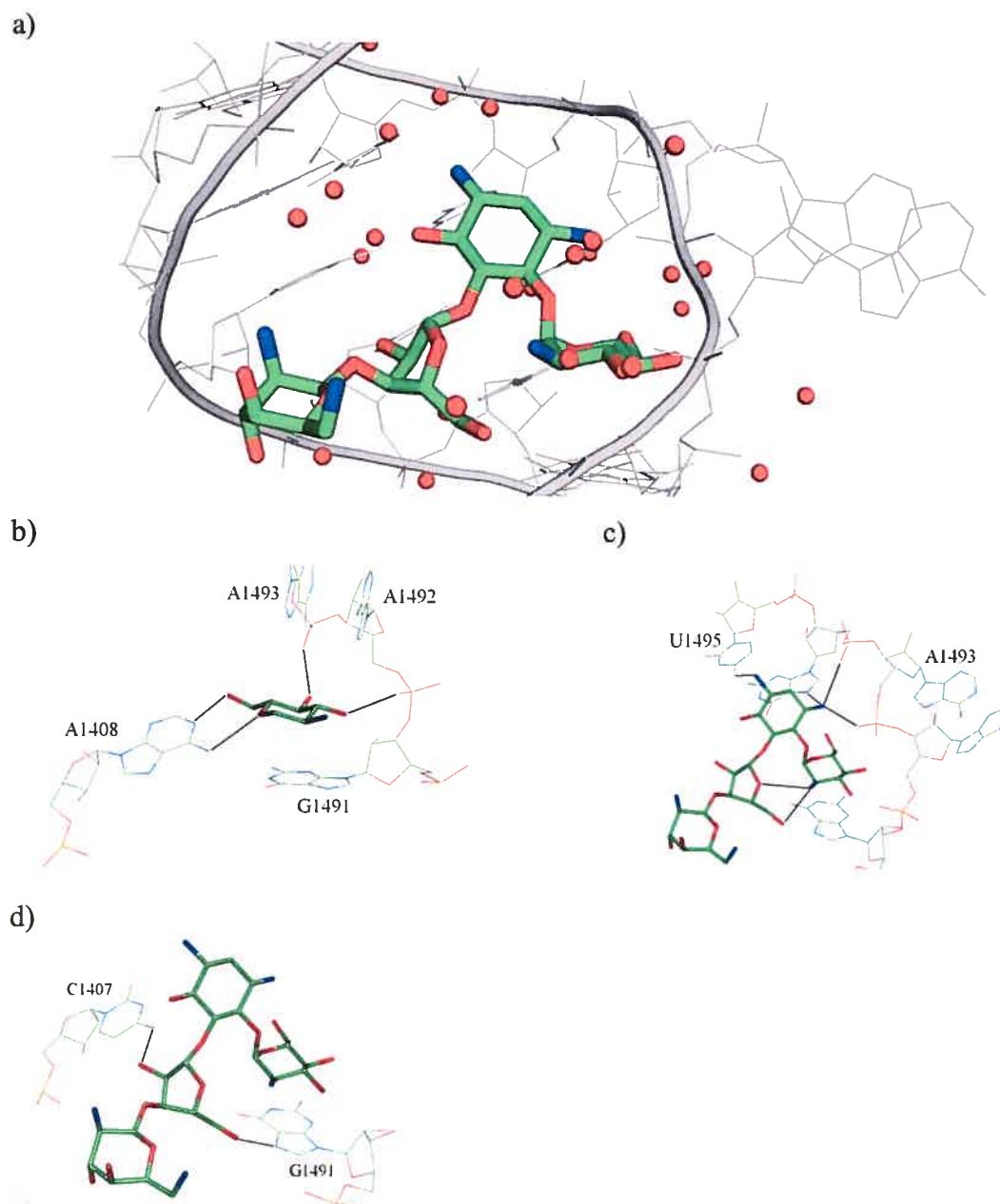


Figure 1.10. a) Structure rayon X de la paromomycine dans un modèle du site-A;^{37e} b) Contacts directs entre le cycle I et l'ARN; c) Contact directs entre le cycle II et l'ARN ainsi que ponts hydrogène intramoléculaire entre cycle I et III de la paromomycine; d) Contacts directs entre le cycle III et l'ARN.

Tout en expulsant A1492 et A1493, le cycle I de la paromomycine est empilé sur G1491 et fait une paire pseudo Watson-Crick avec A1408 (Figure 1.10b). De plus, le groupement ammonium N2' du cycle I est lié au cycle III par deux ponts hydrogène, un avec O4'' et l'autre avec O5'' (Figure 1.10c). Ces ponts hydrogène intramoléculaires stabilisent probablement la conformation bioactive de la paromomycine. La structure rayon X révèle qu'il y a 13 contacts directs entre l'ARN et l'aminoglycoside ainsi que 12 contacts entretenus par des molécules d'eau (Tableau III). Les contacts directs sont des ponts hydrogène ou des interactions électrostatiques entre les groupements ammonium de l'aminoglycoside et des phosphates de l'ARN. Les cycles I et II sont responsables de plus de 75% des interactions directes et indirectes avec l'ARN. En plus des ponts hydrogène intramoléculaires qu'il fait avec le cycle I, le cycle III relie les deux chaînes d'ARN ensemble. O2'' accepte un pont hydrogène du N4 de C1407 et l'hydrogène de O5'' pointe vers N7 de G1491 (Figure 1.10d). Le cycle IV participe peu aux interactions entre la paromomycine et l'ARN, mais il contribue tout de même à l'affinité globale de la paromomycine pour le site-A en faisant quelques interactions avec les bases azotées qui s'y trouvent.

a)		b)	
Paromomycine	ARN	Paromomycine	ARN
O3'	O2P(A1492)	N2'	O2P(A1492)
O4'	O2P(A1493)	N2'	O1P(A1493)
O5'	N6(A1408)	O3'	O2P(A1492)
O6'	N1(A1408)	O6'	O2P(A1493)
N1	O4(U1495)	N1	O6(G1405)
N3	O1P(A1493)	N1	O4(U1490)
N3	N7(G1494)	O6	O4(U1406)
N3	O2P(G1494)	O6	O4(U1495)
C4	O6(G1494)	O6	O6(G1405)
O2''	N4(C1407)	O6	O6(G1407)
O5''	N7(G1491)	C2''	N6(A1408)
N2'''	O2P(G1405)	O3'''	N4(C1496)
O4'''	O1P(G1405)		

Tableau III. Contacts entre la paromomycine et l'ARNr du site-A. a) contacts directs; b) contacts pontés par des molécules d'eau.^{37e}

1.5. Toxicité et résistance bactérienne des aminoglycosides.

1.5.1. Toxicité des aminoglycosides.

Les antibiotiques aminoglycosidiques sont des molécules polaires qui ont de la difficulté à traverser les membranes biologiques. Leurs concentrations dans la plupart des tissus sont donc relativement basses. Cependant, ils sont captés par les cellules épithéliales des tubules rénales. Leur accumulation est telle qu'on peut retrouver jusqu'à 10% de la dose administrée dans les reins, ce qui peut les endommager.⁴⁴ Heureusement, ces dommages sont souvent réversibles et un contrôle de la dose ainsi que de la fréquence d'administration de l'antibiotique évite la majorité des complications rénales.⁴⁴ Les problèmes associés à l'ototoxicité (toxicité au niveau des oreilles), quant à eux, sont malheureusement irréversibles. Ils sont généralement reliés à des prédispositions génétiques ou à un dosage trop élevé.⁴⁵ Une mutation dans l'ARNr mitochondriale 12S est présente chez le tiers des patients ayant soufferts d'ototoxicité associée aux aminoglycosides. Il est cependant possible d'identifier les personnes à risques, ce qui leur permet d'opter pour un traitement plus approprié.⁴⁶ Puisque les aminoglycosides sont surtout utilisés dans un environnement clinique, le contrôle du dosage et de la fréquence d'administration permet de minimiser les effets indésirables reliés à leur oto- et néphrotoxicités. Leur utilisation est plutôt menacée par l'émergence de souches résistantes.

1.5.2. Résistance bactérienne aux aminoglycosides.

La remarquable capacité d'adaptation des bactéries fait en sorte que la plupart des antibiotiques utilisés dans un environnement clinique sont affectés par l'émergence de souches résistantes.⁴⁷ Cette problématique majeure draine une grande partie de l'énergie qui est investie par la communauté scientifique œuvrant dans le domaine de la santé. La structure de certaines familles d'antibiotiques a donc évolué de façon remarquable grâce aux efforts des scientifiques qui ont réussi à contrecarrer les moyens déployés par les bactéries pour développer de la résistance. Par exemple, les antibiotiques de la famille des β -lactames ont beaucoup 'évolué' depuis l'observation de la première souche résistante à la pénicilline.^{17,48} Par contre, la structure des aminoglycosides n'a été que légèrement modifiée depuis le début de leur utilisation clinique. Peu, sinon aucun, des nouveaux aminoglycosides semi-synthétiques ont trouvé d'utilisation clinique depuis la

préparation de quelques analogues désoxygénés aux positions 3'-OH et 4'-OH ainsi que substitués à la position 1-NH₂ entre 1970 et 1975 (voir section 1.3). Ainsi, avec le temps, la plus importante menace pour l'utilisation clinique des aminoglycosides est devenue la résistance bactérienne.⁴⁹ Deux catégories de facteurs sont responsables de la résistance aux aminoglycosides. La première, qui est la moins importante pour le moment, est la diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique. Cependant, la plus importante catégorie de facteurs responsables de la résistance aux aminoglycosides est la modification de l'antibiotique ou de sa cible biologique.

1.5.2.1. Diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique.

Même si le mécanisme de la pénétration des aminoglycosides dans les cellules procaryotes demeure partiellement obscur, on sait qu'ils adhèrent d'abord aux lipopolysaccharides à la surface des cellules par interactions électrostatiques.⁵⁰ La présence limitée de ces lipopolysaccharides chargés négativement à la surface des souches Gram-positives est probablement une des causes de l'efficacité réduite des antibiotiques contre ces bactéries. Après avoir adhéré à la surface de la cellule, la pénétration cellulaire serait dépendante du potentiel transmembranaire généré par la respiration et c'est pour cette raison que les bactéries anaérobiques ne seraient pas vulnérables aux aminoglycosides.^{50,51} Le potentiel transmembranaire est généré par les pompes à protons qui expulsent les protons (produits par les réactions d'oxydation du cycle respiratoire) à l'extérieur de la cellule laissant l'intérieur déficient en charge positive.²⁹ Certaines souches de bactéries comportant des mutations reliées à leur activité respiratoire sont donc résistantes aux aminoglycosides.⁵⁰ La concentration intracellulaire des aminoglycosides peut aussi être diminuée par les pompes à efflux, incluant des membres de chacune des cinq superfamilles des transporteurs bactériens.⁵² Toutefois, la résistance aux aminoglycosides provoquée par la diminution de la concentration intracellulaire n'a pas encore d'impact majeur sur l'utilisation clinique de ces antibiotiques si on la compare avec la résistance induite par la modification de l'antibiotique.

1.5.2.2. Modification de l'antibiotique ou de sa cible biologique.

La résistance aux aminoglycosides peut être provoquée par la modification de sa cible biologique, le ribosome procaryote. Des gènes codant pour des ARN méthylases ont été isolés de certaines souches résistantes. Ces enzymes peuvent méthyler certaines bases azotées de l'ARNr qui sont importantes pour la liaison des aminoglycosides dans le site-A.⁵³ Par exemple, une méthylation de N7 de G1405, qui acquière alors une charge positive, induit de la résistance face à la tobramycine par la répulsion des charges positives des groupements ammonium de G1405 et celui en N2' de la tobramycine.^{54,55} L'affinité de la tobramycine pour le site-A s'en trouve alors diminuée ce qui affecte son activité antibactérienne. Aussi, la mutation de l'ARNr a été observée pour certaines souches résistantes de *M. tuberculosis*.⁵⁶ Quoique la modification du ribosome puisse dramatiquement affecter l'efficacité des aminoglycosides, elle n'est pas très répandue pour l'instant, contrairement à la modification de l'antibiotique par des enzymes désactivantes.

L'altération de la structure des antibiotiques aminoglycosidiques par des enzymes désactivantes est, de loin, la principale cause des problèmes reliés à la résistance bactérienne aux aminoglycosides.^{19,47,49,57} Il existe trois familles de ce type d'enzymes, les aminoglycosides nucléotidyltransférases (ANTs), les aminoglycosides acétyltransférases (AACs) et les aminoglycosides phosphotransférases (APHs). Elles *O*-adénylent, *N*- ou *O*-acétylent et *O*-phosphorylent l'aminoglycoside dont l'affinité pour le site-A s'en trouve ruinée (Figure 1.11). La majorité des gènes codants pour ces enzymes désactivantes sont sur des éléments génétiques mobiles incluant des plasmides, des transposons et des intégrons, ce qui permet leur inquiétante dissémination.^{19,49,57}

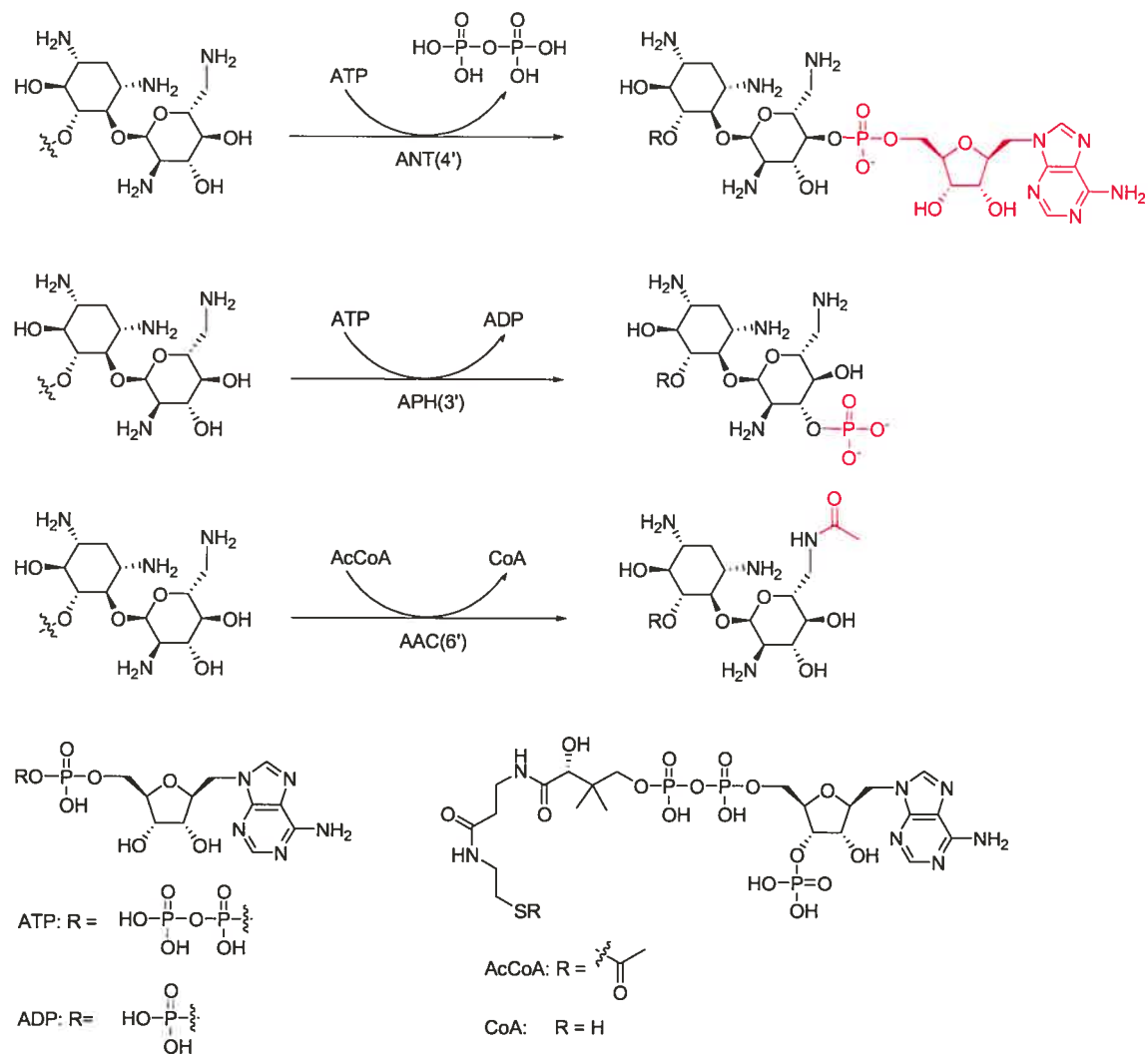
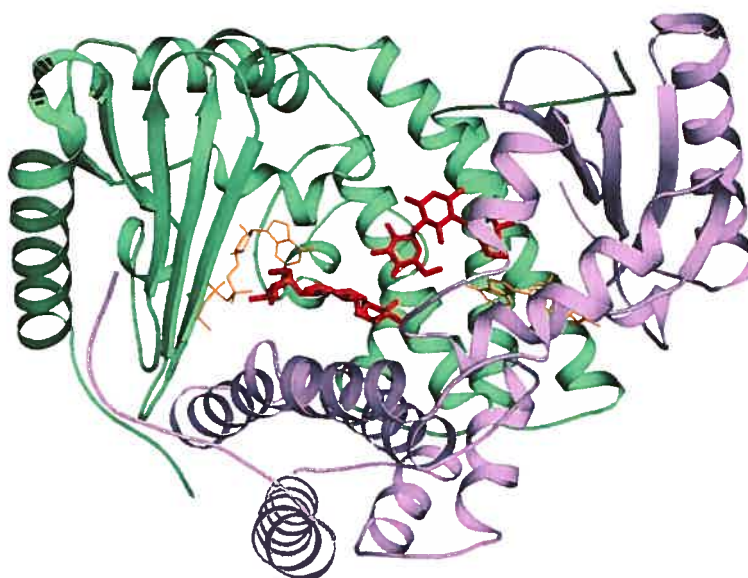


Figure 1.11. Modification d'aminoglycosides par des enzymes désactivantes.⁴⁹

Puisqu'il y a plusieurs ANTs, AACs et APHs, une nomenclature spécifique existe pour identifier chaque enzyme.⁵⁷ Le type d'enzyme est suivi de la position de l'aminoglycoside qu'elle modifie entre parenthèse, du profil de résistance qu'elle confère en chiffre romain précédé d'un trait d'union, puis d'une lettre minuscule pour identifier le gène qui la code. Par exemple, l'APH(3')-Ia phosphoryle l'aminoglycoside à la position 3' et procure le même profil de résistance que les enzymes APH(3')-Ib et APH(3')-Ic, bien que ces enzymes proviennent toutes de gènes différents.

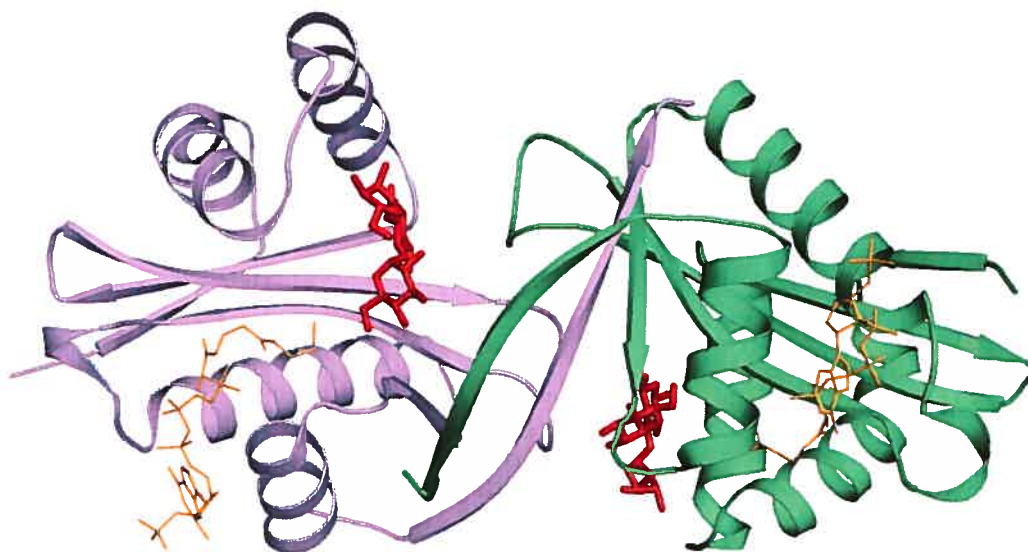
Il y a une dizaine d'ANTs, mais l'ANT(2'') et ANT(4') ont été étudiés d'avantage, car elles sont les plus importantes cliniquement. Le mécanisme de l'ANT(2'')-I est séquentiel, l'ATP se lie à l'enzyme avant l'aminoglycoside et le phosphate inorganique quitte l'enzyme en premier.⁵⁸ Une structure rayon X d'une ANT(4')-Ia a été publiée en 1993,⁵⁹ suivi en 1995 de celle du complexe tertiaire formé de l'enzyme, de la kanamycine A et d'un analogue de l'ATP (Figure 1.12).⁶⁰



^a Les monomères de l'enzyme sont en vert et violet, les ATP en orange et les kanamycines en rouge.

Figure 1.12. Structure rayon X du dimère des complexes tertiaires formés de l'ANT(4')-Ia, de la kanamycine et d'un analogue de l'ATP.^{a,60}

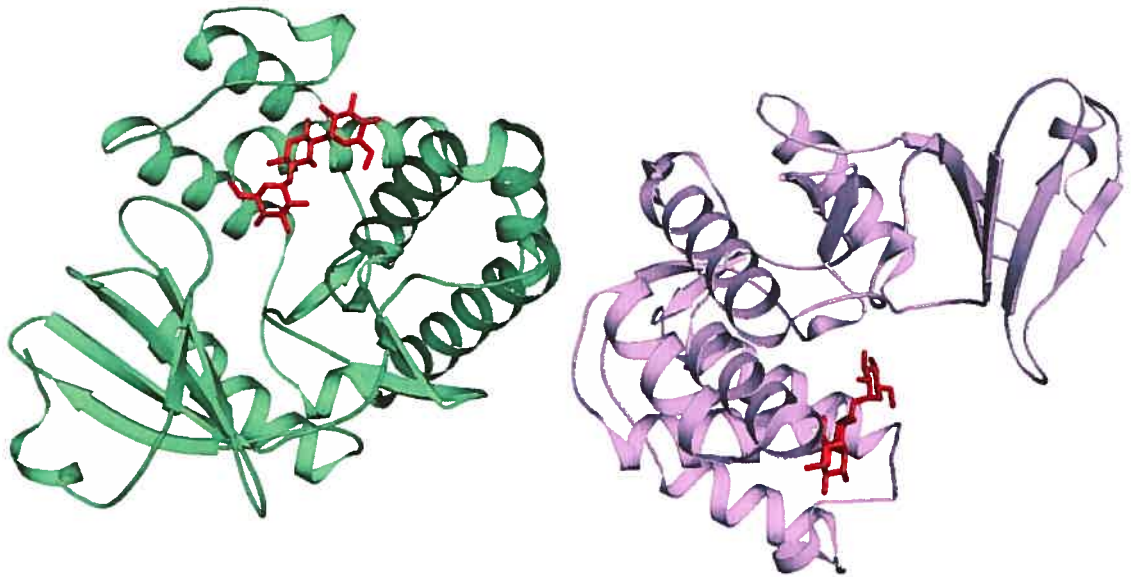
Plus d'une cinquantaine d'AACs sont connues. L'importance clinique des AAC(2'), AAC(3) et AAC(6') fait qu'elles ont été étudiées davantage. Le mécanisme de l'AAC(2')-Ic est séquentiel, l'AcCoA se lie à l'enzyme en premier, suivi de l'antibiotique. Par la suite, l'aminoglycoside acétylé quitte avant le CoA.⁶¹ Des structures rayons X de l'AAC(2')-Ic libre ou complexée avec CoA et une kanamycine, la ribostamycine ou la tobramycine sont disponibles.⁶² Le mécanisme de AAC(3)-I est séquentiel mais varie selon l'affinité de l'aminoglycoside.⁶³ Une structure tridimensionnelle du complexe de l'AAC(3)-Ia avec CoA, mais sans aminoglycoside, a été obtenue en 1998.⁶⁴ Le mécanisme de AAC(6')-Ii est aussi séquentiel : l'AcCoA se lie en premier et le CoA quitte l'enzyme en dernier.⁶⁵ Des structures rayon X de AAC(6')-Ii avec le substrat⁶⁶ ou le produit⁶⁷ de l'acétylation sont disponibles. Également, une structure du complexe tertiaire formé de AAC(6')-Iy, du CoA et de la ribostamycine a été obtenue (Figure 1.13).⁶⁸ La structure de l'AAC(6')-Iy liée à un inhibiteur de type bisubstrat a été obtenue récemment.⁶⁹



^a Les monomères de l'enzyme sont en vert et violet, les CoA en orange et les ribostamycines en rouge.

Figure 1.13. Structure rayon X du dimère des complexes tertiaires formés de AAC(6')-Iy, de CoA et de ribostamycine.^{a,68}

La famille des APHs est constituée de plusieurs enzymes dont certaines ont une implication clinique majeure dans la résistance aux aminoglycosides. Les APH(3') sont, de loin, les plus importantes cliniquement. L'APH(3')-IIIa a été isolée en 1994,⁷⁰ et à été l'objet de nombreuses études biochimiques et structurales.⁷¹⁻⁷³ Puisqu'une partie de mes travaux concerne l'APH(3')-IIIa, elle sera décrite avec plus de précisions dans un chapitre ultérieur. Toutefois, pour compléter ce chapitre en soulignant qu'au moins une structure rayon X d'enzyme désactivante de chacune des trois catégories existante est disponible, une structure du complexe formé de l'APH(3')-IIa et de la kanamycine A est montrée à la Figure 1.14.⁷⁴



^a Les monomères de l'enzyme sont en vert et violet, les kanamycines sont en rouge.

Figure 1.14. Structure rayon X du dimère des complexes formés de l'APH(3')-IIa et de la kanamycine A.^{a,74}

Enfin, une enzyme désactivante bifonctionnelle, l' AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia, est d'une grande importance clinique vu son aptitude à modifier la plupart des aminoglycosides.⁷⁵ En effet, la plupart des aminoglycosides possèdent soit un groupement 6'-NH₂ ou 2''-OH. Par surcroît, elle peut même acétyler une fonction hydroxyle en position 6',⁷⁶ ce qui ajoute les aminoglycosides qui possèdent une fonction 6'-OH à la liste, déjà longue, des aminoglycosides ciblés par cette enzyme. D'autres enzymes bifonctionnelles ont aussi été isolées telles que l' ANT(3')-Ii/AAC(6')-IId,⁷⁷ l' AAC(3)-Ib/AAC(6')-Ib',⁷⁸ et l' AAC(6')-30/AAC(6')-Ib'.⁷⁹

La désactivation des aminoglycosides par certaines enzymes est la principale limitation pour l'utilisation de ces puissants antibiotiques. L'isolation de plus en plus fréquente de bactéries résistantes à plusieurs antibiotiques est inquiétante et encourage la préparation de nouveaux agents antibactériens ou l'optimisation de ceux qui existent déjà. Le développement d'inhibiteurs de ces enzymes est aussi une avenue prometteuse pour contrer la résistance bactérienne. La connaissance du mécanisme d'action détaillé des aminoglycosides ainsi que la compréhension de plusieurs enzymes qui les désactivent font de ces antibiotiques des candidats idéaux pour tenter leur optimisation.

1.6. Résumé des objectifs des travaux décrits dans cette thèse.

Deux aminoglycosides ont été retenus pour les travaux décrits dans cette thèse, soit la paromomycine (1.3) et la sisomicine (1.16). Les objectifs reliés à la modification de la paromomycine ont évolués tout au long de nos recherches d'une manière qui n'était pas prévue initialement et c'est la raison pour laquelle les analogues de la paromomycine sont étudiés aux Chapitres 2, 3 et 4 sous des aspects complètement différents. La paromomycine a été retenue parce qu'une bonne connaissance de sa réactivité était disponible à l'intérieur de notre groupe de recherche, qu'elle possède une excellente force de liaison avec le site-A du ribosome procaryote et que sa toxicité est moindre que celle de la néomycine B (1.4).

L'objectif initial, traité au Chapitre 2, décrit l'obtention d'aminoglycosides hydrides qui sont préparés en fonctionnalisant les groupements O6 et O2'' de la paromomycine, un aminoglycoside de la classe A, afin d'atteindre l'espace normalement occupé dans le ribosome procaryote par le cycle III de la tobramycine (1.15), un aminoglycoside de la classe B. Les activités antibactériennes intéressantes mesurées par Isis Pharmaceuticals contre certaines souches de bactéries résistantes nous ont poussés à étudier l'origine du potentiel antibiotique de certains aminoglycosides semi-synthétiques que nous avons préparés. Aussi, les recherches qui nous ont permis de modifier sélectivement la position O6 ou O2'' de la paromomycine nous ont également permis d'envisager de fonctionnaliser ses positions O3', O5'' et N6'''.

Le Chapitre 3 décrit l'exploration de l'enzyme désactivante APH(3')-IIIa à l'aide d'une variété d'analogues de la paromomycine fonctionnalisés à la position O6, O3', O2'', O5'' ou N6''' ainsi que d'analogues de la paromomycine macrocyclique spécialement conçus pour pouvoir résister à cette enzyme nuisible, préparés en reliant ses positions O6 et N6'''. À notre grande satisfaction, la phosphorylation des analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O2'' ou O5'' s'est avérée très lente, voire inexistante en présence de l'APH(3')-IIIa. La lenteur de la phosphorylation de ces analogues nous a mené à vérifier leur potentiel inhibiteur au et ces travaux sont décrits au Chapitre 4.

Le Chapitre 5 ne fait pas parti du même projet de recherche que les Chapitres 2,3 et 4. Ce chapitre décrit, d'une part, le développement d'une voie synthétique qui permet d'obtenir les verdamicines C2 et C2a individuellement à partir de la sisomicine (1.16) et, d'autre part, la fonctionnalisation des positions C6' et/ou N6' de la sisomicine pour évaluer l'impact de ces modifications sur les activités antibactériennes. Pour atteindre ces objectifs, une nouvelle séquence réactionnelle a été mise au point pour transformer un azoture allylique en aldéhyde α,β -insaturé, et ce en une étape.

Il est important de noter que ces recherches ont nécessité la participation de plusieurs collaborateurs que je remercie sincèrement. Ils ont tous amené leur précieuse expertise sans laquelle certains aspects de nos travaux n'auraient pu être complétés. Les activités antibactériennes des composés préparés ont été déterminées par les compagnies Isis Pharmaceuticals et Achaogen. Les structures rayon X ont été déterminées par le groupe du professeur Westhof. L'expression de l'enzyme APH(3')-IIIa a été réalisée avec l'aide de la Dre Natalhie Beatriz Campos-Reales alors que les expériences reliées à l'enzyme l'APH(3')-IIIa ont été réalisées avec la collaboration du professeur Jeffrey W. Keillor.

1.7. Références pour le Chapitre 1.

- 1) Fleming, A. The Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, With Special Reference to Their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* **1929**, *10*, 226-236.
- 2) Waksman, S. A.; Bugie, E.; Schatz, A. Isolation of Antibiotic Substances From Soil Micro-Organisms, With Special Reference to Streptothricin and Streptomycin. *Proc. Staff Meetings Mayo Clinic* **1944**, *19*, 537-548.
- 3) Waksman, S. A.; Lechevalier, H. A.; Harris, D. A. Neomycin Production and Antibiotic Properties. *J. Clin. Invest.* **1949**, *28*, 934-939.
- 4) Umezawa, H.; Ueda, M.; Maeda, K.; Yagishita, K.; Kondo, S.; Okami, Y.; Utahara, R.; Osato, Y.; Nitta, K.; Takeuchi, T. Production and Isolation of a New Antibiotic, Kanamycin. *J. Antibiot.* **1957**, *10A*, 181-188.
- 5) Frohardt, R. P.; Haskell, T. H.; Ehrlich, J.; Knudsen, M. P. Paromomycin. **1958**, German patent DE1025573, CAN 54:58641.
- 6) Weinstein, M. J.; Luedemann, G. M.; Oden, E. M.; Wagman, G. H. Gentamicin, a New Broad-Spectrum Antibiotic Complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1963**, *161*, 1-7.
- 7) Stark, W. M.; Hoehn, M. M.; Knox N. G. Nebramycin, a new broad-spectrum antibiotic complex. I. Detection and Biosynthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1967**, *7*, 314-323.
- 8) Woo, P. W. K.; Dion, H. W.; Bartz, Q. R. Butirosins A and B, Aminoglycoside Antibiotics. I. Structural Units. *Tetrahedron Lett.* **1971**, *28*, 2617-2620.

- 9) Shomura, T.; Ezaki, N.; Tsuruoka, T.; Niwa, T.; Akita, E.; Niida, T. Antibiotic SF-733, a New Antibiotic. I. Taxonomy, Isolation, and Characterization. *J. Antibiot.* **1970**, *23*, 155-161.
- 10) Weinstein, M. J.; Marquez, J. A.; Testa, R. T.; Wagman, G. H.; Oden, E. M.; Waitz, J. A. Antibiotic 6640 [sisomicin], a New Micromonospora-Produced Aminoglycoside Antibiotic. *J. Antibiot.* **1970**, *23*, 551-554.
- 11) Munakata, K.; Oda, T.; Mori, T.; Ito, H. Production of Antibiotic No. 2230, Japanese Patent No. 45005035, 6 pp. **1970**, CAN 72:131094.
- 12) Nara, T.; Yamamoto, M.; Kawamoto, I.; Takayama, K.; Okachi, R.; Takasawa, S.; Sato, T.; Sato, S. Fortimicins A and B, New Aminoglycoside Antibiotics. I. Producing Organism, Fermentation and Biological Properties of Fortimicins. *J. Antibiot.* **1977**, *30*, 533-540.
- 13) Mason, D. J.; Dietz, A.; Smith, R. M. Actinospectacin, a New Antibiotic. I. Discovery and Biological Properties. *Antibiot. Chemother.* **1961**, *11*, 118-122.
- 14) Thompson, R. Q.; Presti, E. A. Nebramycin, a New Broad-Spectrum Antibiotic Complex. 3. Isolation and Chemical-Physical Properties. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1967**, *7*, 332-340.
- 15) Mann, R. L.; Bromer, W. W. Isolation of a Second Antibiotic from *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 2714-2716.
- 16) Nara, T.; Yamamoto, M.; Takasawa, S.; Sato, S.; Sato, T. A new aminoglycoside antibiotic complex-the seldomycins. I. Taxonomy, Fermentation and Antibacterial Properties. *J. Antibiot.* **1977**, *30*, 17-24.

- 17) *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*. Walsh, C. ASM Press, Washington D. C. **2003**.
- 18) (a) Miller, M. H.; Feinstein, S. A.; Chow, R. T. Early Effects of 1-Lactams on Aminoglycoside Uptake, Bactericidal Rates, and Turbidimetrically Measured Growth Inhibition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1987**, *31*, 108-110. (b) Plotz, P. H., Davis, B. D. Synergism Between Streptomycin and Penicillin: a Proposed Mechanism. *Science*, **1962**, *135*, 1067-1068.
- 19) *Antimicrobial Agents: Antibacterials and Antifungals*. Bryskier, A. ASM Press, Washington D. C. **2005**.
- 20) Umezawa, H.; Umezawa, S.; Tsuchiya, T.; Okazaki, Y. 3',4'-Dideoxykanamycin B Active Against Kanamycin-Resistant *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antibiot.* **1971**, *24*, 485-487.
- 21) Kawaguchi, H.; Naito, T.; Nakagawa, S.; Fujisawa, K. BB-K 8, a New Semisynthetic Aminoglycoside Antibiotic. *J. Antibiot.* **1972**, *25*, 695-708.
- 22) Kondo, S.; Iinuma, K.; Yamamoto, H.; Ikeda, Y.; Maeda, K.; Umezawa, H. Syntheses of S-4-amino-2-hydroxybutyryl Derivatives of 3',4'-dideoxykanamycin B and their Antibacterial Activities. *J. Antibiot.* **1973**, *26*, 705-707.
- 23) Weinstein, M. J.; Daniels, P. J. L.; Wagman, G. H.; Testa, R.; Mallams, A. K.; Wright, J. J.; Nagabhushan, T. L. Pseudotrisaccharides and Their Use as Bactericides. German Patent DE 2437160, 186 pp. **1975**, CAN 85:33363.
- 24) Wright, J. J.; Daniels, P. J. L. Diaminocyclitol Derivatives. German Patent DE 2502296, 86 pp. **1975**, CAN 84:44610.

- 25) Moazed, D.; Noller, H. F. Interaction of Antibiotics with Functional Sites in 16S Ribosomal RNA. *Nature* **1987**, *327*, 389-394.
- 26) (a) Noller, H. F. RNA structure: Reading the Ribosome. *Science*, **2005**, *309*, 1508-1514; (b) Woodcock, J.; Moazed, D.; Cannon, M.; Davies, J.; Noller, H. F. Interaction of Antibiotics with A- and P-Site-Specific Bases in 16S Ribosomal RNA. *EMBO J.* **1991**, *10*, 3099-3103; (c) Gale, E. F.; Cundliffe, E.; Reynolds, P. E.; Richmond, M. H.; Waring, M. J. *The Molecular Basis of Antibiotic Action* Wiley, London, **1981**.
- 27) Carter, A. P.; Clemons, W. M.; Bordersen, D. E.; Morgan-Warren, R. J.; Wimberly, B. T.; Ramakrishnan, V. Functional Insights from the Structure of the 30S Ribosomal Subunit and its Interactions with Antibiotics. *Nature* **2000**, *407*, 340-348.
- 28) Wimberly, B. T.; Brodersen, D. E.; Clemons, J. W. M.; Morgan-Warren, R. J.; Caster, A. P.; Vornrhein, C.; Hartsek, T.; Ramakrishnan, V. Structure of the 30S Ribosomal Subunit. *Nature* **2000**, *407*, 327-339.
- 29) Voet, D.; Voet, J. G. *Biochimie*; 2^e édition, John Willey and Sons Inc.; New York, **1998**.
- 30) Ogle, J. M.; Ramakrishnan, V. Structural Insights into Translational Fidelity. *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 129-77.
- 31) Ninio, J. Multiple Stages in Codon–Anticodon Recognition: Double-Trigger Mechanisms and Geometric Constraints. *Biochimie* **2006**, *88*, 963–992.
- 32) Pape, T.; Wintermeyer, W.; Rodnina, M. V. Complete Kinetic Mechanism of Elongation Factor Tu-Dependent Binding of Aminoacyl-tRNA to the A-Site of the E. coli Ribosome. *EMBO J.* **1998**, *17*, 7490-7497.

- 33) Pape, T.; Wintermeyer, W.; Rodnina, M. Induced Fit in Initial Selection and Proofreading of Aminoacyl-tRNA on the Ribosome. *EMBO J.* **1999**, *18*, 3800-3807.
- 34) Pape, T.; Wintermeyer, W.; Rodnina, Ma. V.; Conformational Switch in the Decoding Region of 16S rRNA During Aminoacyl-tRNA Selection on the Ribosome. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 104-107.
- 35) Ogle, J. M.; Murphy F. W.; Tarry, M. J.; Ramakrishnan, V.; Selection of tRNA by the Ribosome Requires a Transition from an Open to a Closed Form. *Cell* **2002**, *111*, 721-732.
- 36) Ogle, J. M.; Carter, A. P.; Ramakrishnan V. Insights into the Decoding Mechanism from Recent Ribosome Structures. *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 259-66.
- 37) (a) Kondo, J.; François, B.; Russell, R. J.; Murray, J. B.; Westhof, E. Crystal Structure of the Bacterial Ribosomal Decoding Site Complexed with Amikacin Containing the γ -amino- α -hydroxybutyryl (haba) Group. *Biochimie*, **2006**, *88*, 1027-1031; (b) François, B.; Russell, R. J.; Murray, J. B.; Aboul-ela, F.; Masquida, B.; Vicens, Q.; Westhof, E. Crystal Structures of Complexes Between Aminoglycosides and Decoding A-site Oligonucleotides: Role of the Number of Rings and Positive Charges in the Specific Binding Leading to Miscoding. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 5677-5690; (c) Vicens, Q.; Westhof, E. Crystal Structure of Geneticin Bound to a Bacterial 16 S Ribosomal RNA A-Site Oligonucleotide. *J. Mol. Biol.* **2003**, *326*, 1175-1188; (d) Vicens, Q.; Westhof, E. Crystal Structure of a Complex Between the Aminoglycoside Tobramycin and an Oligonucleotide Containing the Ribosomal Decoding A-Site. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 747-755; (e) Vicens, Q.; Westhof, E. Crystal Structure of Paromomycin Docked into the Eubacterial Ribosomal Decoding A-Site. *Structure* **2001**, *9*, 647-658.

- 38) Par example: Recht, M. I.; Fourmy, D.; Blanchard, K. D.; Dahlquist, D.; Puglisi, J. D. RNA Sequence Determinants for Aminoglycoside Binding to an A-Site rRNA Model Oligonucleotide. *J. Mol. Biol.* **1999**, *262*, 421-436.
- 39) Fourmy, D.; Recht, M. I.; Blanchard, S. C.; Puglisi, J. D. Structure of the A-Site of Escherichia coli 16S Ribosomal RNA Complexed with an Aminoglycoside Antibiotic. *Science* **1996**, *274*, 1367-1371.
- 40) (a) Hofstadler, S. A.; Griffey, R. H. Mass Spectrometry as a Drug Discovery Platform Against RNA Targets. *Curr. Opin. Drug Discov. Develop.* **2000**, *3*, 423-431; (b) Griffey, R. H.; Hofstadler, S. A.; Sannes-Lowery, K. A.; Ecker, D. J.; Crooke, S. T. Determinants of Aminoglycoside-Binding Specificity for rRNA by Using Mass Spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 10129-10133; (c) Griffey, R. H.; Greig, M. J.; An, H.; Sasmor, H.; Manalili, S. Targeted Site-Specific Gas-Phase Cleavage of Oligoribonucleotides. Application in Mass Spectrometry-Based Identification of Ligand Binding Sites. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 474-475.
- 41) (a) Fourmy, D.; Yoshizawa, S.; Puglisi, J. D. Paromomycin Binding Induces a Local Conformational Change in the A-site of 16 S rRNA. *J. Mol. Biol.* **1998**, *277*, 333-345; (b) Fourmy, D.; Recht, M. I.; Puglisi, J. D. Binding of Neomycin-Class Aminoglycoside Antibiotics to the A-site of 16 S rRNA. *J. Mol. Biol.* **1998**, *277*, 347-362; (c) Lynch, S. R.; Gonzalez, R. L. Jr.; Puglisi, J. D. Comparison of X-Ray Crystal Structure of the 30S Subunit-Antibiotic Complex with NMR Structure of Decoding Site Oligonucleotide-Paromomycin Complex. *Structure* **2003**, *11*, 43-53.
- 42) (a) Meroueh, S. O.; Mobashery, S. Conformational Transition in the Aminoacyl t-RNA Site of the Bacterial Ribosome Both in the Presence and Absence of an Aminoglycoside Antibiotic. *Chem. Biol. Drug Design* **2007**, *69*, 291-297; (b) Barbieri, C. M.; Kaul, M.; Pilch, D. S. Use of 2-Aminopurine as a Fluorescent Tool for Characterizing Antibiotic Recognition of the Bacterial rRNA A-site. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 3567-3574; (c) Kaul, M.; Barbieri, C. M.; Pilch, D. S. Aminoglycoside-

- Induced Reduction in Nucleotide Mobility at the Ribosomal RNA A-Site as a Potentially Key Determinant of Antibacterial Activity. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1261-1271.
- 43) (a) Edson, R. S.; Terrell, C. L. The Aminoglycosides. *Mayo Clinic Proceedings. Mayo Clinic* **1999**, *74*, 5, 519-528. (b) Mingeot-Leclercq, M. P.; Tulkens, P. M. Aminoglycosides: Nephrotoxicity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1003-1012.
- 44) (a) Rougier, F.; Ducher, M.; Maurin, M.; Corvaisier, S.; Claude, D.; Jelliffe, R.; Maire, P. Aminoglycoside Dosages and Nephrotoxicity: Quantitative Relationships. *Clinic. Pharmacokinetics* **2003**, *42*, 493-500; (b) Bartal, C.; Danon, A.; Schlaeffer, F.; Reisenberg, K.; Alkan, M.; Smoliakov, R.; Sidi, A.; Almog, Y. Pharmacokinetic Dosing of Aminoglycosides: a Controlled Trial. *Am. J. Med.* **2003**, *114*, 194-198.
- 45) Fischel-Ghodsian, N. Genetic Factors in Aminoglycoside Toxicity. *Pharmacogenomics* **2005**, *6*, 27-36.
- 46) He, X.; Wang, Y.; Dai, P.; Gu, J.; Chen, T. Development of a Molecular Screening Test for Hereditary Hearing Loss and Genetic Susceptibility to Aminoglycoside Toxicity for Chinese Population. *Beijing Daxue Xuebao, Yixueban* **2005**, *37*, 51-54.
- 47) Stuart, B. L. *The Antibiotic Paradox: How the Misuse of Antibiotics Destroys Their Curative Powers*. HarperCollins Publishers **2002**, ISBN-10: 0738204404.
- 48) Fisher J. F.; Meroueh, S. O.; Mobashery, S. Bacterial Resistance to β -Lactam Antibiotics: Compelling Opportunism, Compelling Opportunity. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 395-424.
- 49) Magnet, S.; Blanchard, J. S. Molecular Insights into Aminoglycoside Action and Resistance. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 477-497.

- 50) (a) Taber, H. W.; Mueller, J. P.; Miller, P. F.; Arrow, A. S. Bacterial Uptake of Aminoglycoside Antibiotics. *Microbiol. Rev.* **1987**, *51*, 4, 439-57. (b) Hancock, R. E. Alterations in Outer Membrane Permeability. *Annu. Rev. Microbiol.* **1984**, *38*, 237-264.
- 51) Bryan, L. E.; Kowand, S. K.; Van Den Elzen, H. M. Mechanism of Aminoglycoside Antibiotic Resistance in Anaerobic Bacteria: *Clostridium perfringens* and *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1979**, *15*, 7-13.
- 52) Putman, M.; van Veen, H. W.; Konings, W. N. Molecular Properties of Bacterial Multidrug Transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2000**, *64*, 672-693.
- 53) Cundliffe, E. How Antibiotic-Producing Organisms Avoid Suicide. *Annu. Rev. Microbiol.* **1989**, *43*, 207-233.
- 54) Beauclerk, A. A. D.; Cundliffe, E. Sites of Action of Two Ribosomal RNA Methylases Responsible for Resistance to Aminoglycosides. *J. Mol. Biol.* **1987**, *193*, 661-671.
- 55) Pfister, P.; Hobbie, S.; Vicens, Q.; Boettger, E. C.; Westhof, E. The Molecular Basis for A-site Mutations Conferring Aminoglycoside Resistance: Relationship Between Ribosomal Susceptibility and X-ray Crystal Structures. *ChemBioChem* **2003**, *4*, 1078-1088.
- 56) (a) Springer, B.; Kidan, Y. G.; Prammananan, T.; Ellrott, K.; Bottger, E. C.; Sander, P. Mechanisms of Streptomycin Resistance: Selection of Mutations in the 16S rRNA Gene Conferring Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 2877-2884. (b) Musser, J. M.; Antimicrobial Agent Resistance in Mycobacteria: Molecular Genetic Insights. *Clinic. Microbiol. Rev.* **1995**, *8*, 496-514.

- 57) Rosen, B. P.; Mobashery, S. *Resolving the Antibiotic Paradox: Progress in Understanding Drug Resistance and Development of New Antibiotics*. Kluwer Academic / Plenum Publisher, New York, 1998.
- 58) (a) Lombardini, J. B.; Cheng-Chu, M. Properties of Gentamicin Adenylyl Transferase Obtained from R-Factor-Resistant *Escherichia coli*. *Int. J. Biochem.* **1980**, *12*, 427-431; (b) Gates, C. A.; Northrop, D. B. Determination of the Rate-Limiting Segment of Aminoglycoside Nucleotidyltransferase 2"-I by pH and Viscosity-Dependent Kinetics. *Biochemistry* **1988**, *27*, 3834-3842; (c) Gates, C. A.; Northrop, D. B. Alternative Substrate and Inhibition Kinetics of Aminoglycoside Nucleotidyltransferase 2"-I in Support of a Theorell-Chance Kinetic Mechanism. *Biochemistry* **1988**, *27*, 3826-3833; (d) Gates, C. A.; Northrop, D. B. Substrate Specificities and Structure-Activity Relationships for the Nucleotidylation of Antibiotics Catalyzed by Aminoglycoside Nucleotidyltransferase 2"-I. *Biochemistry* **1988**, *27*, 3820-3825.
- 59) Sakon, J.; Liao, H. H.; Kanikula, A. M.; Benning, M. M.; Rayment, I.; Holden, H. M. Molecular Structure of Kanamycin Nucleotidyltransferase Determined to 3.0 Å Resolution. *Biochemistry* **1993**, *32*, 11977-11984.
- 60) Pedersen, L. C.; Benning, M. M.; Holden, H. M. Structural Investigation of the Antibiotic and ATP-binding Sites in Kanamycin Nucleotidyltransferase. *Biochemistry* **1995**, *34*, 13305-13311.
- 61) Hegde, S. S.; Javid-Majd, F.; Blanchard, J. S. Overexpression and Mechanistic Analysis of Chromosomally Encoded Aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase (AAC(2')-Ic) From *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 45876-45881.
- 62) Vetting, M. W.; Hegde, S. S.; Javid-Majd, F.; Blanchard, J. S.; Roderick, S. L. Aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase From *Mycobacterium tuberculosis* in

Complex with Coenzyme A and Aminoglycoside Substrates. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 653-658.

- 63)(a) Williams, J. W.; Northrop, D. B. Purification and properties of gentamicin acetyltransferase I. *Biochemistry* **1976**, *15*, 125-31; (b) Williams, J. W.; Northrop, D. B.; Kinetic mechanisms of gentamicin acetyltransferase I. Antibiotic-dependent Shift From Rapid to Nonrapid Equilibrium Random Mechanisms. *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 5902-5907.
- 64) Wolf, E.; Vassilev, A.; Makino, Y.; Sali, A.; Nakatani, Y.; Burley, S. K. Crystal Structure of a GCN5-related N-acetyltransferase: *Serratia marcescens* Aminoglycoside 3-N-acetyltransferase. *Cell* **1998**, *94*, 439-449.
- 65)(a) Draker, K.; Northrop, D. B.; Wright, G. D. Kinetic Mechanism of the GCN5-Related Chromosomal Aminoglycoside Acetyltransferase AAC(6')-Ii from *Enterococcus faecium*: Evidence of Dimer Subunit Cooperativity. *Biochemistry* **2003**, *42*, 6565-6574; (b) Draker, K.; Wright, G. D. Molecular Mechanism of the Enterococcal Aminoglycoside 6'-N-Acetyltransferase: Role of GNAT-Conserved Residues in the Chemistry of Antibiotic Inactivation. *Biochemistry* **2004**, *43*, 446-454; (c) Magnet, S.; Lambert, T.; Courvalin, P.; Blanchard, J. S. Kinetic and Mutagenic Characterization of the Chromosomally Encoded *Salmonella enterica* AAC(6')-Iy Aminoglycoside N-Acetyltransferase. *Biochemistry* **2001**, *40*, 3700-3709; (d) Hegde, S. S.; Dam, T. K.; Brewer, C. F.; Blanchard, J. S. Thermodynamics of Aminoglycoside and Acyl-Coenzyme A Binding to the *Salmonella enterica* AAC(6')-Iy Aminoglycoside N-Acetyltransferase. *Biochemistry* **2002**, *41*, 7519-7527.
- 66) Wybenga-Groot, L. E.; Draker, K.; Wright, G. D.; Berghuis, A. M. Crystal Structure of an Aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase: Defining the GCN5-related N-acetyltransferase Superfamily Fold. *Structure* **1999**, *7*, 497-507.

- 67) Burk, D. L.; Ghuman, N.; Wybenga-Groot, L. E.; Berghuis, A. M. X-ray Structure of the AAC(6')-Ii Antibiotic Resistance Enzyme at 1.8 Å Resolution; Examination of Oligomeric Arrangements in GNAT Superfamily Members. *Protein Sci.* **2003**, *12*, 426-437.
- 68) Vetting, M. W.; Magnet, S.; Nieves, E.; Roderick, S. L.; Blanchard, J. S. A Bacterial Acetyltransferase Capable of Regioselective N-Acylation of Antibiotics and Histones. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 565-573.
- 69) Magalhães, M. L. B.; Vetting, M. W.; Gao, F.; Freiburger, L.; Auclair, K.; Blanchard, J. S. Kinetic and Structural Analysis of Bisubstrate Inhibition of the *Salmonella enterica* Aminoglycoside 6'-N-Acetyltransferase. *Biochemistry* **2008**, *47*, 579-584.
- 70) McKay, G. A.; Thompson, P. R.; Wright, G. D. Broad Spectrum Aminoglycoside Phosphotransferase Type III from *Enterococcus*: Overexpression, Purification, and Substrate Specificity. *Biochemistry* **1994**, *33*, 6936-6944.
- 71)(a) Thompson, P. R.; Hughes, D. W.; Wright, G. D. Regiospecificity of Aminoglycoside Phosphotransferase from *Enterococci* and *Staphylococci* (APH(3')-IIIa). *Biochemistry* **1996**, *35*, 8686-8695; (b) Trieu-Cuot, P.; Courvalin, P. Nucleotide Sequence of the *Streptococcus faecalis* Plasmid Gene Encoding the 3',5"-Aminoglycoside Phosphotransferase Type III. *Gene* **1983**, *23*, 331-341.
- 72)(a) McKay, G. A.; Wright, G. D. Kinetic Mechanism of Aminoglycoside Phosphotransferase Type IIIa. Evidence for a Theorell-Chance mechanism. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 24686-24692; (b) McKay, G. A.; Wright, G. D. Catalytic Mechanism of Enterococcal Kanamycin Kinase (APH(3')-IIIa): Viscosity, Thio, and Solvent Isotope Effects Support a Theorell-Chance Mechanism. *Biochemistry* **1996**, *35*, 8680-8685.

- 73) Fong, D. H.; Berghuis, A. M. Substrate Promiscuity of an Aminoglycoside Resistance Enzyme via Target Mimicry. *EMBO J.* **2002**, *21*, 2323-2331.
- 74) Nurizzo, B.; Shewry, S. C.; Perlin, M. H.; Brown, S. A.; Dholakia, J. N.; Fuchs, R. L.; Deva, T.; Baker, E. N.; Smith, C. A. The Crystal Structure of Aminoglycoside Phosphotransferase-IIa, an Enzyme Responsible for Antibiotic Resistance. *J. Mol. Biol.* **2003**, *327*, 491-506.
- 75) Daigle, D. M.; Hughes, D. W.; Wright, G. D. Prodigious Substrate Specificity of AAC(6')-APH(2''), an Aminoglycoside Antibiotic Resistance Determinant in Enterococci and Staphylococci. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 99-110.
- 76) Boehr, D. D.; Jenkins, S. I.; Wright, G. D. The Molecular Basis of the Expansive Substrate Specificity of the Antibiotic Resistance Enzyme Aminoglycoside Acetyltransferase-6'-Aminoglycoside Phosphotransferase-2". The Role of Asp-99 as an Active Site Base Important for Acetyl Transfer. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 12873-12880.
- 77) Kim, C.; Heseck, D.; Zajicek, J.; Vakulenko, S. B.; Mobashery, S. Characterization of the Bifunctional Aminoglycoside Modifying Enzyme ANT(3'')-Ii/AAC(6')-IId from *Serratia marcescens*. *Biochemistry* **2006**, *45*, 8368-8377.
- 78) Dubois, V.; Poirel, L.; Marie, C.; Arpin, C.; Nordmann, P.; Quentin, C. Molecular Characterization of a Novel Class 1 Integron Containing *bla*(GES-1) and a Fused Product of AAC(3)-Ib/AAC(6')-Ib' Gene Cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 638-645.
- 79) Mendes, R. E.; Toleman, M. A.; Ribeiro, J.; Sader, H. S.; Jones, R. N.; Walsh, T. R. Integron Carrying a Novel Metallo- β -lactamase Gene, *bla*IMP-16, and a Fused Form of Aminoglycoside-resistant Gene AAC(6')-30/AAC(6')-Ib': Report From the

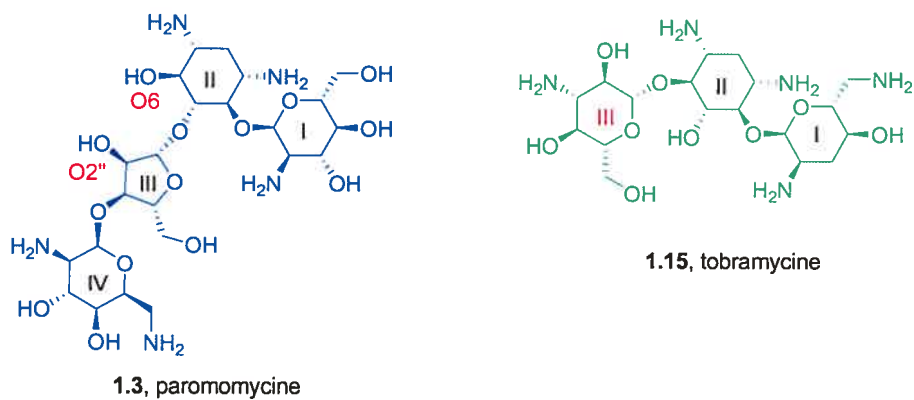
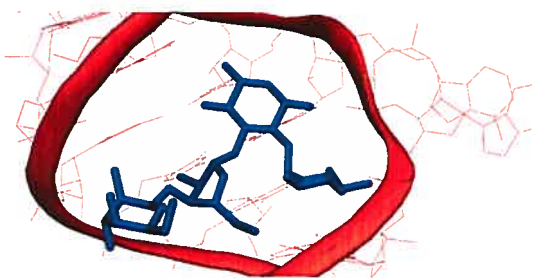
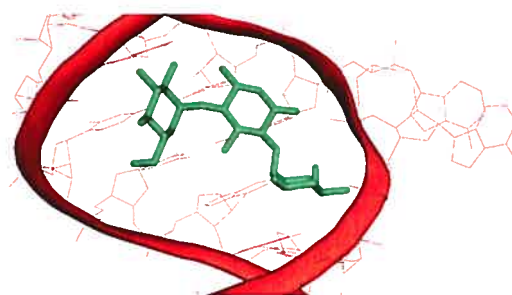
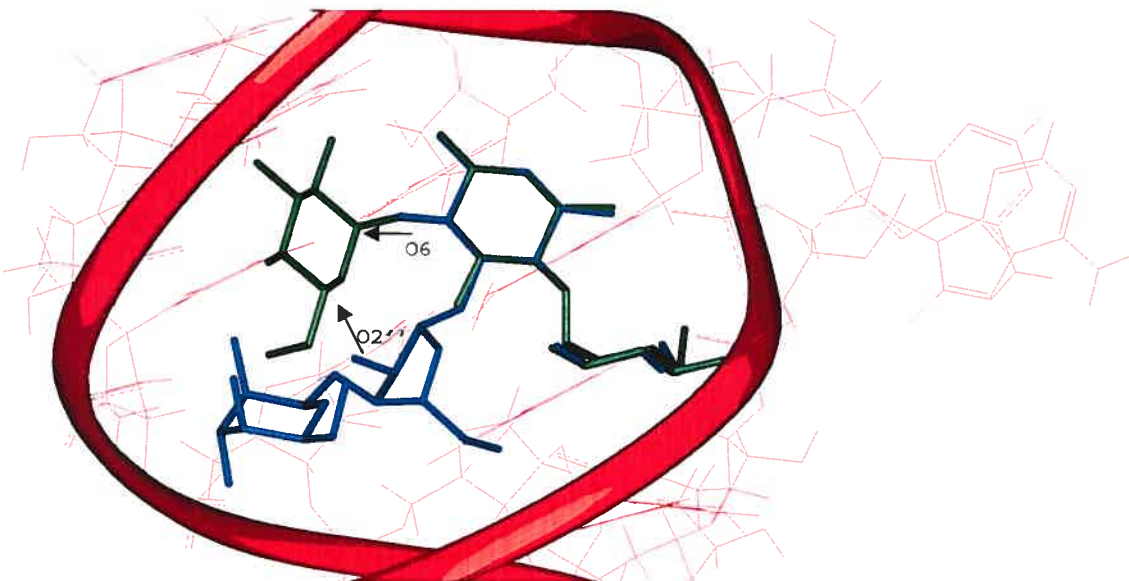
SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48, 4693-4702.

Chapitre 2
Analogues de la paromomycine fonctionnalisés
à la position O6 ou O2''

2.1. Design d'analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O6 ou O2''.

Les structures rayons X de la paromomycine¹ (1.3) et de la tobramycine² (1.15) dans un oligonucléotide modèle du site-A révèlent que les cycles I et II de ces antibiotiques sont superposables (Figure 2.1). La superposition des cycles I et II de la tobramycine à ceux de la paromomycine nous a permis d'envisager de fonctionnaliser certains groupements hydroxyles de la paromomycine pour atteindre l'espace normalement occupé par le cycle III de la tobramycine. Ce cycle étant responsable de deux interactions avec l'ARNr,² nous avons entrepris de modifier la paromomycine en lui ajoutant une chaîne latérale pouvant imiter ces interactions en préparant des aminoglycosides hybrides entre ceux de la classe A, comme la paromomycine, et ceux la classe B, comme la tobramycine. Deux fonctions hydroxyles de la paromomycine sont particulièrement bien orientées pour réaliser cet objectif. Naturellement, la première est la fonction 6-OH de l'unité désoxystreptamine puisque c'est sur cet oxygène que le cycle III est lié à la tobramycine. En regardant attentivement la Figure 2.1d, nous avons constaté qu'il est également possible d'atteindre l'espace occupé par le cycle III de la tobramycine à partir de la fonction 2''-OH de la paromomycine.

a)

b)^ac)^ad)^a

^a La paromomycine est bleue, la tobramycine est verte et les molécules d'eau ne sont pas illustrées, par souci de clarté.

Figure 2.1. a) Structure de la paromomycine (1.3) et de la tobramycine (1.15); b-c) Structures rayon X de la paromomycine¹ et de la tobramycine² dans un oligonucléotide modèle du site-A du ribosome procaryote. d) Superposition de la structure rayon X la tobramycine à celle de la paromomycine.

Les deux objectifs initiaux qui étaient de préparer des aminoglycosides hybrides en fonctionnalisant la paromomycine à la position O2'' ou O6 afin d'atteindre l'espace occupé par le cycle III de la tobramycine sont représentés à la Figure 2.2.

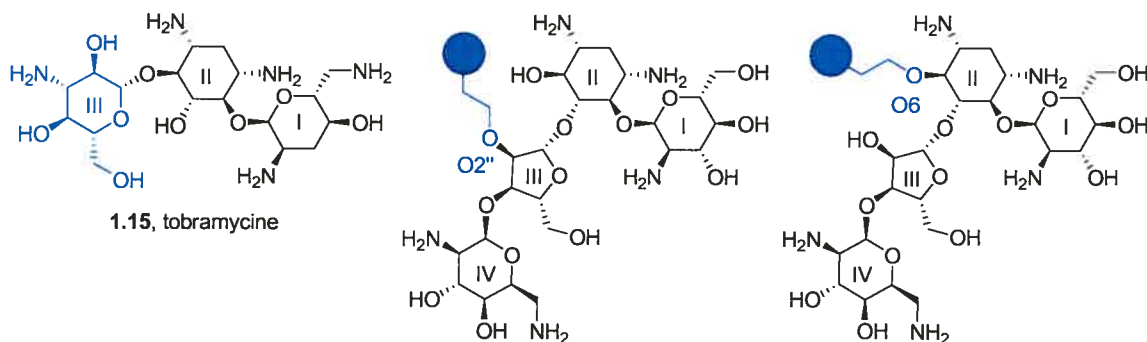


Figure 2.2. Paromomycine fonctionnalisée à la position O2'' ou O6 pour imiter le cycle III de la tobramycine.

En fonctionnalisant la paromomycine à la position O6 ou O2'' avec des chaînes latérales adéquates qui imiteraient certaines interactions entre le cycle III de la tobramycine et l'ARNr, on peut penser que l'affinité pour le site-A du ribosome procaryote sera augmentée ou à tout le moins maintenue. L'affinité d'un aminoglycoside pour le site-A est généralement exprimée par sa constante de dissociation (K_d) avec le site-A (ou un modèle du site-A). Une analyse en spectrométrie de masse d'une solution contenant l'aminoglycoside et un modèle du site-A permet de déterminer la K_d (Figure 2.3).³

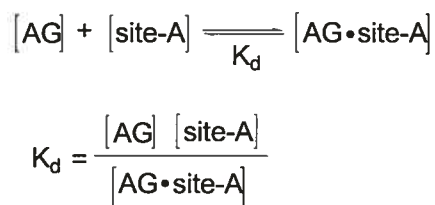


Figure 2.3. Constante de dissociation (K_d) entre un aminoglycoside (AG) et le site-A du ribosome procaryote.

On sait toutefois que l'affinité pour le site-A n'est pas directement reliée à l'activité antibactérienne d'un aminoglycoside (Tableau IV).⁴ Par contre, une modification structurale de la paromomycine qui entrainerait une importante perte d'affinité pour le site-A nuirait certainement à son activité antibactérienne, d'où la pertinence d'étudier les structures rayon X pour planifier des modifications structurales potentiellement efficaces.

Aminoglycoside	K _d 16S (μM)	CIM (μM)	
		<i>E. coli</i> ^a	<i>S. aureus</i> ^b
Kanamycine A	4.82	2.5-5	1.2-2.5
Néamine	4.56	> 10	> 10
Amikacine	2.45	1.2-2.5	1.2-2.5
Tobramycine	2.39	0.6-1.2	0.3-0.6
Kanamycine B	1.48	1.2-2.5	0.3-0.6
Paromomycine	0.15	2.5-5	1.2-2.5

^a ATCC 25922; ^b ATCC 13709.

Tableau IV. Activités antibactériennes et affinités pour le site-A du ribosome procaryote de certains aminoglycosides.⁴

L'activité antibactérienne d'un antibiotique est généralement exprimée par la concentration inhibitrice minimum (CIM) que l'on détermine en exposant des bactéries à différentes concentrations de l'antibiotique. La CIM est la concentration de l'antibiotique à partir de laquelle les bactéries ne se multiplient pas *in vitro* (Figure 2.4).

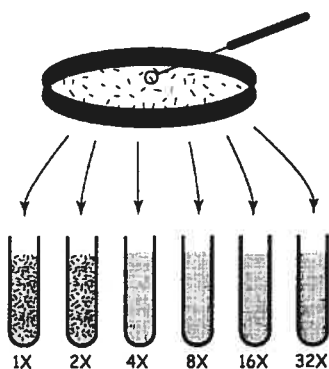


Figure 2.4. Concentration inhibitrice minimum (CIM) d'un antibiotique.

Pour atteindre les objectifs de modifications de la structure de la paromomycine tels qu'illustrés à la Figure 2.2, le défi synthétique était d'arriver à modifier sélectivement les nombreux groupements hydroxyles de cet antibiotique. En plus de ses cinq fonctions amines, la paromomycine est constituée de huit groupements hydroxyles, soit deux primaires et six secondaires. Il était donc nécessaire d'établir une voie synthétique qui nous permettrait d'allyler l'alcool 2''-OH et, une autre, qui nous permettrait d'allyler l'alcool 6-OH. Nous avons retenu le groupement allyle car son insaturation peut être utilisée pour introduire les chaînes latérales désirées. Avant de présenter la voie synthétique que nous avons développée pour arriver à allyler les deux alcools d'intérêt, voyons certains exemples choisis de modifications sélectives des groupements fonctionnels d'aminoglycosides.

2.2. Exemples choisis dans la littérature décrivant des modifications sélectives d'aminoglycosides.

Plusieurs groupes de recherche se sont intéressés à la fonctionnalisation sélective des alcools de la paromomycine (**1.3**) ou de la néomycine B (**1.4**), qui ne diffère de la paromomycine que par la substitution du 6'-OH par un 6'-NH₂. Dans chaque situation, la présence des nombreux groupements hydroxyles (huit pour la paromomycine et sept pour la néomycine B) a nécessité la mise au point de voies synthétiques utilisant des réactions régiosélectives. Certains exemples choisis dans la littérature sont présentés aux Schémas 2.1 à 2.8. Ces exemples ont été retenus parce qu'ils décrivent des réactions régiosélectives que nous avons utilisées pour atteindre nos objectifs à l'intérieur de ce chapitre ou parce qu'ils ont permises de produire des analogues fonctionnalisés de manière à imiter un cycle d'un aminoglycoside quelconque comme ce que nous tentons de réaliser dans ce chapitre.

Il y a déjà trois décennies, la formation sélective d'acétals permettant de protéger certains groupements hydroxyles de la paromomycine *N*-protégée **2.1** a été étudiée par Hanessian *et al.* (Schéma 2.1).⁵ L'utilisation de l'acide formique dans le benzaldéhyde a permis la préparation du composé **2.2**, alors qu'en présence de chlorure de zinc, le composé **2.3** a été obtenu. L'exploitation de ces résultats a mené à la préparation d'un analogue de la paromomycine modifiée à la position O5". Le seul alcool primaire laissé libre après la formation du composé **2.2** a été substitué par un brome, puis ce dernier a été substitué par un azoture pour fournir le composé **2.4** (Schéma 2.2).⁶ L'hydrolyse acide de l'acétal a fourni le composé **2.5**, puis l'hydrogénolyse des groupements benzyloxycarbonyles concomitante à la réduction de l'azoture en amine a permis d'obtenir le composé **2.6** qui s'est avéré aussi actif que la paromomycine.

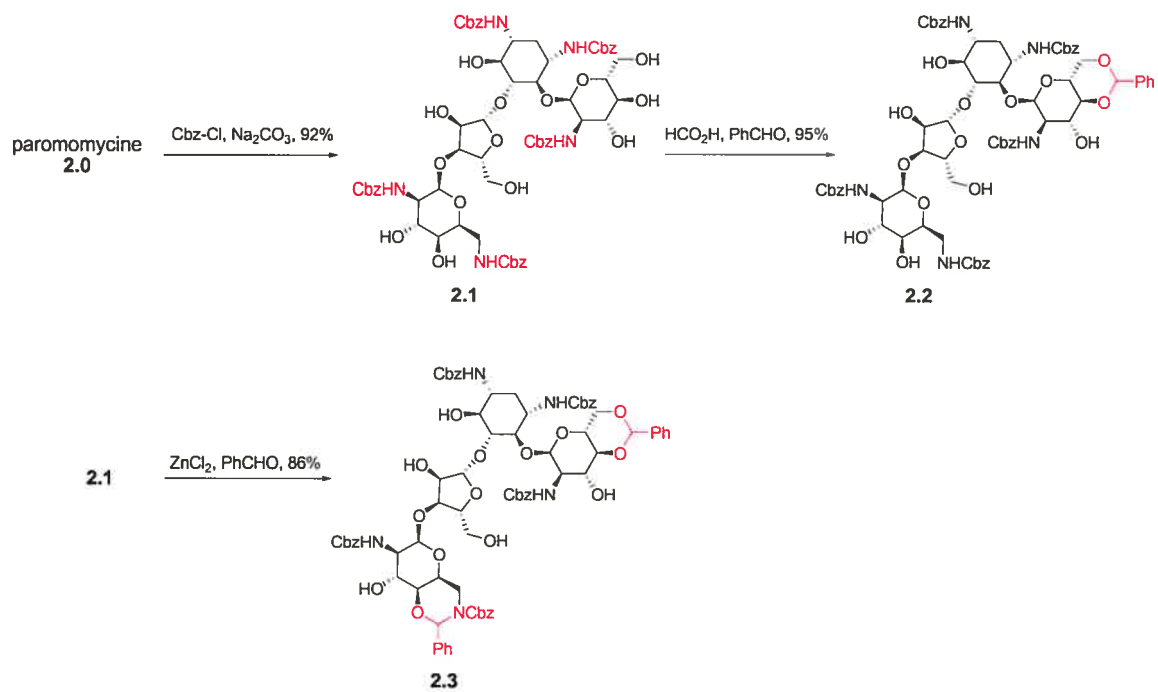


Schéma 2.1. Formation d'acétals de la paromomycine *N*-protégée par Hanessian *et al.*⁵

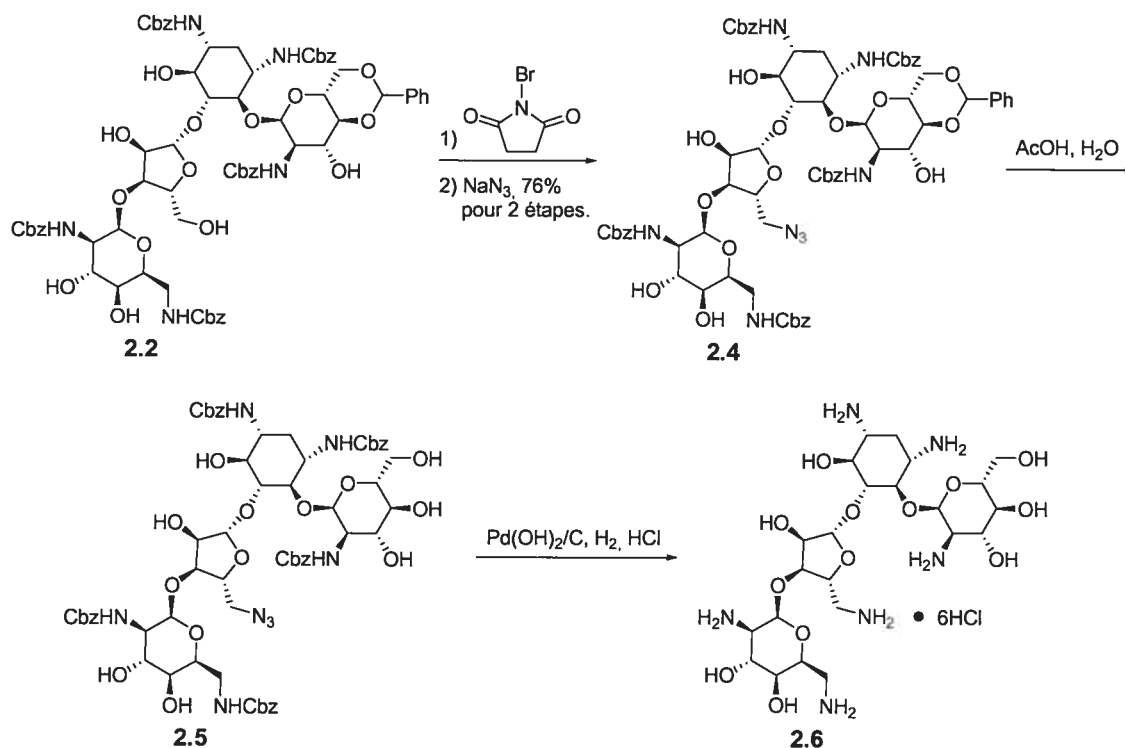


Schéma 2.2. Préparation du composé 2.6 par Hanessian *et al.*⁶

Récemment, Vasella *et al.*⁷ ont préparé des analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position C5'' (Schéma 2.3). L'azotation des amines de la paromomycine suivie du traitement avec l'acide formique dans le benzaldéhyde a fourni le composé 2.7. L'oxydation de l'alcool primaire 5''-OH jusqu'à l'acide carboxylique, suivie de couplages peptidiques a fourni des amides de type 2.8. L'hydrolyse du benzylidène et la réduction des azotures a permis l'obtention des analogues de la paromomycine 2.9a-c, tous inactifs.

Similairement, plusieurs groupes de recherche se sont intéressés à la préparation d'analogues de la néomycine B (structure 1.4) fonctionnalisée à la position O5''. Ainsi, en modifiant le seul alcool primaire de cette molécule, des analogues tels 2.10, 2.11 et 2.12 ont été préparés (Figure 2.5).⁸⁻¹¹ L'analogue 2.10 s'est avéré plus actif que la kanamycine contre des souches de bactéries connues pour être résistantes aux aminoglycosides, alors que les activités antibactériennes des composés 2.11 et 2.12 n'ont pas été discutées.

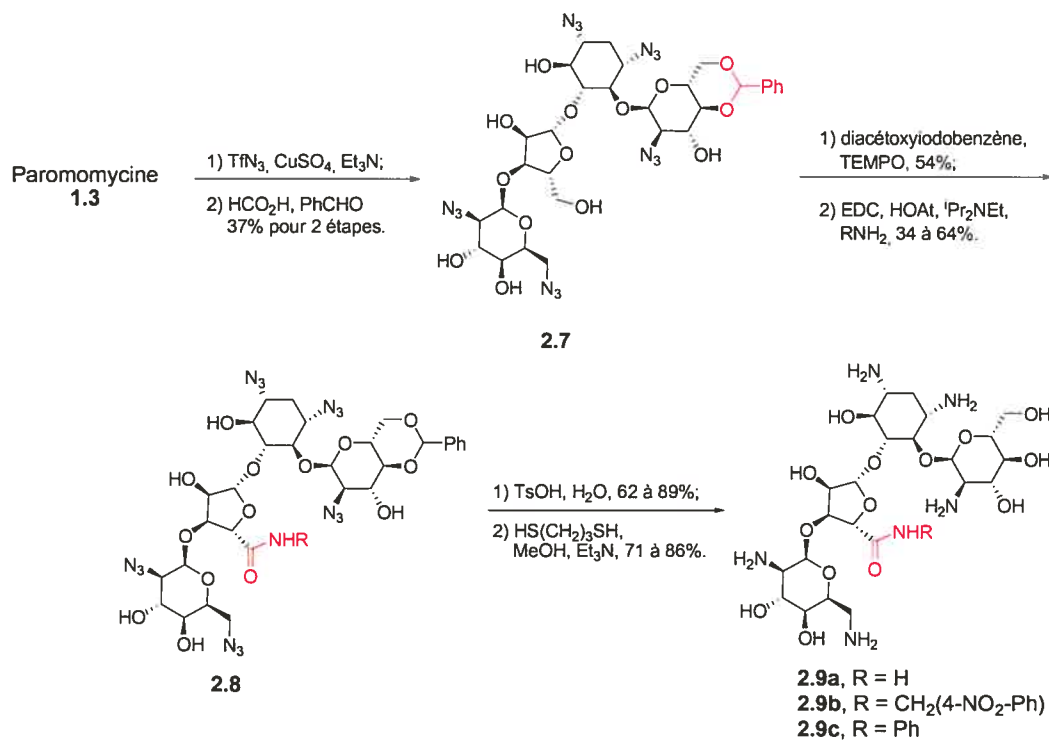


Schéma 2.3. Fonctionnalisation de la position C5'' de la paromomycine par Vasella *et al.*⁷

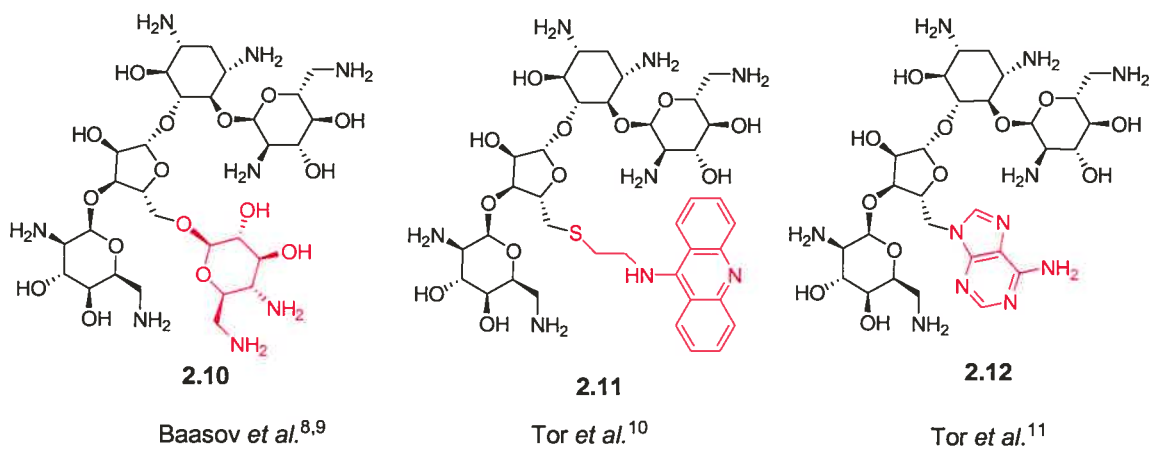


Figure 2.5. Structures d'analogues de la néomycine B fonctionnalisée à la position O5'' ou C5'' préparés par Baasov^{8,9} et Tor.^{10,11}

En 1998, Wong *et al.*¹² ont publié la préparation d'analogues de la néomycine B qui visaient à imiter le cycle IV de cette dernière (Schéma 2.4). La méthanolyse du lien glycosidique du ribose de la néomycine B (**1.4**) suivi de l'azotation des amines des cycles I et II a permis d'obtenir le composé **2.13**. L'acétylation de ce polyol, à l'exception du groupement 6-OH, a fourni le composé **2.14**. Une glycosylation de ce dernier avec le motif ribose **2.15** a introduit le cycle III avec un groupement allyle déjà en place à la position O3'' sur le pseudotrisaccharide **2.16**. Des manipulations de groupements protecteurs ont mené au composé **2.17** qui, à la suite d'un clivage oxydatif de l'alcène et d'aminations réductrices, a permis d'obtenir des amines de type **2.18**. La réduction des azotures suivie de la déprotection des éthers benzylique a fourni les analogues **2.19a-b** visant à imiter le cycle IV de la néomycine B. Il a été déterminé que les activités antibactériennes des composés **2.19a-b** sont similaires à celles de la néomycine B.

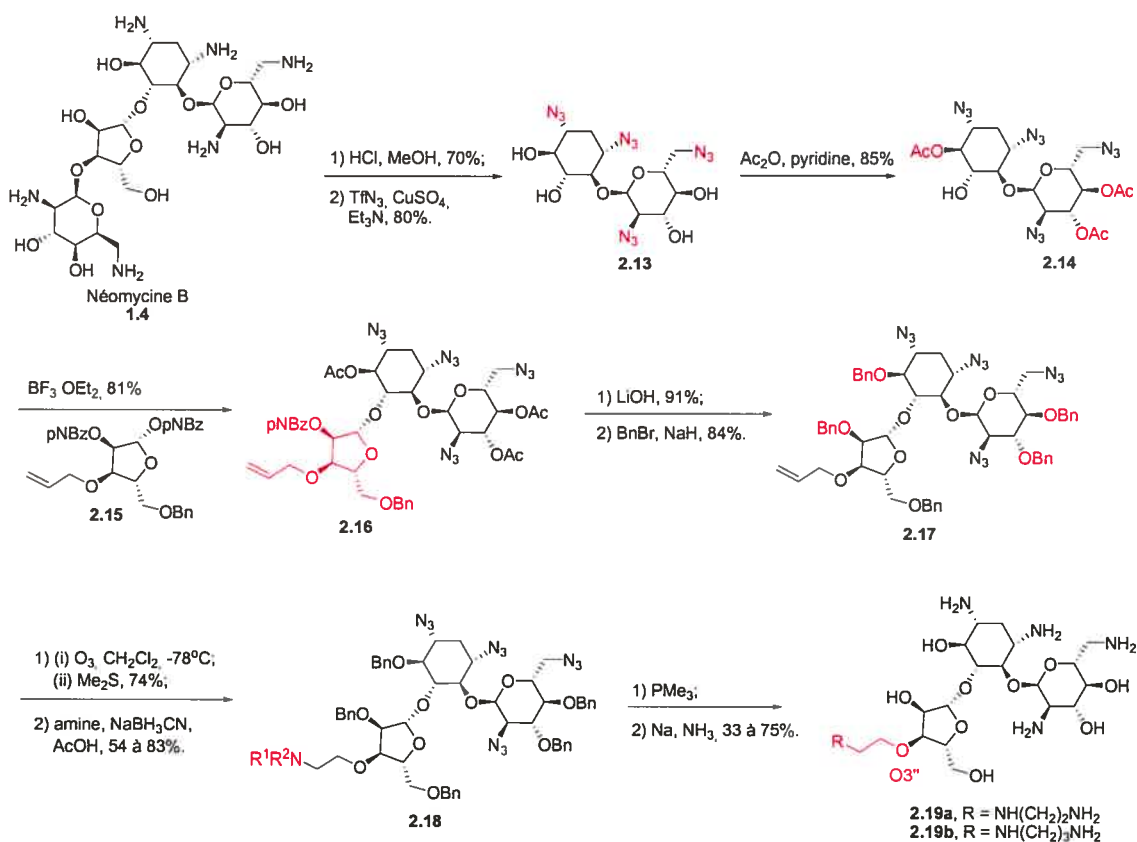


Schéma 2.4. Préparation d'analogues visant à imiter le cycle IV de la néomycine B par Wong *et al.*¹²

D'autres groupes de recherche se sont aussi intéressés à la préparation d'analogues de la paromomycine visant à imiter un de ses cycles. Par exemple, la préparation d'analogues avec des chaînes latérales ancrées à la position O4 pour imiter le cycle I qui a préalablement été enlevé a été publiée récemment par Hanessian *et al.* (Schéma 2.5).¹³ L'acylation des alcools libres du composé **2.3** avec le chlorure de benzoyle suivi de l'hydrolyse du benzylidène a permis d'obtenir le composé **2.20**. L'iodination de l'alcool primaire puis l'acylation de l'alcool secondaire avec le chlorure de benzoyle a permis d'obtenir le dérivé iodé **2.21**. L'élimination du cycle I en traitant le dérivé iodé **2.21** avec du zinc a fourni le composé **2.22**. L'allylation du composé **2.22** suivi du clivage oxydatif de l'alcène avec l'ozone a fourni l'aldéhyde **2.23** et une série d'aminations réductrices, ont permis d'obtenir des amines de type **2.24**. La déprotection des esters de benzoate avec le méthanolate de sodium, puis celle des groupements benzyloxycarbonyles et du benzylidène avec de l'hydrogène en présence d'hydroxyde de palladium ont permis l'obtention des analogues de type **2.25** visant à imiter le cycle I de la paromomycine. Ces analogues se sont tous avérés inactifs.

Une élimination du cycle I à partir d'un composé iodé similaire à **2.21** a aussi été rapportée par Vasella *et al.*¹⁴ L'obtention d'autres analogues visant à imiter le cycle I a été publiée par Swayze *et al.*¹⁵ Les études décrites dans ce paragraphe visant à produire des aminoglycosides semi-synthétiques en imitant le cycle I de la paromomycine ont tous mené à des composés dotés d'activités antibactériennes moins intéressantes que celles de la paromomycine.

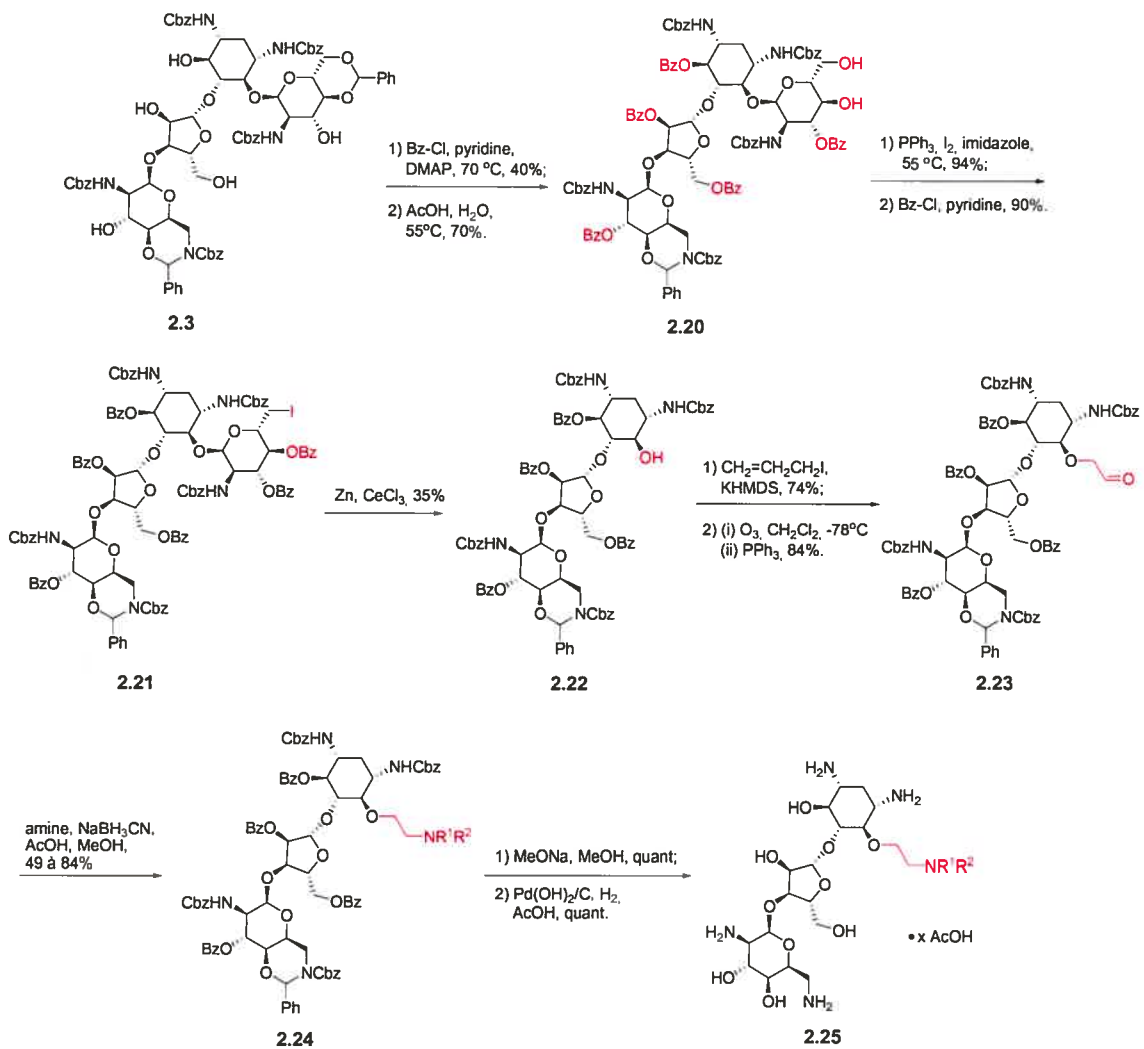


Schéma 2.5. Préparation d'analogues visant à imiter le cycle I de la paromomycine par Hanessian *et al.*¹³

Toujours en cherchant à imiter un cycle de ces antibiotiques, Wong *et al.*¹⁶ ont publié l'obtention d'analogues qui visaient à imiter les cycles III et IV de la néomycine B (Schéma 2.6). La néomycine B protégée **2.26** a été obtenue à la suite de l'azotation des amines suivie de la formation d'éther de benzyle avec les alcools. La méthanolyse du lien glycosidique du ribose suivi de l'allylation de l'alcool 6-OH fournit le composé **2.27**. Une série de réactions similaires à celles montrées au Schéma 2.4 a mené à la formation d'analogues aminoglycosidiques de type **2.29** visant à imiter les cycles III et IV de la néomycine B. Ces analogues ont tous démontrés une activité antibactérienne moins intéressante que la néomycine B.

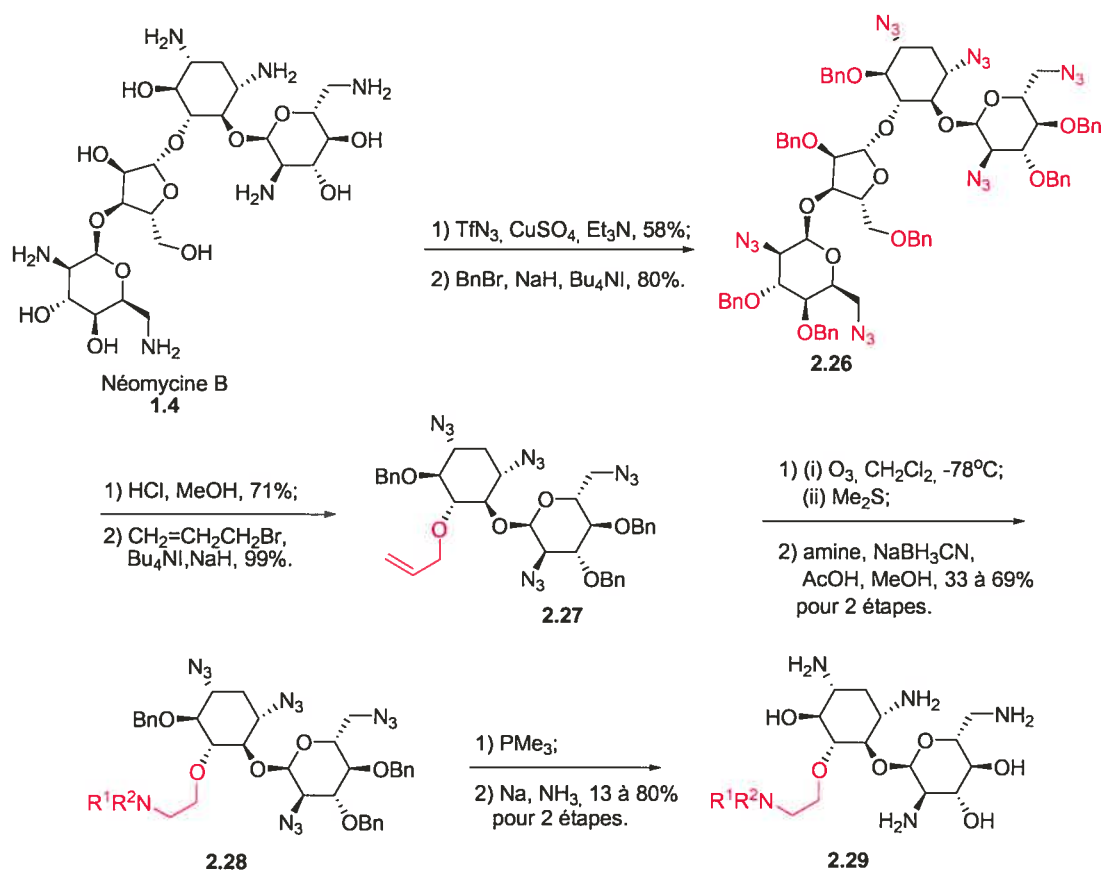


Schéma 2.6. Préparation d'analogues visant à imiter les cycles III et IV de la néomycine B par Wong *et al.*¹⁶

Également, Hanessian *et al.*¹⁷ ont préparé des analogues qui visaient à imiter les cycles III et IV de la paromomycine (Schéma 2.7). L'élimination du cycle IV par un traitement basique du dialdéhyde obtenu par le clivage oxydatif du diol vicinal du composé **2.2** a mené à la formation du pseudo-trisaccharide **2.30**. Un clivage oxydatif du diol vicinal du cycle III du composé **2.30** suivi d'aminations réductrices a permis de former des morpholines de type **2.31**. Des déprotections usuelles ont fourni des analogues de type **2.32** susceptibles d'imiter les cycles III et IV de la paromomycine. Les activités antibactériennes de ces analogues sont toutes moins bonnes que celle de la paromomycine.

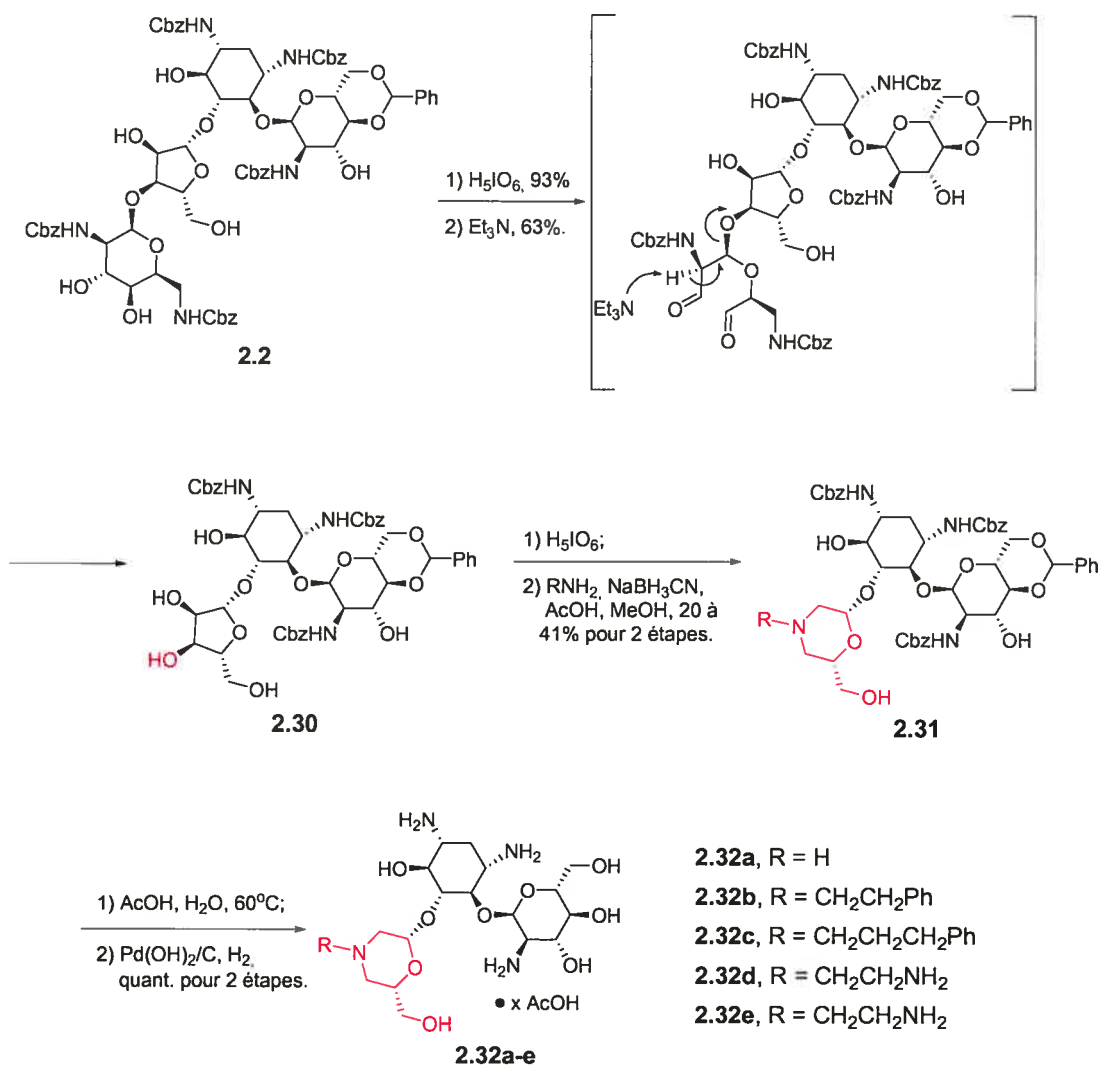


Schéma 2.7. Préparation d'analogues visant à imiter les cycles III et IV de la paromomycine par Hanessian *et al.*¹⁷

Plus récemment, Chang *et al.*¹⁸ ont préparé des aminoglycosides dans le but d'imiter le cycle III de la néomycine B (Schéma 2.8). Le composé **2.26** a été méthanolysé, puis une réaction de glycosylation avec le composé **2.33** a fourni le composé **2.34** qui a été déprotégé pour fournir l'analogue **2.35**. Les activités antibactériennes de cet analogue se sont avérées moins intéressantes que celles de la néomycine B.

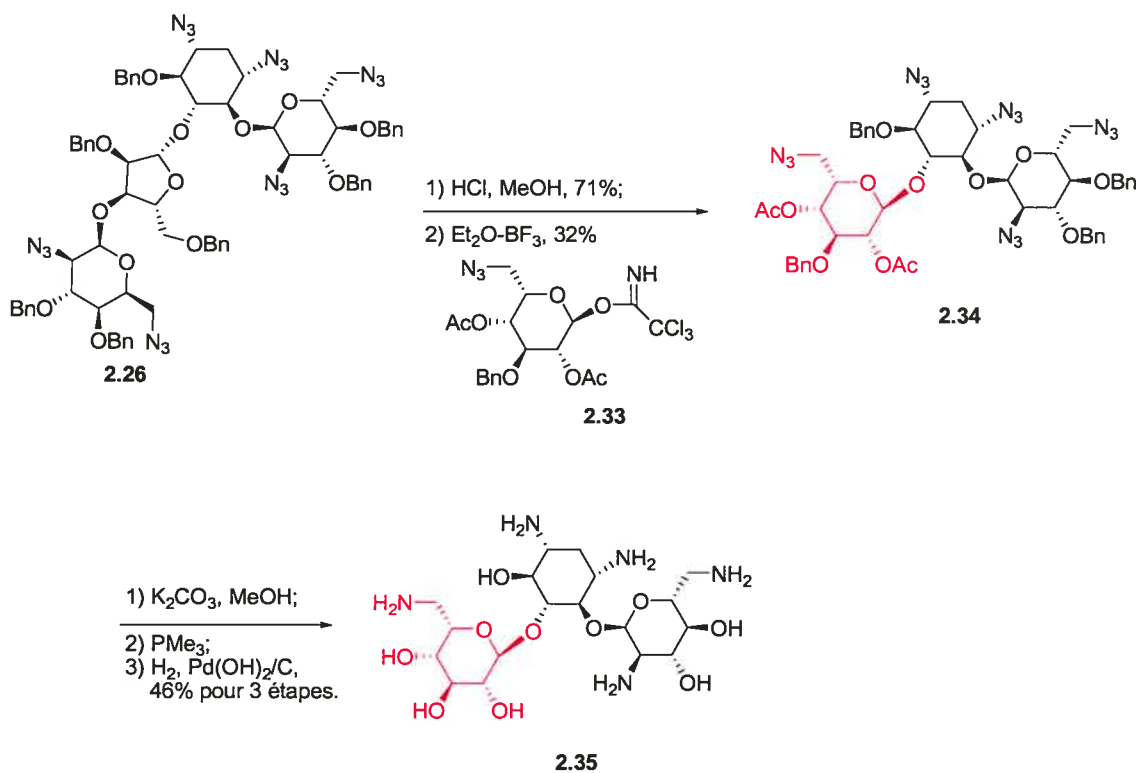


Schéma 2.8. Préparation d'un analogue visant à imiter le cycle III de la néomycine B par Chang *et al.*¹⁸

2.3. Préparation d'analogues de la paromomycine fonctionnalisés à la position O6.

Comme il a été expliqué au début de ce chapitre, nous étions intéressé à préparer des aminoglycosides hybrides en fonctionnalisant la position O6 paromomycine afin d'imiter certaines interactions observées entre le cycle III de la tobramycine et un modèle du site-A du ribosome procaryote. Il était déjà connu que le groupement 6-OH de la paromomycine était le moins réactif lors de l'acylation des alcools de cette molécule.¹⁹ Nous avons donc fonctionnalisé la position O6 de la paromomycine en débutant par effectuer l'acylation des alcools du composé **2.2**, excepté l'alcool 6-OH,⁵ à l'aide du chlorure de benzoyle dans la pyridine, ce qui a permis d'obtenir l'alcool **2.36** (Schéma 2.9). Même si la réactivité moindre de l'alcool 6-OH était déjà connue,⁵ nous avons confirmée la régiosélectivité de cette benzylation par une étude RMN COSY qui sera discutée ultérieurement dans ce chapitre. Il est aussi pertinent de noter que l'alcool 6-OH ne réagit que très lentement (réaction incomplète après 7 jours) même en présence d'excès de chlorure de benzoyle (20 équivalents) dans la pyridine à température ambiante. Le traitement du composé **2.36** avec l'iodure d'allyle et le KHMDS a mené à la formation de l'éther allylique **2.37** dont la structure a été déterminée par RMN COSY d'un fragment obtenu par dégradation chimique du composé **2.37** (tel que discuté ultérieurement, voir Schéma 2.10). Le composé **2.37** a subi un clivage oxydatif par l'ozone pour donner l'aldéhyde **2.38**, puis une série d'aminations réductrices ont fournis les composés **2.39-2.44** (Figure 2.6). Après des déprotections usuelles, une série d'analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O6 **2.45-2.50** ont été obtenus. Les activités antibactériennes des composés **2.45-2.50** sont présentées au Tableau V.

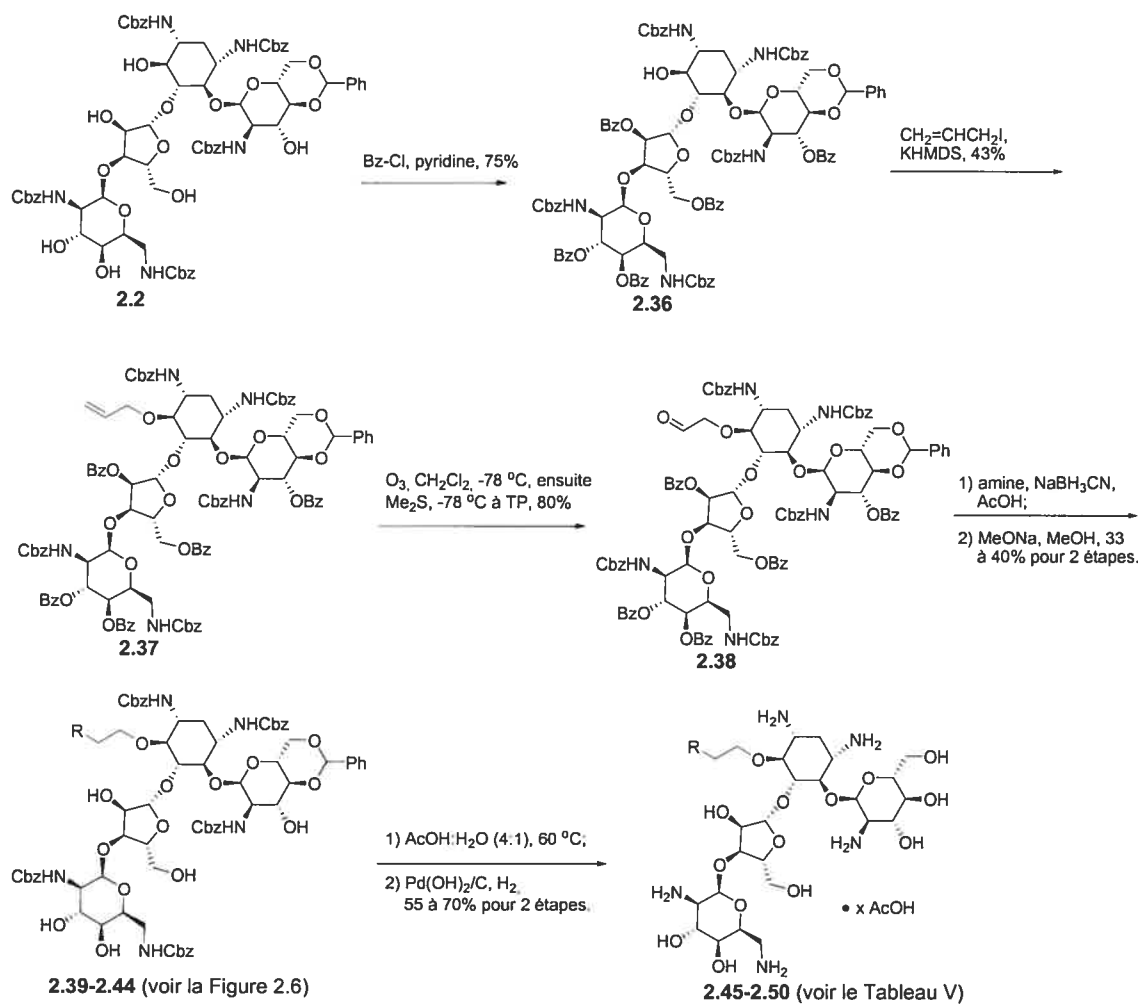
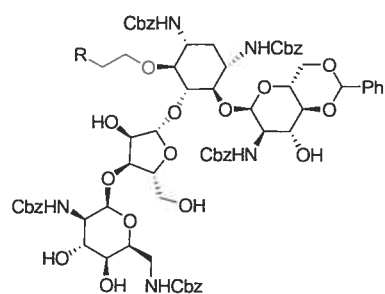


Schéma 2.9. Préparation des composés 2.45-2.50.



Composé	R	Composé	R	Composé	R
2.39		2.41		2.43	
2.40		2.42		2.44	

Figure 2.6. Chaînes latérales des composés 2.39-2.44.

Pour déterminer la position du groupement allyle que nous avons introduit sur le composé **2.37**, la dégradation chimique présentée au Schéma 2.10 a été réalisée. Le traitement du composé **2.37** avec une quantité catalytique de méthanolate de sodium dans le méthanol a fourni le composé **2.51** majoritairement (le faible rendement est dû à la purification difficile). La méthanolyse du composé **2.51** a fourni les fragments **2.52** et **2.53**. L'acétylation des alcools du pseudodisaccharide **2.52** a fourni le composé **2.54** et l'hydrogénolyse des groupements benzyloxycarbonyles a fourni le composé **2.55**. Le spectre RMN COSY du composé **2.55** (disponible dans la partie expérimentale) nous a permis de confirmer que le groupement allyle du composé **2.51** est à la position O6.

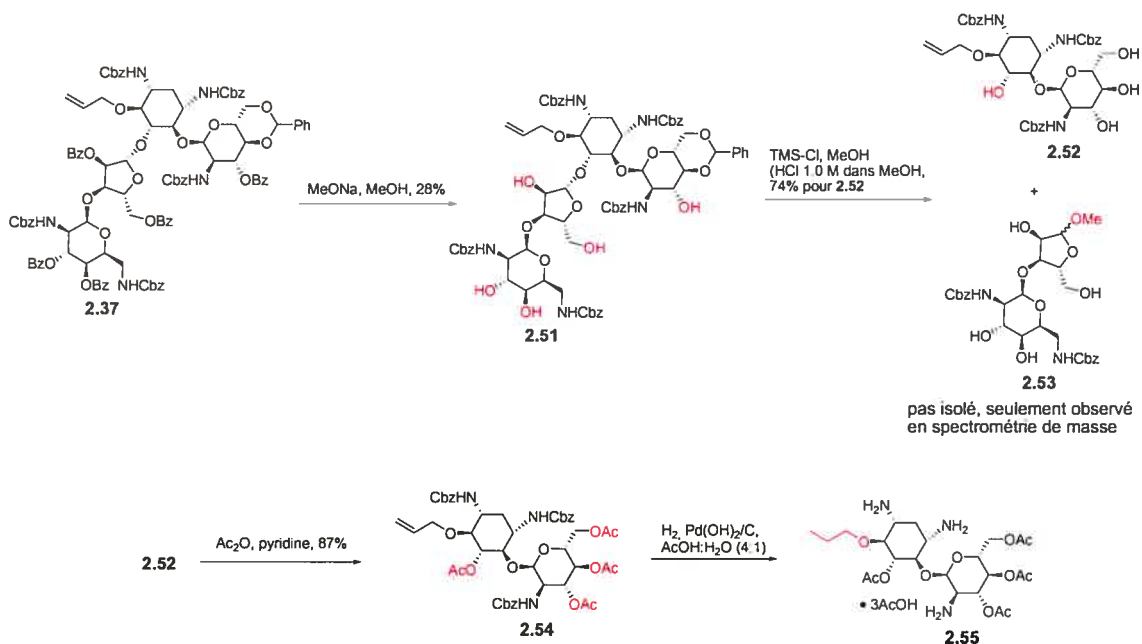
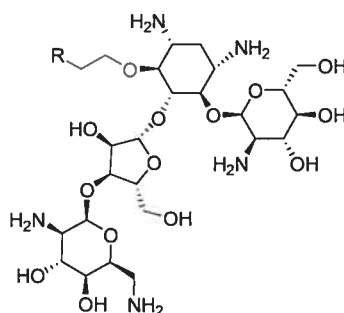


Schéma 2.10. Dégradation chimique du composé **2.37**.

2.4. Activités antibactériennes des analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O6.

Les activités antibactériennes déterminées par Isis Pharmaceuticals de certains analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O6 que nous avons préparés se sont avérées intéressantes (Tableau V). Cependant, la fonctionnalisation de la position O2'' de la paromomycine s'est avérée être une meilleure option que la fonctionnalisation de la position O6 et cette avenue n'a pas été explorée davantage. Les efforts ont plutôt été investis dans la préparation d'analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O2'' (voir prochaine section).



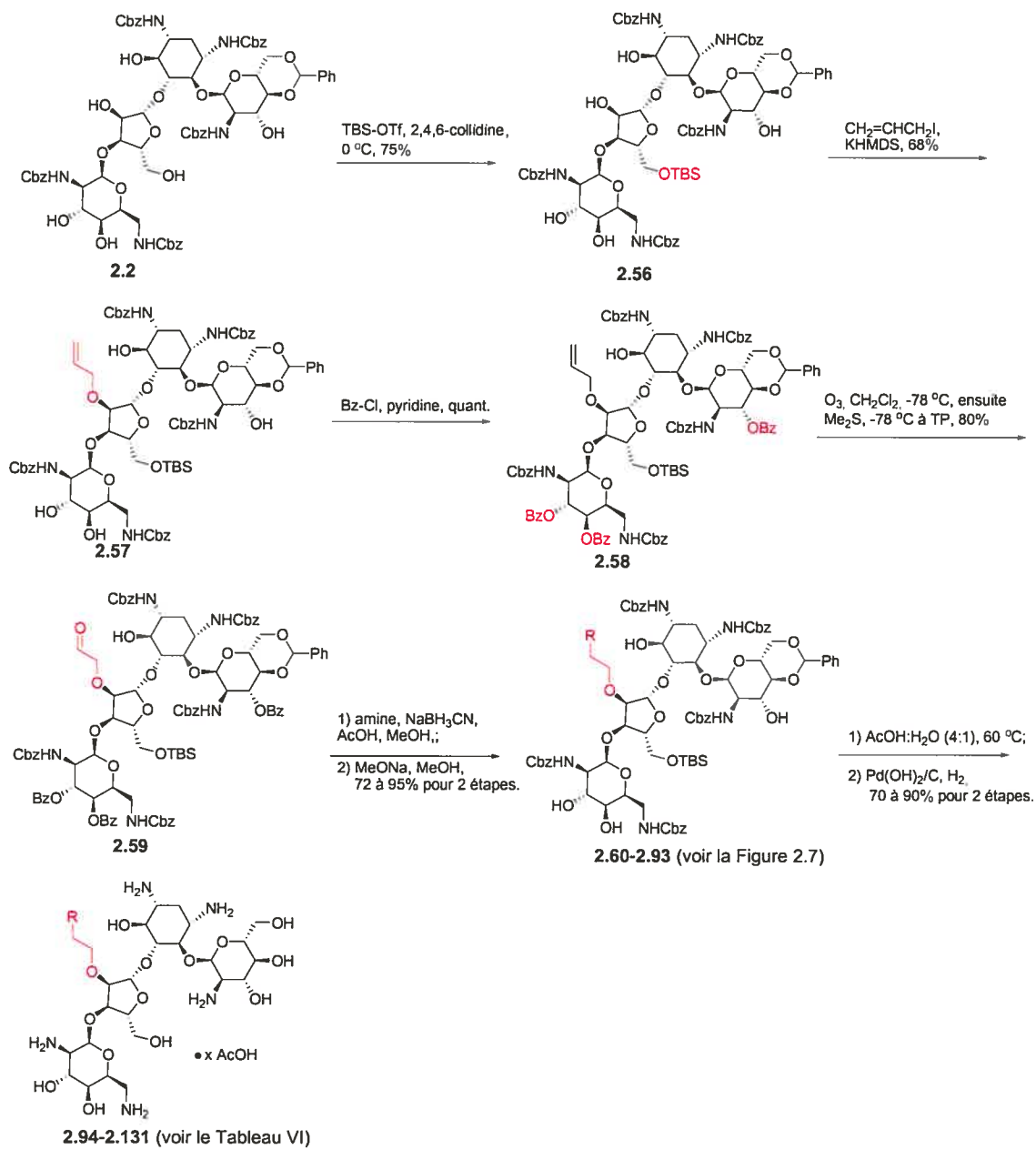
Composé	R	CIM	CIM
		$\mu\text{g/mL}$ <i>E. coli</i> ^a	$\mu\text{g/mL}$ <i>S. aureus</i>
Paromomycine (1.3)	-	3-6	1-2 ^b
2.45		16	1 ^c
2.46		8	1 ^c
2.47		>40	5-10 ^b
2.48		2.5-5	0.31-0.62 ^b
2.49		5-10	0.31-0.62 ^b
2.50		16	4 ^c

^a ATCC 25922; ^b ATCC 13709; ^c ATCC 29213.

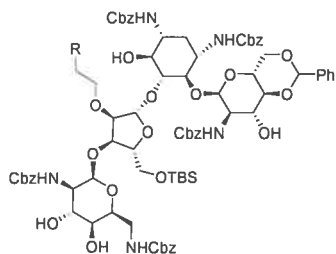
Tableau V. Activités antibactériennes des composés 2.45-2.50.

2.5. Préparation d'analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O2''.

Comme il a été expliqué au début de ce chapitre, nous étions aussi intéressé à fonctionnaliser la paromomycine à la position O2'' afin d'imiter certaines interactions observées entre le cycle III de la tobramycine et un modèle du site-A du ribosome procaryote. Pour arriver à modifier sélectivement la position 2''-OH, il a été nécessaire de protéger l'alcool primaire du composé **2.2**⁵ avec le trifluorométhanesulfonate de *tert*-butyldiméthylsilyle pour obtenir le composé **2.56** (Schéma 2.11). Ensuite, le composé **2.57** a été obtenu par l'allylation régiosélective de l'alcool 2''-OH avec l'iodure d'allyle en présence de KHMDS. Il est intéressant de noter que l'éther allylique **2.57** a été obtenu avec un bon rendement en seulement quatre étapes à partir de la paromomycine. Les groupements hydroxyles du composé **2.57** ont ensuite été protégés, excepté l'alcool 6-OH qui est moins réactif,¹⁹ par l'acylation avec le chlorure de benzoyle dans la pyridine pour donner le composé **2.58**. Le clivage oxydatif de l'alcène a fourni l'aldéhyde **2.59**. Une série d'aminations réductrices ont été réalisées pour obtenir les amines correspondantes, puis le traitement avec une quantité catalytique de méthanolate de sodium dans le méthanol a fourni les composés **2.60-2.93** (Figure 2.7). L'hydrolyse du benzyldène et de l'éther silylé en milieu acide, suivie de l'hydrogénolyse des groupements benzyloxy-carbonyles, a permis d'obtenir les analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O2'' **2.94-2.131**. Les activités antibactériennes des composés **2.94-2.131** sont présentées à la fin de ce chapitre (Tableau VI).



Sch\u00e9ma 2.11. Pr\u00e9paration des compos\u00e9s **2.94-2.131**.



Composé	R	Composé	R	Composé	R
2.60		2.72		2.84	
2.61	NMe ₂	2.73		2.85	
2.62		2.74		2.86	
2.63		2.75		2.87	
2.64		2.76		2.88	
2.65		2.77		2.89	
2.66		2.78		2.90	
2.67		2.79		2.91	
2.68		2.80		2.92	
2.69		2.81		2.93	
2.70		2.82			
2.71		2.83			

Figure 2.7. Chaînes latérales des composés 2.60-2.93.

La régiosélectivité de l'allylation du composé **2.56**, initialement déduite à partir du patron de fragmentation du composé **2.57** en spectrométrie de masse, a été appuyée par une étude des produits de sa dégradation chimique (Schéma 2.12). La méthanolyse du lien glycosidique du ribose a été réalisée pour obtenir les fragments **2.132** et **2.133**, ce qui nous a indiqué que le groupement allyle du composé **2.57** est sur les cycles III ou IV. Le clivage oxydatif du diol vicinal du composé **2.57**, suivi de l'élimination des cycles I, II et III ont permis d'obtenir le composé **2.134**, ce qui nous a indiqué que le groupement allyle est sur les cycles I, II ou III. En intégrant ces résultats, nous avons déterminé que le groupement allyle du composé **2.57** est sur le cycle III à la position O2". Cette conclusion a été confirmée par l'obtention subséquente de structures rayon X pour quelques analogues de la paromomycine de la série **2.94-2.131** (discuté à la section suivante).

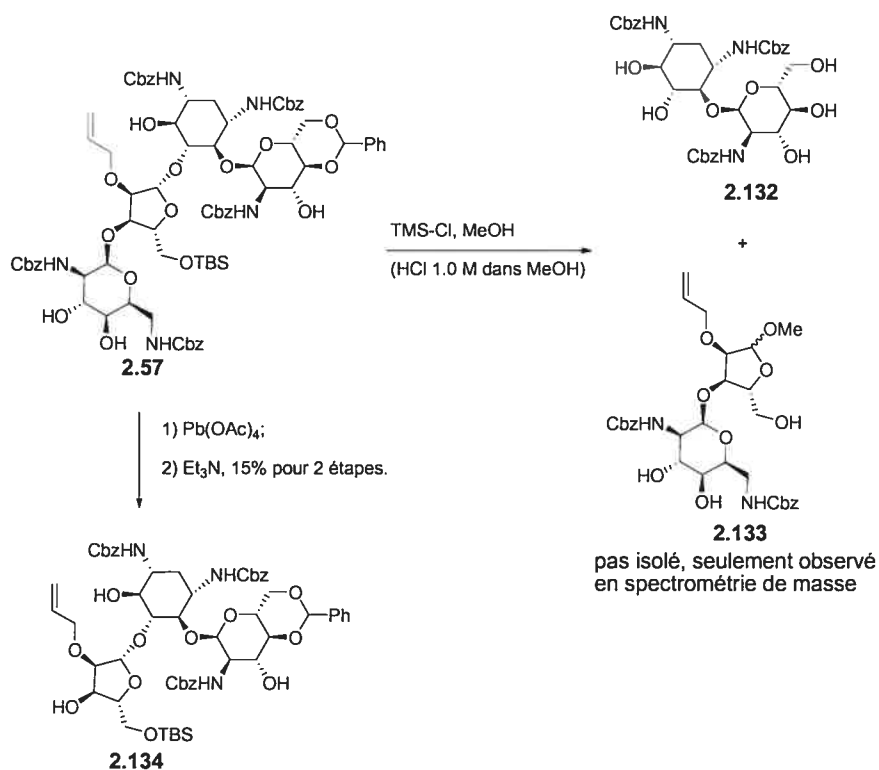


Schéma 2.12. Preuve de structure du composé **2.57** par dégradation chimique.

2.6. Exploration des limites d'un nouveau mode de liaison dans le site-A.

Les CIM déterminées par Isis Pharmaceuticals pour les premiers analogues de la paromomycine fonctionnalisés à la position O2'' qui ont été préparés (**2.94-2.98**) ont démontré des résultats surprenants (Tableau VI). Sauf pour quelques exceptions, ces dérivés inhibaient la croissance de *E. coli* et *S. aureus*. Pour étudier le mode de liaison possible avec le ribosome, nous avons soumis un échantillon de quelques uns de ces analogues au groupe du professeur Eric Westhof, qui se spécialise dans la co-cristallisation d'aminoglycosides dans un oligonucléotide modèle du site-A du ribosome procaryote. La structure rayon X de l'analogue **2.97** dans un modèle du site-A, obtenu par le groupe du professeur Eric Westhof, montre un mode de liaison similaire à la paromomycine pour les cycles I et II, avec l'expulsion caractéristique de A1492 et A1493 et les contacts invariables entre les cycles I et II avec l'ARNr (Figure 2.8a).¹⁹ De plus, un contact direct entre le groupement 6-OH de l'analogue **2.97** et l'atome O4 de U1406 s'ajoute à la liste alors que cette interaction est médiatisée par une molécule d'eau dans la paromomycine (Figure 2.8b).¹ Également, la paire non Watson-Crick U1406○U1495 n'est pas bifurquée comme c'est le cas dans tous les complexes aminoglycosides/site-A,^{1,2,21} mais adopte plutôt une géométrie plus commune avec deux ponts hydrogène directs (Figure 2.8b).²² L'oxygène dans le cycle III forme toujours un pont hydrogène intramoléculaire avec le groupement 2'-NH₂, comme c'est le cas avec le complexe de la paromomycine (Figure 2.8b). De plus, le groupement hydroxyle 5''-OH de **2.97** fait un pont hydrogène avec O6 de G1491, au lieu de N7 de G1491 comme c'est le cas avec la paromomycine (Figure 2.8b). Si on les compare à ceux de la paromomycine, les cycles III et IV de l'analogue **2.97** sont orientés différemment dans le modèle du site-A. Le motif β-D-ribofuranosyle est tourné de 40° par rapport aux cycles I et II, ce qui fait qu'avec le changement de conformation du ribose de C2''-endo dans la paromomycine à C3''-endo dans **2.97**, le changement d'orientation du cycle IV est de 90° (Figure 2.8c). À cause de la rotation du cycle III, le groupement 5''-OH fait un pont hydrogène médiatisé par une molécule d'eau supplémentaire avec N7 de 1408, ce qui fait que le résidu central A1408 fait maintenant trois contacts par ponts hydrogène avec l'analogue **2.97** au lieu des deux usuels. Un réseau de ponts hydrogène lie les cycles I et IV via le groupement 5''-OH, une molécule d'eau et A1408. L'ammonium terminal de

la chaîne latérale de l'analogue **2.97** est situé à l'extérieur de sillon majeur du site-A et ne forme aucun contact avec l'ARN. Cependant, l'ammonium à l'intérieur de la chaîne latérale de l'analogue **2.97** fait un contact supplémentaire, médiatisé par deux molécules d'eau, avec un phosphate anionique de U1406.

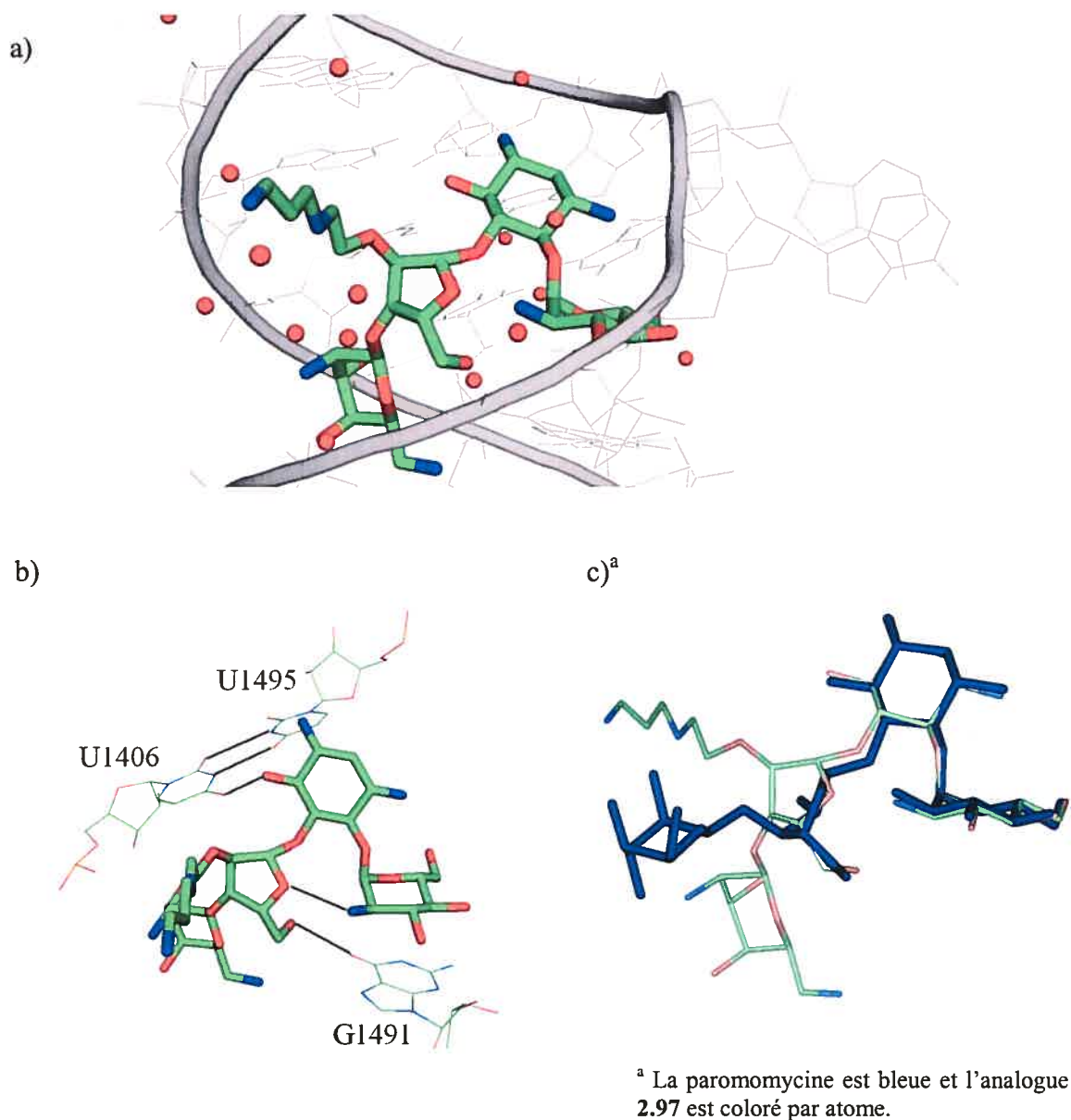


Figure 2.8. a) Structure rayon X de l'analogue **2.97** dans un oligonucléotide modèle du site-A; b) Interaction entre U1406 de l'analogue **2.97** et ponts hydrogène entre U1406 et U1495 en présence de l'analogue **2.97**; c) Changement d'orientation du cycle IV de 90° de l'analogue **2.97** par rapport à la paromomycine.

Voulant conserver le motif 1,3-diaminopropane présent dans la chaîne latérale de l'analogue **2.97**, nous avons préparé les analogues **2.99-2.101** (Figure 2.9). Par analogie, le motif 1,2-diaminoéthane de l'analogue **2.96** a été conservé lors de la préparation des analogues **2.102-2.105**. Les activités antibactériennes pour la plupart de ces analogues étaient comparables à celles de la paromomycine, ce qui nous a motivés à poursuivre dans cette direction.

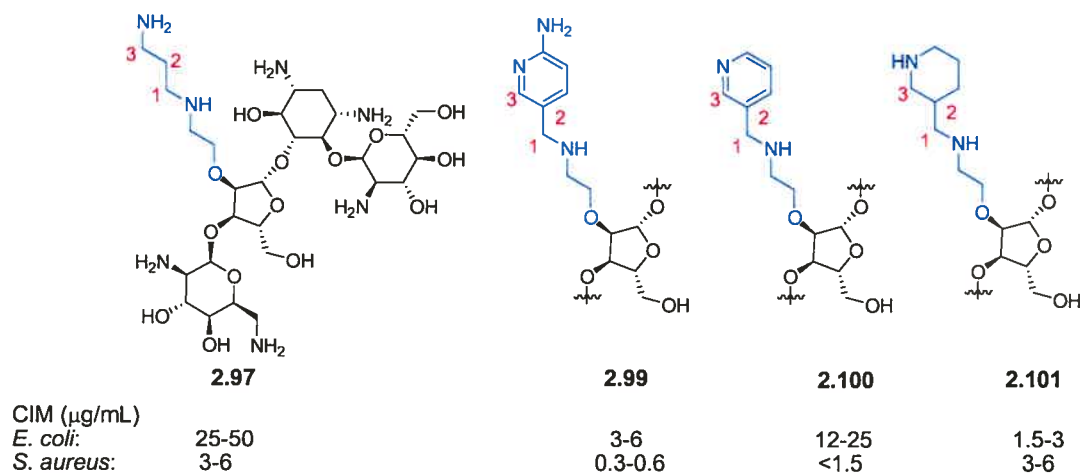


Figure 2.9. Variation du motif 1,3-diaminopropane dans la chaîne latérale à la position O2'' de la paromomycine.

La structure rayon X de l'analogue **2.100** dans un oligonucléotide modèle du site-A, obtenu par le groupe du professeur Eric Westhof, montre que la chaîne latérale sort complètement du sillon majeur du site-A et ne fait aucun contact avec l'ARN (Figure 2.10).²⁰ Sinon, les caractéristiques de la structure de l'analogue **2.100** sont identiques à celles observées avec l'analogue **2.97** qui sont décrites en détails aux deux pages précédentes.

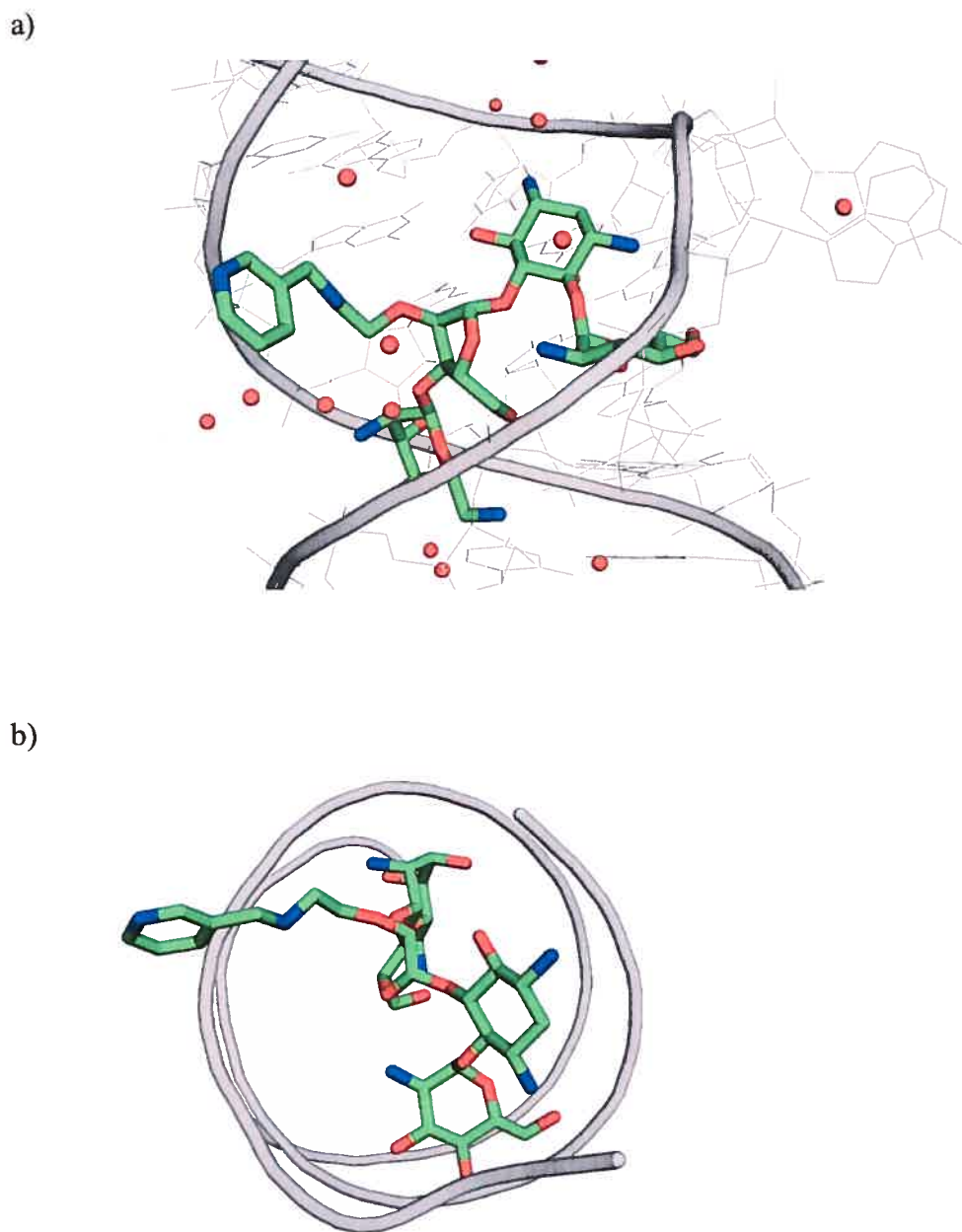


Figure 2.10. a) Structure rayon X de l'analogue 2.100 dans un oligonucléotide modèle du site-A. b) La chaîne latérale de l'analogue 2.100 sort à l'extérieur du sillon majeur de l'ARN.

Ces nouvelles conformations bioactives d'aminoglycosides ainsi que les changements observés dans les contacts avec l'ARN, provoqués par l'introduction d'une chaîne latérale à la position O2'', étaient sans précédent. Puisque la chaîne latérale sort du sillon majeur du site-A, une série d'analogues avec des chaînes latérales hydrophobiques et/ou plus volumineuses (2.106-2.119) ont été préparés (Figure 2.11).²³ Nous avons présumé que si ces chaînes latérales n'interagissent pas avec l'ARN, elles auraient probablement peu d'impact sur l'affinité de ces aminoglycosides semi-synthétiques pour le site-A. Cependant, nous avons pensé qu'elles auraient peut-être un impact sur l'affinité pour les enzymes qui désactivent les aminoglycosides et provoquent la résistance bactérienne, ou encore, sur les propriétés pharmacocinétiques de ces antibiotiques, qui sont généralement très polaires. Les études que nous avons réalisées concernant les enzymes désactivantes sont discutées aux Chapitres 3 et 4.

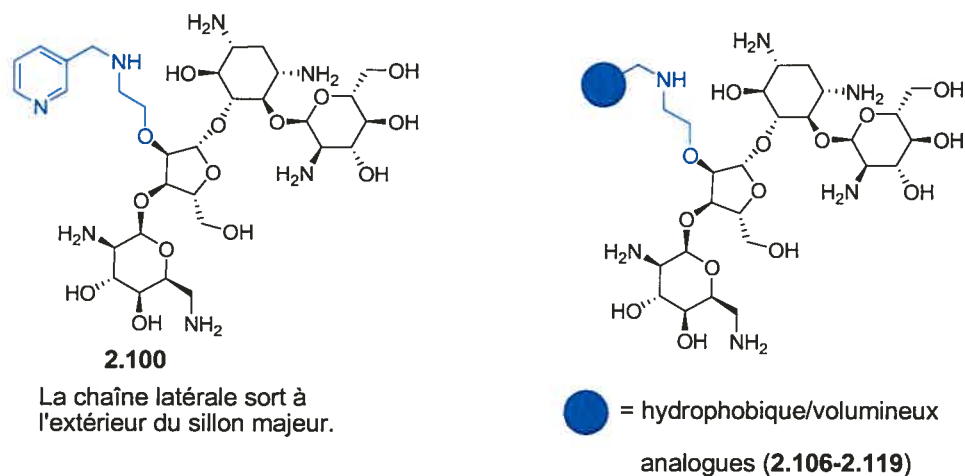


Figure 2.11. Variation de la chaîne latérale O2'' qui sort du sillon majeur.

L'introduction de groupement volumineux tels ceux des analogues **2.116-2.118** n'a pas eu d'effet dramatique sur l'activité antibactérienne, comme nous l'avions envisagé en analysant la structure rayon X de l'analogue **2.100**. Une relation entre la structure et l'activité intéressante pour les analogues avec des chaînes latérales ayant un phényle terminal (structures **2.106-2.110**) a montré que les motifs 2-phényléthylamino (analogue **2.108**) et 3-phénylpropylamino (analogue **2.109**) sont les plus actifs (Figure 2.12).

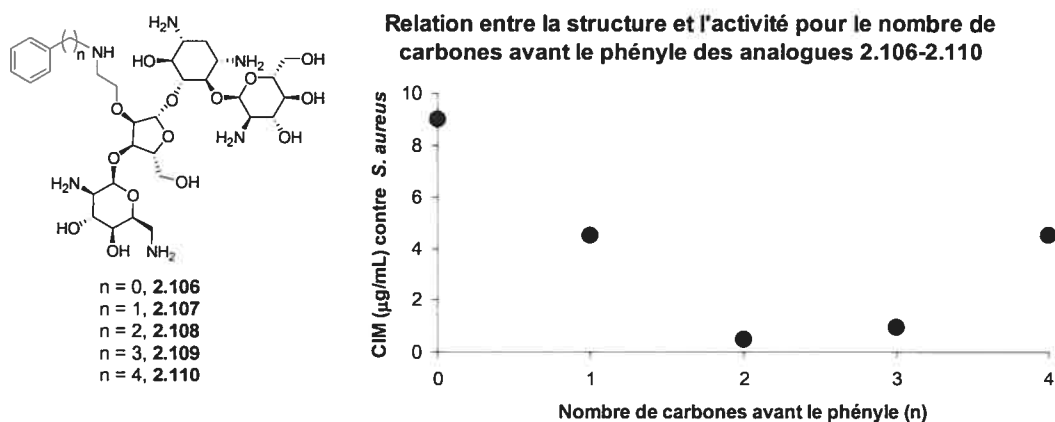


Figure 2.12. Relation entre la structure et l'activité de la chaîne latérale phénylalcaneamine (analogues **2.106-2.110**) à la position O2'' de la paromomycine.

L'effet de l'ajout de substituants du cycle aromatique du motif 2-phényléthyle a donc été entrepris en préparant les analogues **2.120-2.125**, ce qui nous a appris que le motif phényle sans substituant est le plus actif. Aussi, le remplacement du phényle de **2.108** par des hétérocycles (structures **2.126-2.127**), par un cycloalcane (structure **2.128**), ou par un alcane ramifié (structure **2.129**) se sont toutes avérées être des modifications qui diminuaient l'activité antibactérienne par rapport au phényle (structure **2.108**). Des structures rayon X ont été obtenues par le groupe du professeur Eric Westhof pour les analogues **2.108** et **2.113**, confirmant la généralité du nouveau mode de liaison observé pour ces aminoglycosides dans le site-A (Figure 2.13).

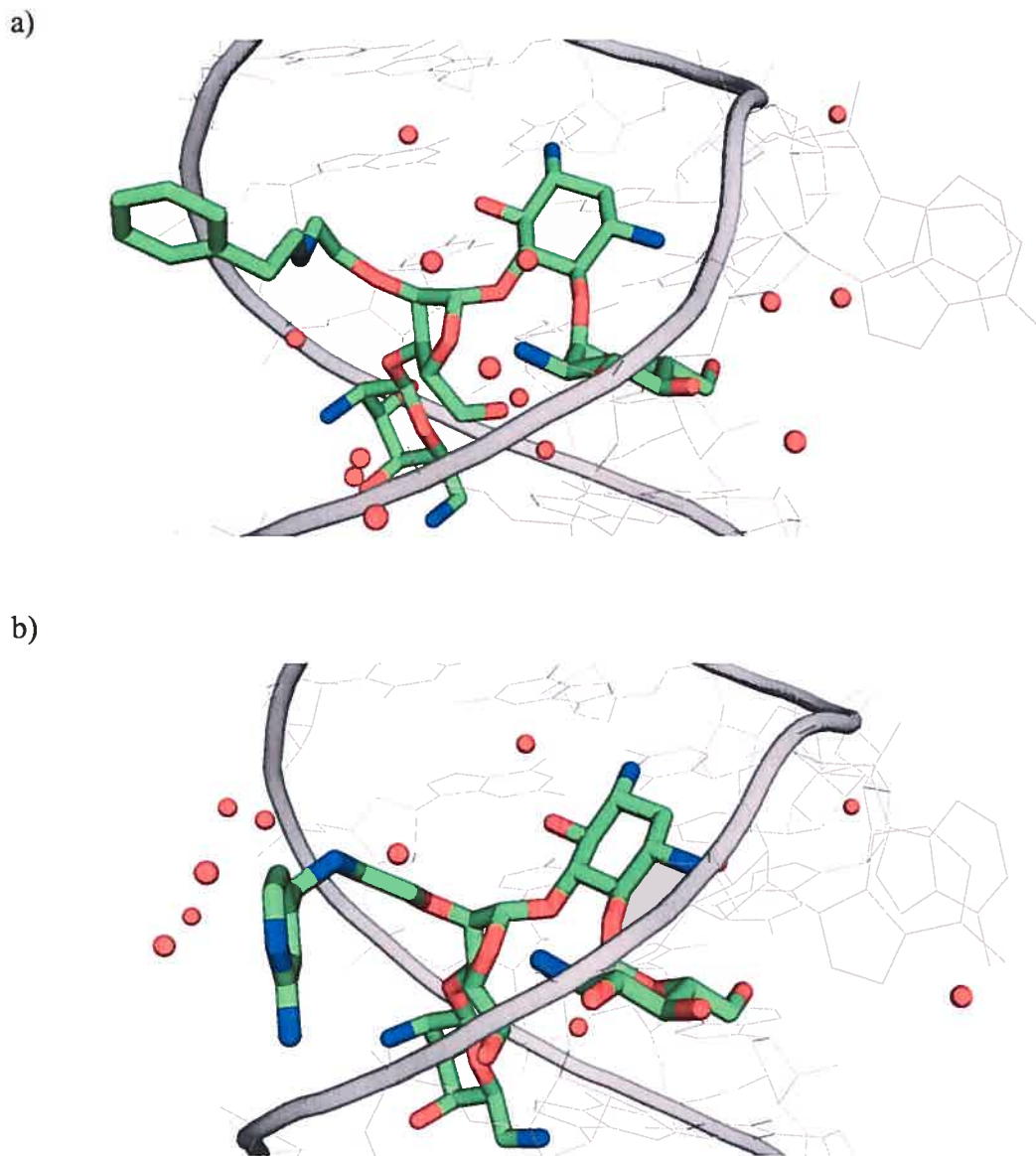


Figure 2.13. Structures rayon X des analogues 2.108 (a) et 2.113 (b) dans un oligonucléotide modèle du site-A.

L'introduction de groupements hydrophobiques chez des aminoglycosides semi-synthétiques qui ont une bonne activité antibactérienne a constitué un changement de paradigme dans ce domaine, puisque les chercheurs avaient l'habitude d'introduire des chaînes latérales polaires, souvent chargées positivement, pour engager des contacts supplémentaires avec l'ARN via des ponts hydrogène ou des interactions électrostatiques avec les phosphates. L'étude de l'importance de l'azote dans la chaîne latérale, qui contribue à l'hydrophilicité de ces chaînes, a donc été entreprise. Premièrement, la substitution de l'amine en amide a été effectuée pour l'analogue **2.108**. Les activités antibactériennes de l'acétamide **2.130** et de la benzamide **2.131** se sont tous deux avérées légèrement moins bonnes que celles de l'amine **2.108** (Tableau VI). Dans un deuxième temps, l'évaluation de l'importance de l'azote dans la chaîne latérale a été poursuivie par la préparation d'analogues dont l'amine a été remplacée par des motifs carbonés ou oxygénés. Puisque la relation entre la structure et l'activité des analogues **2.106-2.110** (Figure 2.12) montre que la chaîne latérale optimale a cinq ou six atomes de longueur avant le phényle terminal, nous étions particulièrement intéressé à obtenir les analogues **2.139** et **2.144** (Figure 2.14).

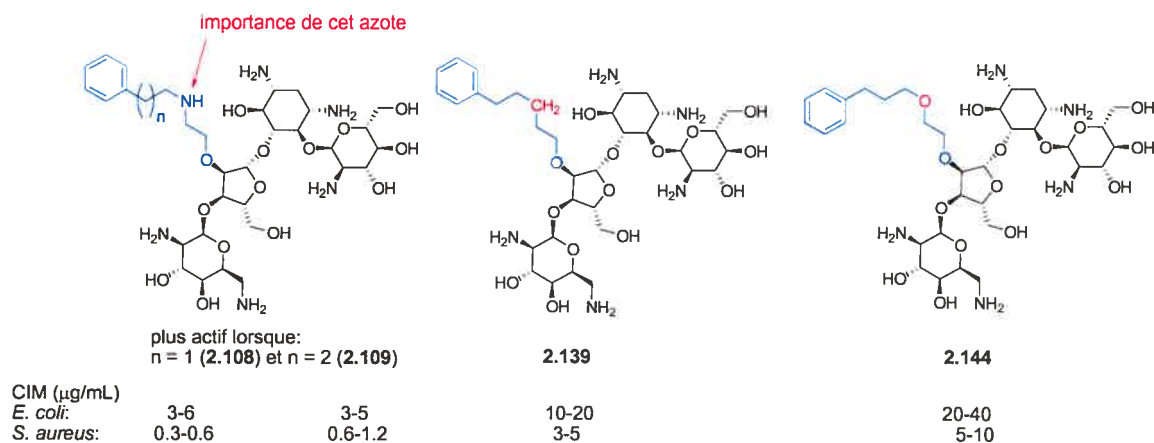


Figure 2.14. Analogues préparés (**2.139** et **2.144**) pour évaluer l'importance de l'azote dans la chaîne latérale des analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O2''.

Pour obtenir des analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O2'' avec des chaînes latérales carbonées, nous avons d'abord additionné un groupement phényle provenant du diphénylzinc sur l'aldéhyde **2.59** pour obtenir le composé **2.135** (Schéma 2.13). Le contrôle de la pression d'hydrogène utilisée lors de l'hydrogénolyse des groupements benzyloxycarbonyles nous a permis d'obtenir les composés **2.137** ou **2.138**. Les activités antibiotiques de ces analogues avec des chaînes latérales carbonées très courtes (**2.137** et **2.138**) sont moins bonnes que celle de la paromomycine (Tableau VII). L'analogue **2.139**, avec une chaîne de carbonée plus longue, a été obtenu par la déprotection du composé **2.136** qui a été obtenu par une réaction d'oléfination de Wittig entre l'aldéhyde **2.59** et le bromure de triphénylphosphonium de cinnamyle (Schéma 2.13). On remarque une baisse d'activité antibiotique pour l'aminoglycoside avec une chaîne latérale carbonée **2.139** (Tableau VII), si on le compare avec son analogue aminé **2.108** (Tableau VI). Cela indique donc que l'interaction entre l'azote de la chaîne latérale introduite à la position O2'' de la paromomycine et le phosphate de la base U1406, discutée pour l'analogue **2.97**, semble nécessaire pour maintenir une activité antibiotique appréciable. En effet, le réseau de ponts hydrogène entre l'azote de la chaîne latérale, quelques molécules d'eau et l'ARNr semble procurer une stabilisation importante de ces antibiotiques semi-synthétiques dans le site-A. Aussi, la charge positive de l'azote de la chaîne latérale contribue probablement à la stabilisation due aux interactions électrostatiques globales entre ces aminoglycosides et les phosphates de l'ARNr.

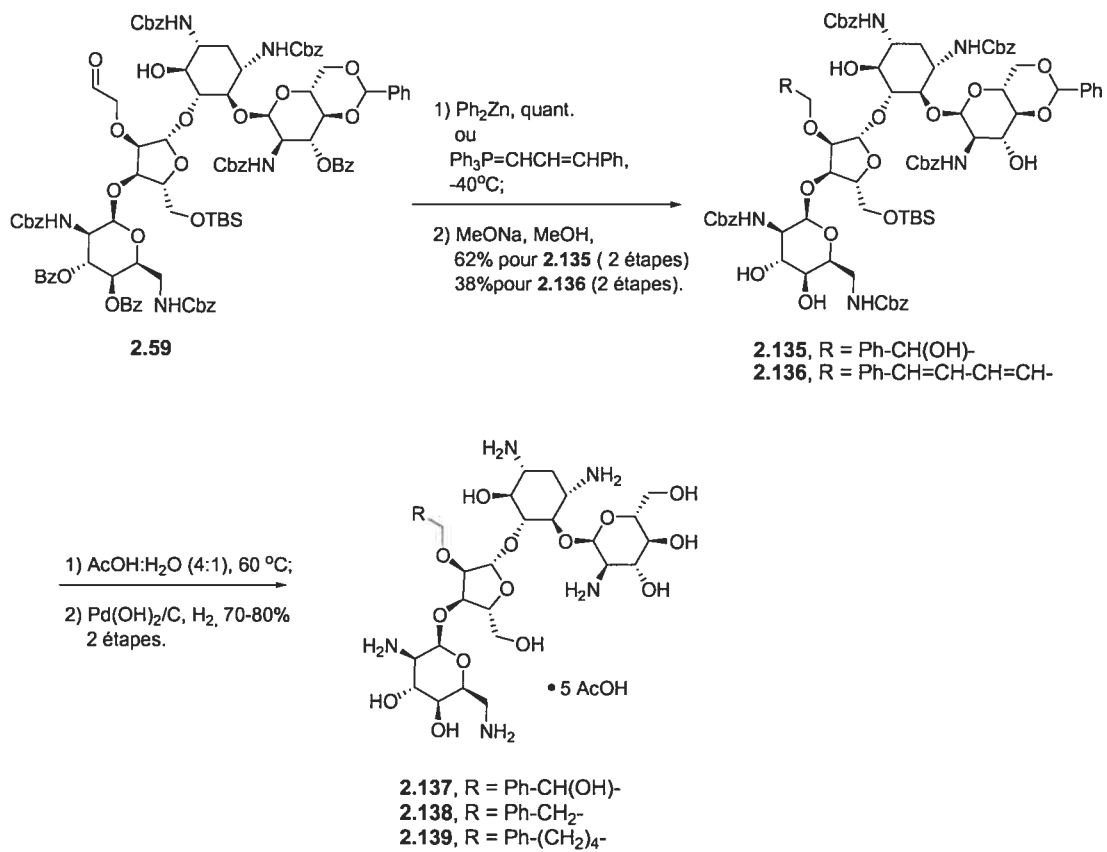


Schéma 2.13. Préparation des composés **2.137-2.139**.

L'analogue **2.141** avec une chaîne longue de trois carbones entre le phényle et l'aminoglycoside a été obtenu par deux voies synthétiques différentes. La première a commencé par l'alkylation sélective du composé **2.56** avec le bromure de cinnamyle en présence du KHMDS pour obtenir l'éther **2.140** (Schéma 2.14). Ce dernier a également été obtenu par la métathèse croisée de l'alcène **2.57** avec le styrène (Schéma 2.14). Les déprotections usuelles ont mené à l'obtention de l'analogue **2.141** qui s'est avéré moins actif que la paromomycine (Tableau VII).

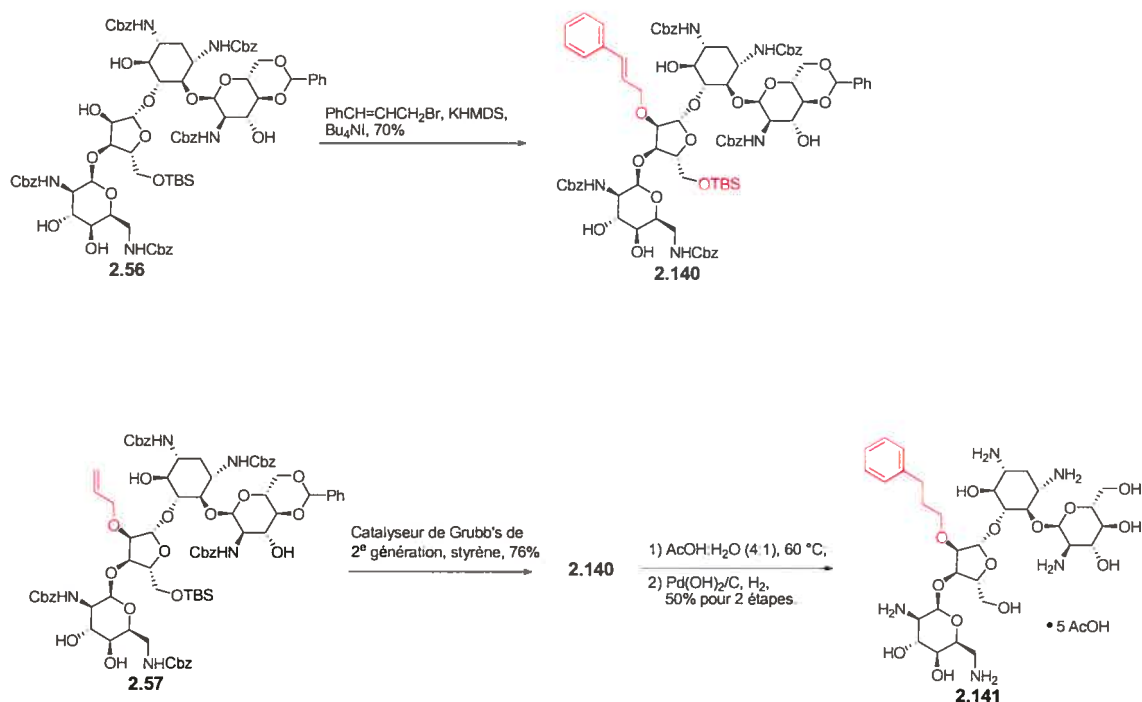


Schéma 2.14. Préparation du composé **2.141**.

Pour préparer des analogues avec des chaînes latérales oxygénées, la réduction de l'aldéhyde **2.59** nous a fourni l'alcool **2.142** (Schéma 2.15). L'alkylation de cet alcool avec le bromure de cinnamyle, suivi du traitement avec le méthanolate de sodium, a donné le composé **2.143**. Les déprotections usuelles ont fourni l'analogue **2.144**, alors que les mêmes réactions de déprotections ont donné l'analogue **2.146** à partir du composé **2.142**. Les activités antibactériennes déterminées par Isis Pharmaceuticals des composés **2.144** et **2.146** ont révélées qu'ils sont moins actifs que la paromomycine (Tableau VII). Tout comme l'analogue avec une chaîne latérale carbonée (**2.139**), l'analogue avec une chaîne latérale oxygénée (**2.144**) est moins actif que l'analogue avec

une chaîne latérale aminée (**2.109**), ce qui indique que la charge positive de l'azote de la chaîne latérale de ce dernier est important.

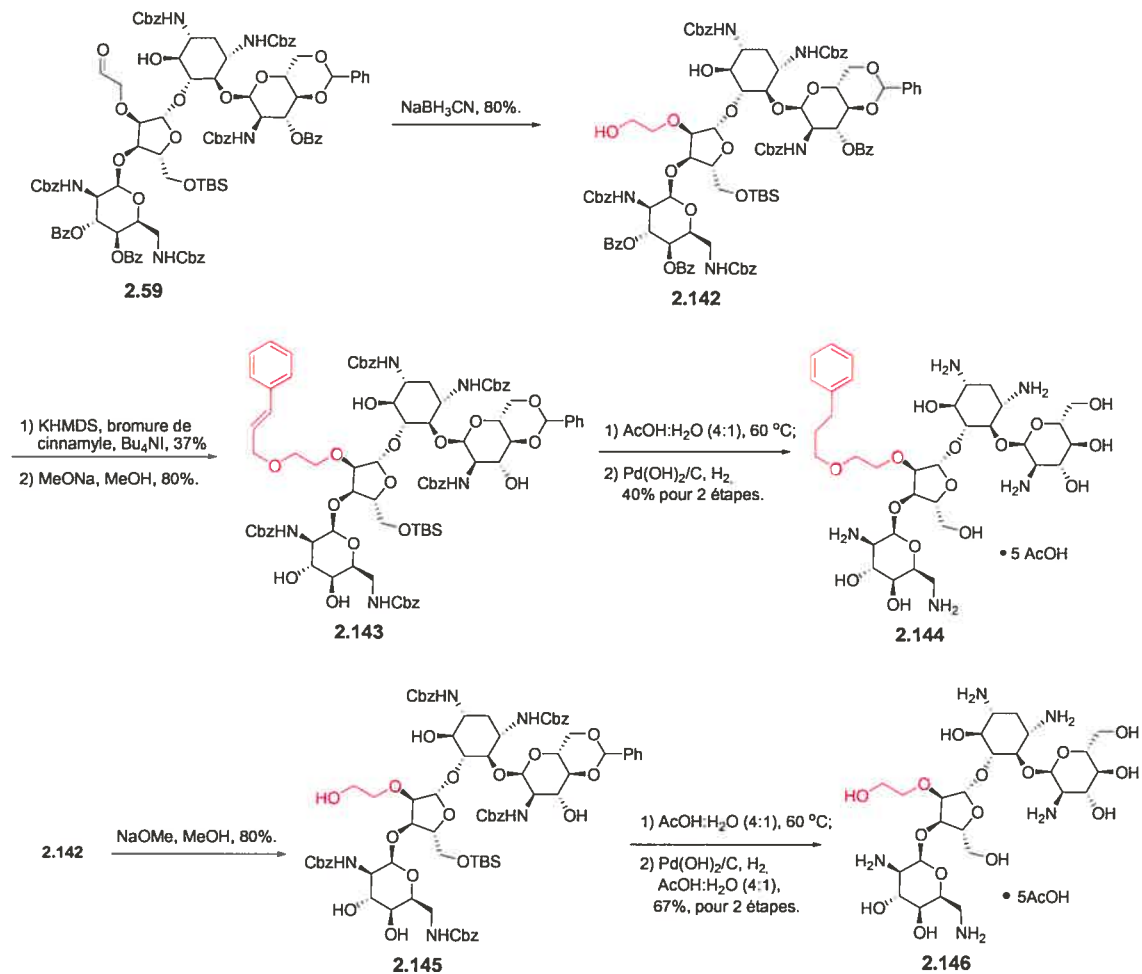


Schéma 2.15. Préparation des composés **2.144** et **2.146**.

Afin d'évaluer l'importance du cycle IV des analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O2'', certains analogues sans ce cycle ont aussi été préparés à partir du composé **2.134** (Schéma 2.16). Les groupements hydroxyles de ce polyol ont été protégés, excepté l'alcool 6-OH qui est moins réactif,¹⁹ par l'acylation avec le chlorure de benzoyle dans la pyridine pour donner le composé **2.147**. Le clivage oxydatif de l'alcène a fourni l'aldéhyde **2.148**, puis une série d'aminations réductrices ont été réalisées pour obtenir les amines **2.149-2.151**. Les déprotections usuelles ont permis d'obtenir les analogues de la paromomycine sans cycle IV fonctionnalisée à la position O2'' **2.152-2.154**. Les analogues avec une chaîne latérale chargée **2.152** et **2.153** conservent leurs activités antibactériennes (déterminées par Isis Pharmaceuticals) alors que celui avec une chaîne latérale hydrophobique **2.154** les perd (Tableau VIII), ce qui concorde avec certains arguments qui soutiennent que l'importance du cycle IV de la paromomycine est plutôt d'ordre électrostatique (deux groupements amines sont sur ce cycle).²⁴

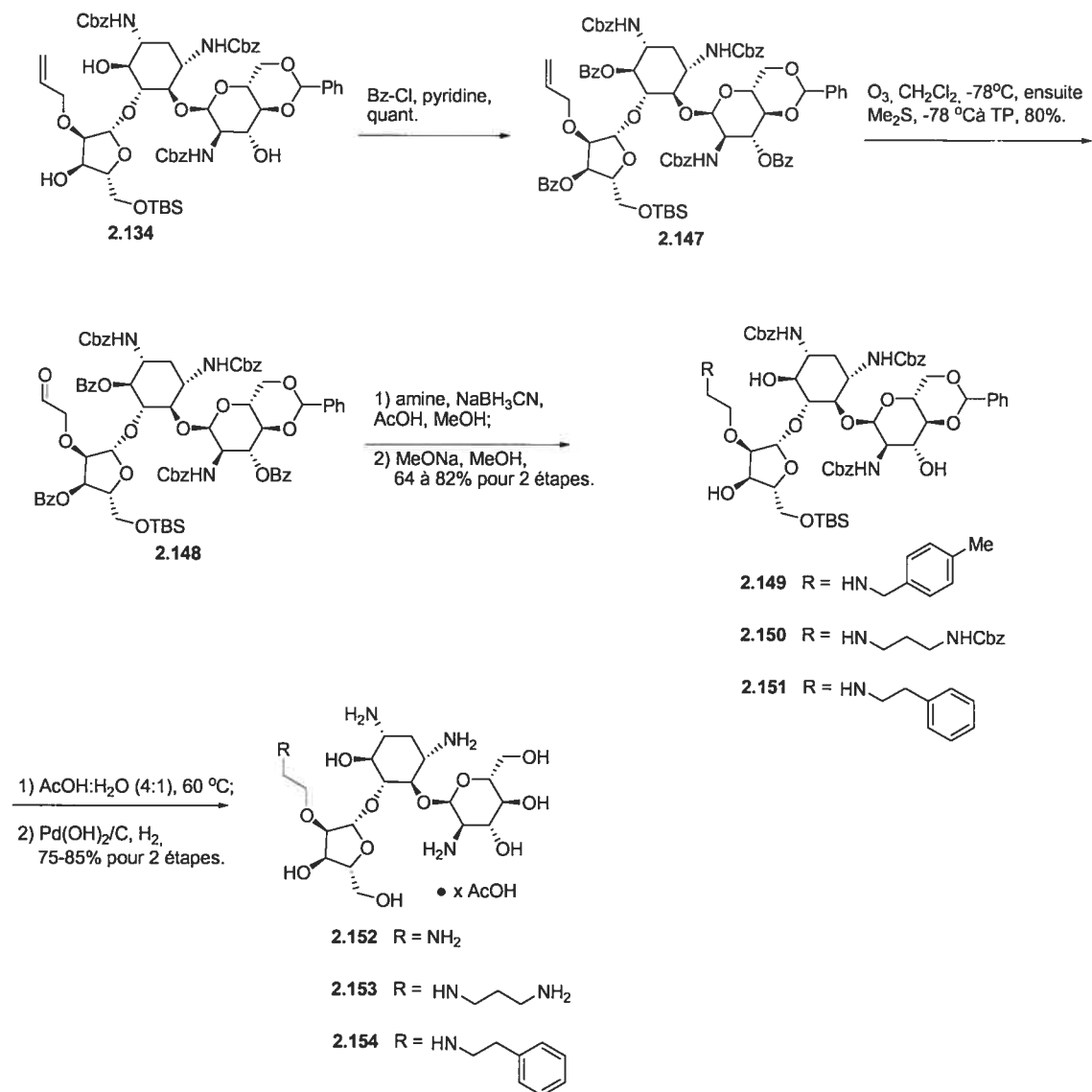
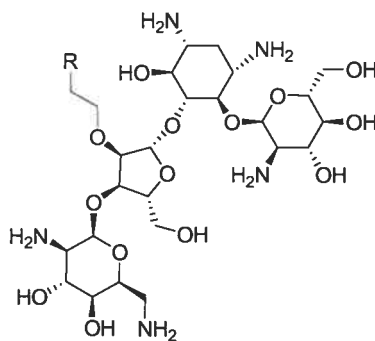



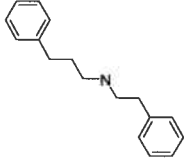
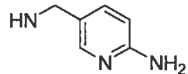
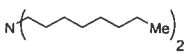
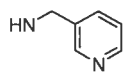
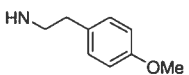
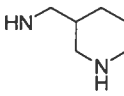
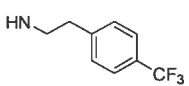
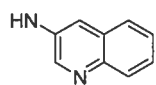
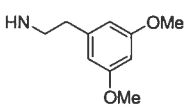
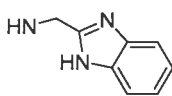
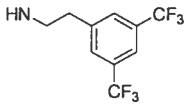
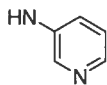
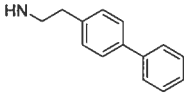
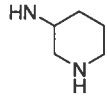
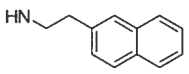
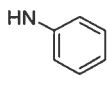
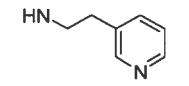
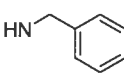
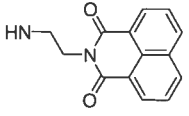
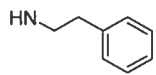
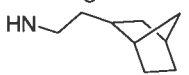
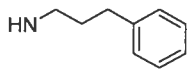
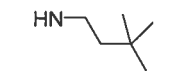
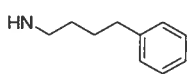
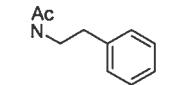
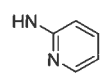
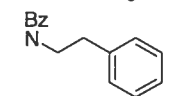
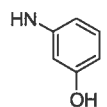
Schéma 2.16. Préparation des composés **2.152-2.154**.

2.7. Activités antibactériennes des analogues de la paromomycine fonctionnalisée à position O2''.

Tout d'abord, je remercie sincèrement la compagnie Isis Pharmaceuticals pour la détermination des activités antibactériennes. Les activités antibiotiques des analogues de la paromomycine fonctionnalisés à la position O2'' avec des chaînes latérales azotées **2.94-2.131** ainsi qu'avec des chaînes latérales carbonées ou oxygénées **2.137-2.139**, **2.141**, **2.144** et **2.146** discutées à la section précédente, sont résumées aux Tableaux VI et VII respectivement. Celles des analogues de la paromomycine fonctionnalisés à la position O2'' avec des chaînes latérales azotées, mais sans cycle IV, **2.152-2.154**, également discutées à la section précédente, sont résumées au Tableau VIII.

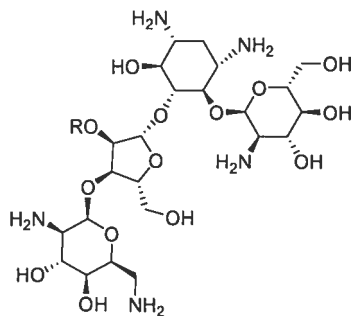


Compo- -sé	R	CIM		Compo- -sé	R	CIM	
		$\mu\text{g/mL}$ <i>E. coli</i> ^a	$\mu\text{g/mL}$ <i>S. aureus</i> ^b			$\mu\text{g/mL}$ <i>E. coli</i> ^a	$\mu\text{g/mL}$ <i>S. aureus</i> ^b
paromo- mycine (1.3)	-	3-6	1-2	2.113		6-12	0.6-1
2.94	NH ₂	12-25	2-3	2.114		3-6	3-5
2.95	NMe ₂	12-50	6-12	2.115		>10	1.25-2.5
2.96	HN-CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	6-12	2-3	2.116		20-40	1-3
2.97	HN-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	25-50	3-6	2.117		>10	2.5-5

2.98		25-50	2-3	2.118		10-20	0.6-1.2
2.99		3-6	0.3-0.6	2.119		5-10	1.2-2.5
2.100		12-25	<1.5	2.120		5-10	<0.6
2.101		1.5-3	3-6	2.121		5-10	0.6-1.2
2.102		12-25	1-2	2.122		10-20	5-10
2.103		>100	>100	2.123		>10	2.5-5
2.104		12-25	<1.5	2.124		20-40	5-10
2.105		1.5-3	3-6	2.125		10-20	1-3
2.106		50-100	6-12	2.126		12-25	<1.5
2.107		3-6	3-5	2.127		>40	10-20
2.108		3-6	0.3-0.6	2.128		>10	5-10
2.109		3-5	0.6-1.2	2.129		10-20	0.6-1
2.110		10-20	3-5	2.130 ^c		10-20	1-3
2.111		12-25	2-3	2.131 ^c		10-20	1-3
2.112		12-25	2-3				

^a ATCC 25922; ^b ATCC 13709; ^c obtenu par l'acylation du composé 2.72 avant les déprotections.

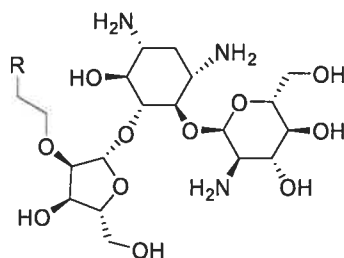
Tableau VI. Activités antibactériennes des composés 2.94-2.131.



Composé	R	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	
		<i>E. coli</i> ^a	<i>S. aureus</i> ^b
Paromomycine (1.3)	-	3-6	1-2
2.137		25-50	3-6
2.138		>50	6-12
2.139		10-20	3-5
2.141		20-40	3-5
2.144		20-40	5-10
2.146	H	12-25	12-25

^a ATCC 25922; ^b ATCC 13709.

Tableau VII. Activités antibactériennes des composés 2.137-2.139, 2.141, 2.144 et 2.146.



Composé	R	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	
		<i>E. coli</i> ^a	<i>S. aureus</i> ^b
Paromomycine (1.3)	-	3-6	1-2
1.3 sans cycle IV	-	>100	>100
2.152	NH ₂	6-12	12-25
2.153	HN-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	6-12	6-12
2.154	HN-CH ₂ -CH ₂ -C ₆ H ₅	>100	12-25

^a ATCC 25922; ^b ATCC 13709.

Tableau VIII. Activités antibactériennes des composés 2.152-2.154.

Le potentiel des analogues **2.100** et **2.108** à protéger des souris infectées par *S. aureus* à également été entrepris par Isis Pharmaceuticals (Tableau IX). Les résultats qu'ils ont obtenus montrent que les souris infectées survivent lorsqu'elles sont traitées avec ces aminoglycosides semi-synthétiques, ce qui est très prometteur pour l'avenir des analogues de la paromomycine fonctionnalisée à position O2''.

Composé	Nombre de souris moribonde/Nombre total de souris (dosage mg/Kg)									
	(0.13)	(0.25)	(0.50)	(1.2)	(2.3)	(4.7)	(9.4)	(19)	(38)	(75)
2.100	7/10	6/10	3/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
2.108	5/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	4/10

^a Les composés **2.100** et **2.108** ont été administrés une heure et trois heures après l'infection avec *S. aureus* (ATCC 13709) selon le dosage indiqué.

Tableau IX. Protection offerte par les composés **2.100** et **2.108** pour des souris infectées par *S. aureus*.^a

2.8. Conclusion pour le Chapitre 2.

La préparation d'aminoglycosides hybrides en fonctionnalisant la position O2'' de la paromomycine en tentant d'occuper l'espace normalement occupé par cycle III de la tobramycine n'a pas permis d'atteindre cet espace. En effet, les structures rayon X des analogues **2.97**, **2.100**, **2.108** et **2.113** dans un oligonucléotide modèle du site-A, obtenues par le groupe du professeur Eric Westhof, ont révélé que les chaînes latérales introduites à la position O2'' de la paromomycine sortent plutôt à l'extérieur du sillon majeur de l'ARNr. Toutefois, la fonctionnalisation de la position O2'' de la paromomycine a mené à la découverte d'aminoglycosides qui se lient au site-A du ribosome procaryote avec un mode de liaison jamais observé auparavant. L'exploration des limites de ce nouveau mode de liaison a été réalisée par le design et la préparation d'analogues de la paromomycine qui ont démontré des activités antibactériennes égales sinon meilleures à celles de la paromomycine. L'efficacité réelle de ces nouveaux aminoglycosides semi-synthétiques a été démontrée par l'évaluation du potentiel des analogues **2.100** et **2.108** à protéger des souris infectées par *S. aureus* par la compagnie Isis Pharmaceuticals.

Comme il a été mentionné dans l'introduction, l'objectif principal des modifications structurelles des aminoglycosides comme la paromomycine est d'élargir leur spectre d'action aux bactéries qui sont devenues résistantes à cause de la mauvaise utilisation de ces antibiotiques. Une modification structurelle des aminoglycosides qui nuirait à l'action néfaste des enzymes désactivantes pourrait redonner aux aminoglycosides leurs activités antibactériennes contre certaines souches de bactéries résistantes d'importance clinique. L'impact de la fonctionnalisation de la paromomycine sur l'affinité pour l'APH(3)-IIIa, une des enzymes désactivantes les plus importantes, est discuté aux Chapitres 3 et 4.

2.9. Références pour le Chapitre 2.

- 1) Vicens, Q.; Westhof, E. Crystal Structure of Paromomycin Docked Into the Eubacterial Ribosomal Decoding A-Site. *Structure* **2001**, *9*, 647-658.
- 2) Vicens, Q.; Westhof, E. Crystal Structure of a Complex Between the Aminoglycoside Tobramycin and an Oligonucleotide Containing the Ribosomal Decoding A-Site. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 747-755.
- 3) Sannes-Lowery, K. A.; Griffey, R. H.; Hofstadler, S. A. Measuring Dissociation Constants of RNA and Aminoglycoside Antibiotics by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Biochem.* **2000**, *280*, 264-271.
- 4) Hanessian, S.; Tremblay, M.; Swayze, E. E. Tobramycin Analogues with C-5 Aminoalkyl Ether Chains Intended to Mimic Rings III and IV of Paromomycin. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 983-993.
- 5) (a) Hanessian, S.; Takamoto, T. Aminoglycoside Antibiotics: Chemical Transformation of Paromomycin Into a Bioactive Pseudotrisaccharide. *Tetrahedron Lett.* **1974**, *46*, 4009-4012; (b) Hanessian, S.; Takamoto, T.; Massé, R.; Patil, G. Aminoglycoside Antibiotics: Chemical Conversion of Neomycin B, Paromomycin, and Lividomycin B Into Bioactive Pseudosaccharides. *Can. J. Chem.* **1978**, *56*, 1482-1491; (c) Hanessian, S.; Masse, R.; Ekborg, G. Aminoglycoside Antibiotics: the Formation and Characterization of Dihydrooxazine Derivatives in the Paromomycin Series. *Can. J. Chem.* **1978**, *56*, 1492-1499.
- 6) Hanessian, S.; Massé, R.; Campeau, M. L. Aminoglycoside Antibiotics: Synthesis of 5''-amino-5''-deoxyneomycin and 5''-amino-5''-deoxyparomomycin. *J. Antibiot.* **1977**, *30*, 893-895.

- 7) Kudyba, I.; Fernandez, D. P.; Boettger, E. C.; Vasella, A. Synthesis of Paromomycin Derivatives Modified at C(5') to Selectively Target Bacterial rRNA. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 499-519.
- 8) Fridman, M.; Belakhov, V.; Yaron, S.; Baasov, T. A New Class of Branched Aminoglycosides: Pseudo-Pentasaccharide Derivatives of Neomycin B. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3575-3578.
- 9) Fridman, M.; Belakhov, V.; Lee, L. V.; Liang, F.; Wong, C.; Baasov, T. Dual Effect of Synthetic Aminoglycosides: Antibacterial Activity Against *Bacillus anthracis* and Inhibition of Anthrax Lethal Factor. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 447-452.
- 10) Kirk, S. R.; Luedtke, N. W.; Tor, Y. Neomycin-Acridine Conjugate: A Potent Inhibitor of Rev-RRE Binding. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 980-981.
- 11) Blount, K. F.; Tor, Y. A Tale of Two Targets: Differential RNA Selectivity of Nucleobase-Aminoglycoside Conjugates. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1612-1621.
- 12) Alper, P. B.; Hendrix, M.; Sears, P.; Wong, C. Probing the Specificity of Aminoglycoside-Ribosomal RNA Interactions with Designed Synthetic Analogs. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1965-1978.
- 13) Hanessian, S.; Adhikari, S.; Szychowski, J.; Pachamuthu, K.; Wang, X.; Migawa, M. T.; Griffey, R. H.; Swayze, E. E. Probing the Ribosomal RNA A-site with Functionally Diverse Analogues of Paromomycin-Synthesis of Ring I Mimetics. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 827-846.
- 14) Pathak, R.; Böttger, E. C.; Vasella, A. Design and Synthesis of Aminoglycoside Antibiotics to Selectively Target 16S Ribosomal RNA Position 1408. *Helv. Chim. Acta* **2005**, *88*, 2967-2985.

- 15) Ding, D.; Hofstadler, S. A.; Swayze, E. E.; Risen, L.; Griffey, R. H. Design and Synthesis of Paromomycin-Related Heterocycle-Substituted Aminoglycoside Mimetics Based on a Mass Spectrometry RNA Binding Assay. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3409-3412.
- 16) Greenberg, W. A.; Priestley, E. S.; Sears, P. S.; Alper, P. B.; Rosenbohm, C.; Hendrix, M.; Hung, S.; Wong, C. Design and Synthesis of New Aminoglycoside Antibiotics Containing Neamine as an Optimal Core Structure: Correlation of Antibiotic Activity with in Vitro Inhibition of Translation. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 6527-6541.
- 17) Hanessian, S.; Tremblay, M.; Kornienko, A.; Moitessier, N. Design, Modeling and Synthesis of Functionalized Paromamine Analogs. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 3255-3265.
- 18) Wang, J.; Li, J.; Tuttle, D.; Takemoto, J. Y.; Chang, C. T. The Synthesis of L-Aminosugar and the Studies of L-Pyranoses on the Ring III of Pyranmycins. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3997-4000.
- 19) Battistini, C.; Franceschi, G.; Zarini, F.; Cassinelli, G.; Arcamone, F. Semisynthetic Aminoglycoside Antibiotics. IV 3',4'-dideoxyparomomycin and Analogues. *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 98-101.
- 20) François, B.; Szychowski, J.; Adhikari, S. S.; Pachamuthu, K.; Swayze, E. E.; Griffey, R. H.; Migawa, M. T.; Westhof, E.; Hanessian, S. Antibacterial Aminoglycosides with a Modified Mode of Binding to the Ribosomal-RNA Decoding Site. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6735-6738.
- 21)(a) Kondo, J.; François, B.; Russell, R. J.; Murray, J. B.; Westhof, E. Crystal Structure of the Bacterial Ribosomal Decoding Site Complexed with Amikacin Containing the γ -amino- α -hydroxybutyryl (haba) Group. *Biochimie* **2006**, *88*, 1027-

- 1031; (b) François, B.; Russell, R. J.; Murray, J. B.; Aboul-ela, F.; Masquida, B.; Vicens, Q.; Westhof, E. Crystal Structures of Complexes Between Aminoglycosides and Decoding A-site Oligonucleotides: Role of the Number of Rings and Positive Charges in the Specific Binding Leading to Miscoding. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 5677-5690; (c) Vicens, Q.; Westhof, E. Crystal Structure of Geneticin Bound to a Bacterial 16 S Ribosomal RNA A-Site Oligonucleotide. *J. Mol. Biol.* **2003**, *326*, 1175-1188.
- 22) Leontis, N. B.; Westhof, E. Geometric Nomenclature and Classification of RNA Base Pairs. *RNA* **2001**, *7*, 499-512.
- 23) Hanessian, S.; Szychowski, J.; Adhikari, S. S.; Vasquez, G.; Kandasamy, P.; Swayze, E. E.; Migawa, M. T.; Ranken, R.; François, B.; Wirmer-Bartoschek, J.; Kondo, J.; Westhof, E. Structure-Based Design, Synthesis and A-site rRNA Co-Crystal Complexes of Functionally Novel Aminoglycoside Antibiotics: C2'' Ether Analogues of Paromomycin. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2352-2369.
- 24) Cashman, D. J.; Rife, J. P.; Kellogg, G. E. Which Aminoglycoside Ring is Most Important for Binding? A Hydrophobic Analysis of Gentamicin, Paromomycin, and Analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 119-122.

Chapitre 3
Aminoglycosides semi-synthétiques pour sonder
l'enzyme désactivante APH(3')-IIIa

3.1. Mécanisme et structure rayon X de l'APH(3')-IIIa.

Comme il a été mentionné Chapitre 1, certaines enzymes de la famille des aminoglycosides phosphotransférases (APH) ont une implication clinique majeure dans la résistance aux antibiotiques aminoglycosidiques.^{1,2} L'APH(3')-IIIa, isolée en 1994 par Wright *et al.*,³ est l'APH qui a été la plus étudiée jusqu'à maintenant à cause de son aptitude à désactiver une grande variété d'aminoglycosides utilisés en milieu hospitalier.

Il a été démontré qu'en présence de l'APH(3')-IIIa, les aminoglycosides de la classe B, comme la kanamycine A (1.7), sont phosphorylés à la position O3' (Figure 3.1a).³ Après avoir remarqué que la lividomycine A est phosphorylée bien qu'elle n'ait pas de groupement 3'-OH, il a été confirmé que les aminoglycosides de la classe A sont phosphorylés à la position O3' et/ou O5''.^{4,5} Par exemple, la paromomycine (1.3) et la néomycine B (1.4) sont phosphorylées deux fois par l'APH(3')-IIIa (Figure 3.1b). L'étude RMN des structures de l'amikacine, membre de la classe B, et de la butirosine, membre de la classe A, liées à l'APH(3')-IIIa a démontré que l'alcool 3'-OH est le seul qui puisse s'approcher de l'ATP pour les aminoglycosides de la classe B, alors que les fonctions 3'-OH et 5''-OH peuvent le faire pour les membres de la classe A.⁶ Ces résultats ont révélé l'origine de la grande variété d'aminoglycosides ciblés par cette enzyme.

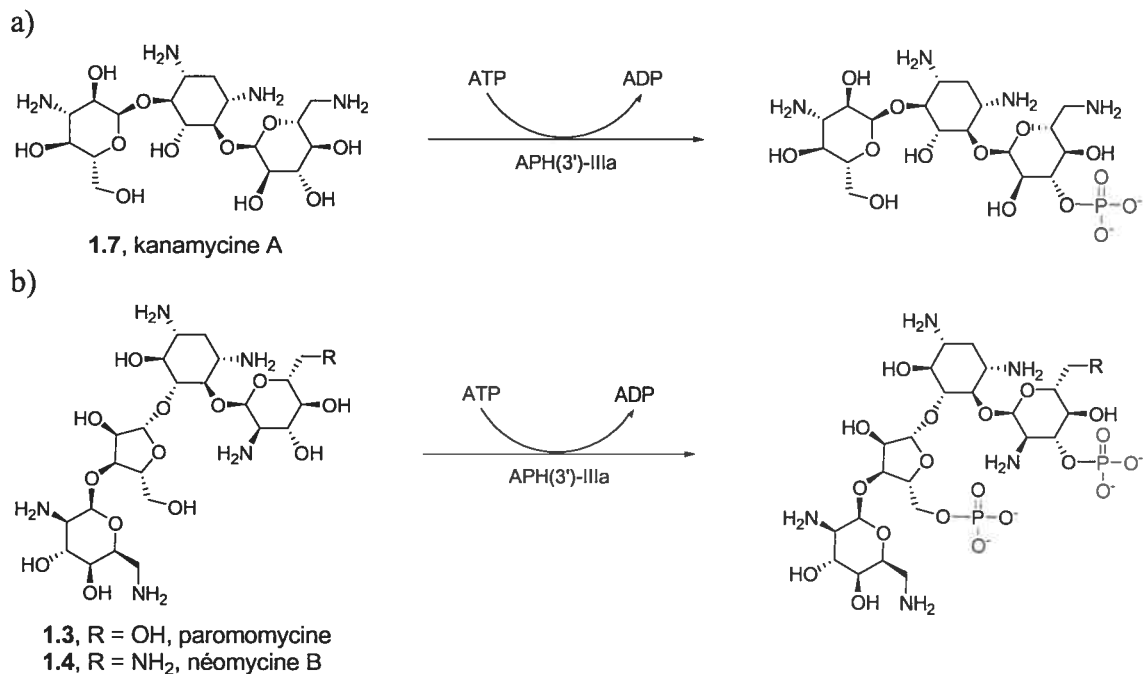
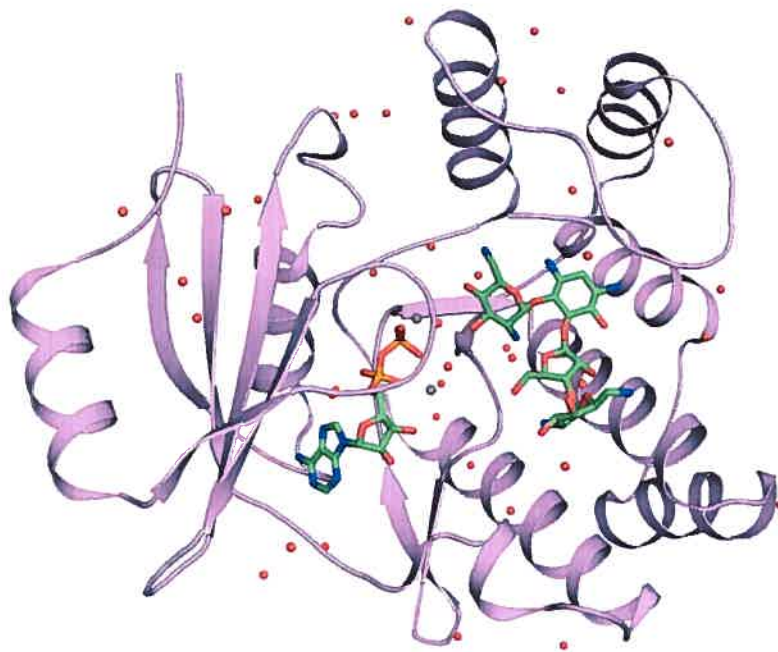


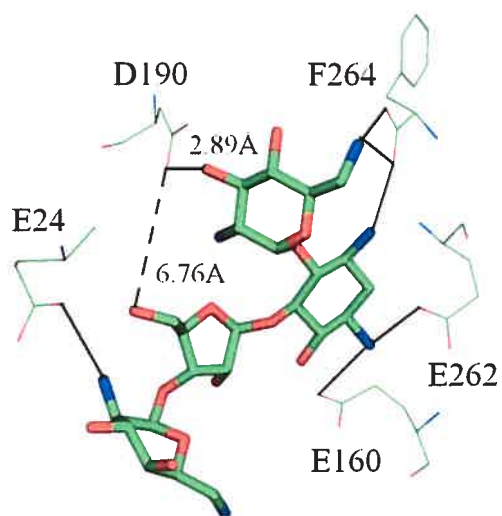
Figure 3.1. Phosphorylation des aminoglycosides par l'APH(3')-IIIa. a) Mono-phosphorylation des aminoglycosides de la classe B. b) Bis-phosphorylation des aminoglycosides de la classe A.⁵

Les structures rayon X de complexes tertiaires formés de l'APH(3')-IIIa, de l'ADP et de la kanamycine A (1.7) ou de la néomycine B (1.4) ont été publiées en 2002 par Berghuis *et al.* (Figure 3.2a).⁷ Ces structures démontrent que les aminoglycosides interagissent avec l'enzyme surtout par des forces électrostatiques. En effet, on constate que la néomycine B, qui est une molécule poly-cationique, interagit avec les résidus anioniques E157, E160, D190, E230, D261, E262 ainsi qu'avec le groupement carboxylate terminal de F264 (Figures 3.2b-c). L'aspartate 190 interagit avec le groupement 3'-OH (2.89Å entre 3'-OH et le carboxylate de E190, voir Figure 3.2b) ce qui est en accord avec l'hypothèse formulée par Hon *et al.*⁸ comme quoi E190 agirait en tant que base générale en déprotonant l'alcool 3'-OH (Figure 3.3a). Par contre, E190 est trop loin de l'alcool 5''-OH de la néomycine B (6.76Å, voir Figure 3.2b) pour qu'il soit considéré comme base générale lors de la phosphorylation de ce groupement hydroxyle.

a)



b)



c)

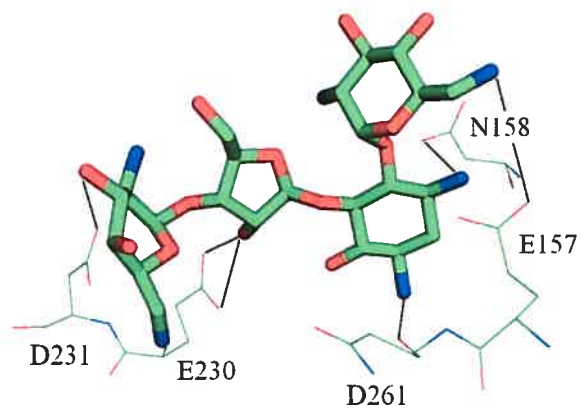
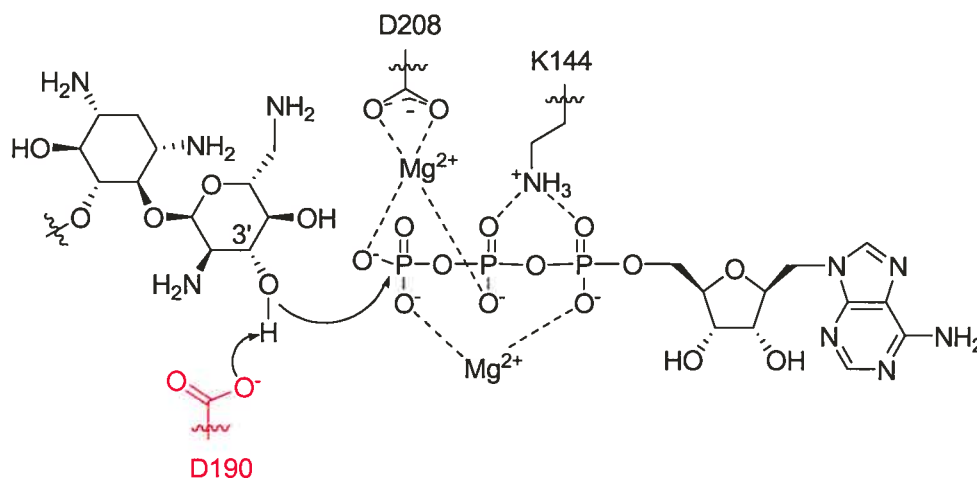


Figure 3.2. a) Structure rayon X du complexe tertiaire formé de l'APH(3')-IIIa, de l'ADP et de la néomycine B; b-c) Interactions entre la néomycine B et l'APH(3')-IIIa.⁷

Des études effectuées par Wright *et al.*^{9,10} ont permis d'élucider que le mécanisme de la liaison des aminoglycosides avec l'APH(3')-IIIa est de type séquentiel. Tel qu'illustré à la Figure 3.3b, l'ATP se lie à l'enzyme avant l'aminoglycoside (représenté par S pour substrat) et le départ de l'ADP, qui quitte la protéine après le départ de l'aminoglycoside phosphorylé (représenté par P pour produit), constitue l'étape limitante.

a)



b)

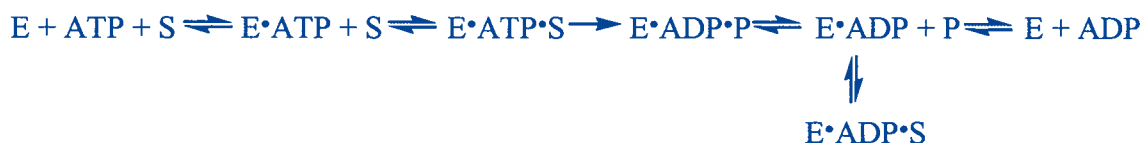
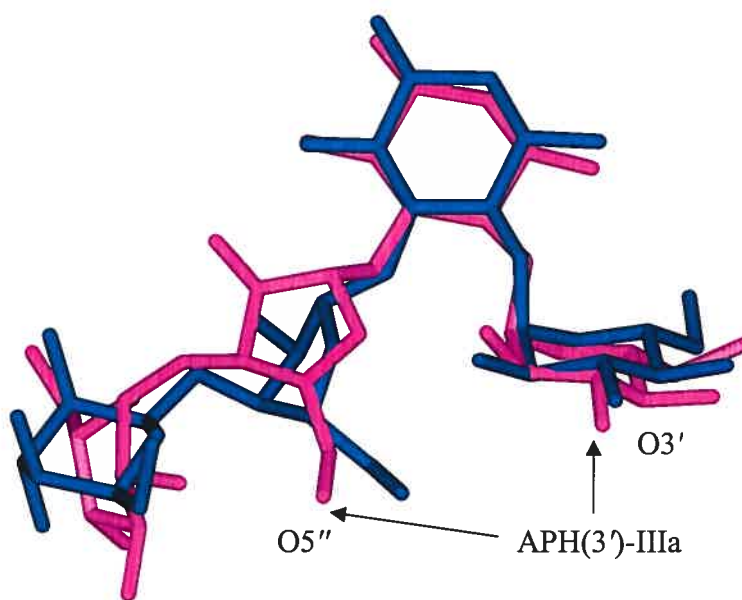


Figure 3.3. (a) Mécanisme de l'APH(3')-IIIa;^{8,11} (b) Mécanisme de la liaison des aminoglycosides avec l'APH(3')-IIIa.^{9,10}

Une structure rayon X d'un analogue de l'ATP lié à l'APH(3')-IIIa est en accord avec le mécanisme de la phosphorylation de la position O3' des aminoglycosides catalysée par l'enzyme initialement proposé par Hon *et al.*⁸ Cette structure rayon X a aussi permis de préciser les interactions entre l'ATP et l'APH(3')-IIIa et de clarifier le mécanisme de la phosphorylation des aminoglycosides catalysée par l'APH(3')-IIIa.¹¹

Comme on peut le constater en regardant la structure rayon X de la néomycine B (1.4) liée à l'APH(3')-IIIa, la majorité des interactions entre la néomycine B et l'enzyme sont faites par les cycles I et II de l'aminoglycoside (Figures 3.2b-c), ce qui est également vrai pour les interaction entre l'ARNr et la paromomycine (1.3) (voir Chapitre 1). Aussi, la comparaison des structures rayon X de la paromomycine liée au site-A¹² avec celle de la néomycine B liée à l'APH(3')-IIIa⁷ révèle que les conformations des aminoglycosides sont très similaires, et ce malgré la grande flexibilité de ces pseudo tétra-saccharides (Figure 3.4). En réalité, les seules différences notables sont le changement d'orientation des cycles III et IV.

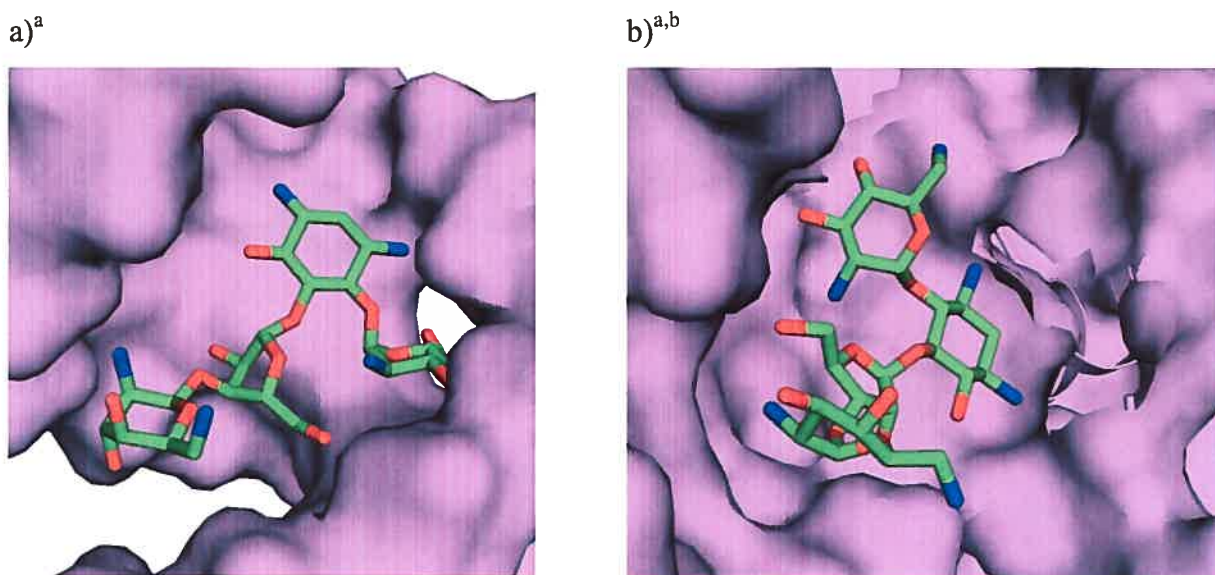


^a La paromomycine est bleue, la néomycine est magenta.

Figure 3.4. Superposition des structures rayon X de la paromomycine dans un modèle du site-A du ribosome procaryote sur celle de la néomycine B liée à l'APH(3')-IIIa.^{a,7,12}

3.2. Design d'analogues macrocycliques de la paromomycine.

En comparant les structures rayon X de la paromomycine liée au site-A¹² avec celle de la néomycine B liée à l'APH(3')-IIIa,⁷ on peut remarquer une différence majeure. Les interactions de van der Waals entre l'antibiotique et l'ARNr sont sur la face opposée de l'aminoglycoside si on les compare aux interaction entre l'antibiotique et l'APH(3')-IIIa. En effet, il a été remarqué par Berghuis *et al.* que la face de l'antibiotique qui interagit avec l'ARNr n'est pas la même que celle qui interagit avec l'enzyme désactivante (Figure 3.5).⁷ Puisque l'activité antibiotique provient de la liaison avec le site-A du ribosome procaryote, nous avons envisagé de modifier la paromomycine en laissant cette face accessible tout en en bloquant l'autre face de la paromomycine, celle qui interagit avec l'APH(3')-IIIa. De cette manière nous avons tenté d'empêcher la désactivation de l'aminoglycoside par l'APH(3')-IIIa.



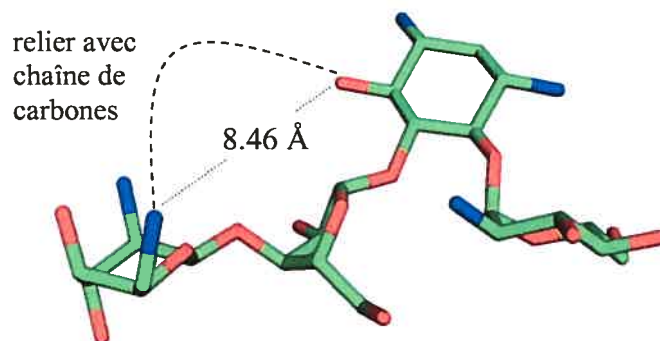
^a Pour des raisons de clarté, il y a une rotation d'environ 180° entre l'image montrée en a) et celle montrée en b). ^b Afin de simplifier la visualisation, la surface des résidus M26 et N158 n'est pas illustrée.

Figure 3.5. Les interactions de van der Waals entre l'ARNr et la paromomycine sont sur la face opposée à celles entre l'APH(3')-IIIa et la néomycine B. a) Paromomycine liée à l'ARNr;¹² b) Néomycine liée à l'APH(3')-IIIa.⁷

La totalité des structures rayon X d'aminoglycosides liés à l'ARNr¹²⁻¹⁴ ainsi que celles des aminoglycosides liés aux enzymes désactivantes disponibles à ce jour montrent que cette observation est générale. Alors, que ce soit dans une ANT,¹⁵ une AAC^{16,17} ou des APHs,^{7,18} la face de l'aminoglycoside qui interagit avec ces enzymes est toujours opposée à celle qui interagit avec le site-A du ribosome procaryote. Cela nous a permis d'envisager que bloquer une face de la paromomycine pourrait non seulement empêcher l'APH(3')-IIIa de la désactiver, mais pourrait aussi empêcher sa désactivation par les ANTs et les AACs.

En observant la topologie de la paromomycine dans sa conformation bioactive,¹² nous avons considéré l'orientation spatiale des fonctions 6-OH et 6'''-NH₂ afin de les relier en construisant des motifs macrocycliques qui bloqueraient une face de cette molécule. Puisque la distance entre O6 et N6''' est de 8.46 Å dans sa conformation bioactive, nous avons choisi de relier les positions O6 et N6''' de la paromomycine avec une chaîne carbonée d'au moins cinq carbones (Figure 3.6). Pour réaliser cet objectif, nous avons choisi d'appliquer la réaction de fermeture de cycle par métathèse¹⁹ aux aminoglycosides pour la première fois. Nous étions particulièrement intéressés à vérifier si des analogues macrocycliques de la paromomycine, comme **3.1** ou **3.2**, permettraient une protection de la face normalement exposée à l'APH(3')-IIIa. Avant de discuter de la préparation de ces analogues macrocycliques, voyons d'autres aminoglycosides macrocycliques qui ont fait l'objet de publications récentes.

a)



b)

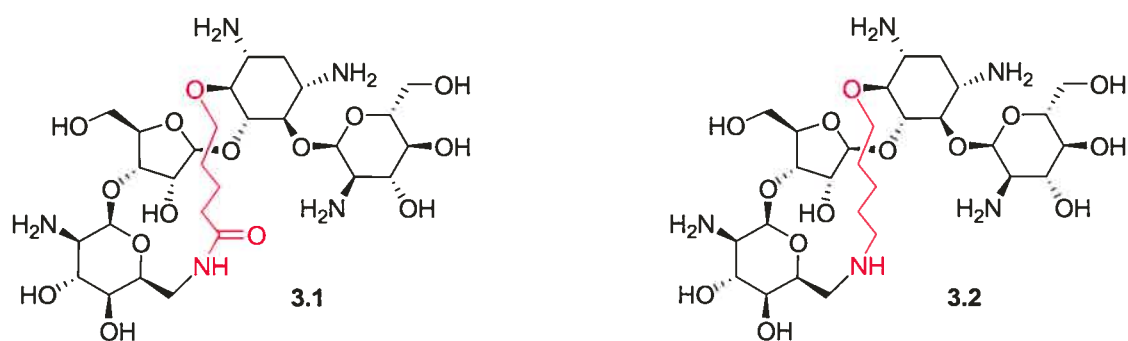


Figure 3.6. Sélection de groupements fonctionnels de la paromomycine pour le design d'aminoglycosides macrocycliques. a) Liaison des positions O6 et N6''' de la paromomycine; b) Structures initialement retenues pour étudier l'impact de la topologie de la paromomycine sur la reconnaissance de l'aminoglycoside par l'ARNr et l'APH(3')-IIIa

3.3. Exemple choisis dans la littérature décrivant la préparation d'aminoglycosides macrocycliques.

Récemment, d'autres groupes de recherches ont préparé des analogues conformationnellement figés de la néomycine B (1.4) en reliant les positions 2'-NH₂ et O5''. Tor *et al.*²⁰ ont figé l'aminoglycoside dans la conformation qu'il adopte lorsqu'il est lié au site-A du ribosome procaryote dans le but d'augmenter son affinité pour ce dernier par rapport à d'autres sites de liaison possibles pour les aminoglycosides, comme certains ARN viraux.²¹ Pour réaliser cet objectif, les amines de la néomycine B ont été protégées pour donner le composé 3.3 et l'alcool primaire a été activé avec le chlorure de sulfonyle du triisopropylbenzène (TIBS-Cl) pour fournir le composé 3.4 (Schéma 3.1). La déprotection des amines avec l'acide trifluoroacétique suivi du traitement avec la triéthylamine ont permis une cyclisation intramoléculaire pour fournir le macrocycle 3.5.

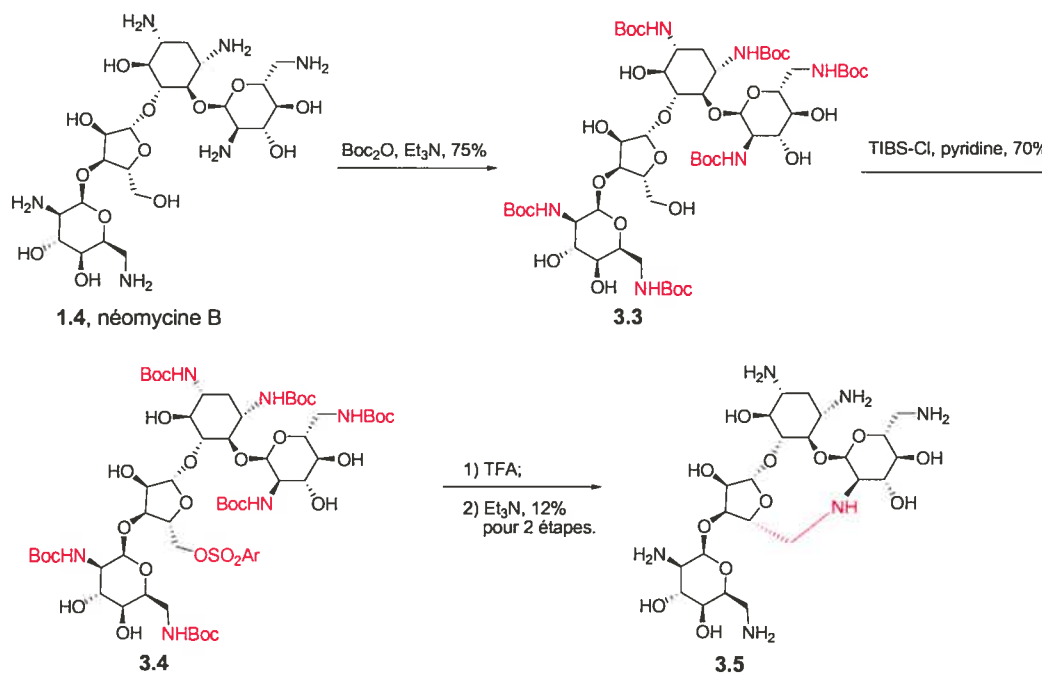


Schéma 3.1. Liaison directe entre les positions N2' et C5'' de la néomycine B par Tor *et al.*²⁰

Hermann *et al.*^{14,22} ont co-cristallisé la néomycine B et son analogue macrocyclique **3.5** dans oligonucléotide modèle du site-A du ribosome procaryote afin de vérifier si sa liaison dans le site-A était affecté par la rigidification de sa conformation. Ils ont démontré que les changements minimes de la conformation de l'analogue macrocyclique **3.5** par rapport à la conformation bioactive de la néomycine B sont suffisant pour mener à la disparition de certains ponts hydrogène entre l'aminoglycoside et l'ARNr.

Acensio *et al.*²³ ont remarqué que la conformation de la néomycine B liée au site-A du ribosome procaryote est différente de celle que cet antibiotique adopte lorsqu'il est lié à l'enzyme désactivante ANT(4')-Ia. Ils ont donc figé la néomycine B dans sa conformation bioactive afin de diminuer son affinité pour l'ANT(4')-Ia. Pour réaliser cet objectif, les positions N2' et C5'' ont été reliées directement (structure **3.5**) ou avec une chaîne de deux carbones (structure **3.13**) (Schéma 3.2). L'analogue **3.5**, discuté ci-haut, a été obtenu par une approche similaire à celle utilisée par Tor²¹ et Hermann,^{14,22} mais avec un meilleur rendement. Afin d'obtenir l'analogue de la néomycine B macrocyclique **3.13**, les amines de la néomycine B ont d'abord été protégées avec des groupements benzyloxycarbonyles, puis l'alcool primaire l'a été avec un groupement triisopropylsilyle pour obtenir le composé **3.7**. Les alcools secondaires ont ensuite été protégés à l'aide de l'anhydride acétique, puis la déprotection de l'alcool 5''-OH a été réalisée pour fournir le composé **3.8**. L'oxydation de l'alcool ainsi libéré jusqu'à l'aldéhyde suivie d'une réaction d'oléfination a fourni l'ester **3.9**. La réduction avec le borohydrure de sodium et la protection de l'alcool primaire avec un groupement triisopropylsilyle a donné le composé **3.10**. La protection des alcools secondaires à l'aide de l'anhydride acétique suivi de la déprotection de l'alcool primaire a permis d'obtenir le composé **3.11**. La formation d'un tosylate, puis la déprotection des alcools secondaires, a permis d'obtenir le composé **3.12**. Finalement, l'hydrogénolyse des groupements benzyloxycarbonyles suivie d'un traitement au bicarbonate de sodium a mené à l'obtention du macrocycle **3.13**.

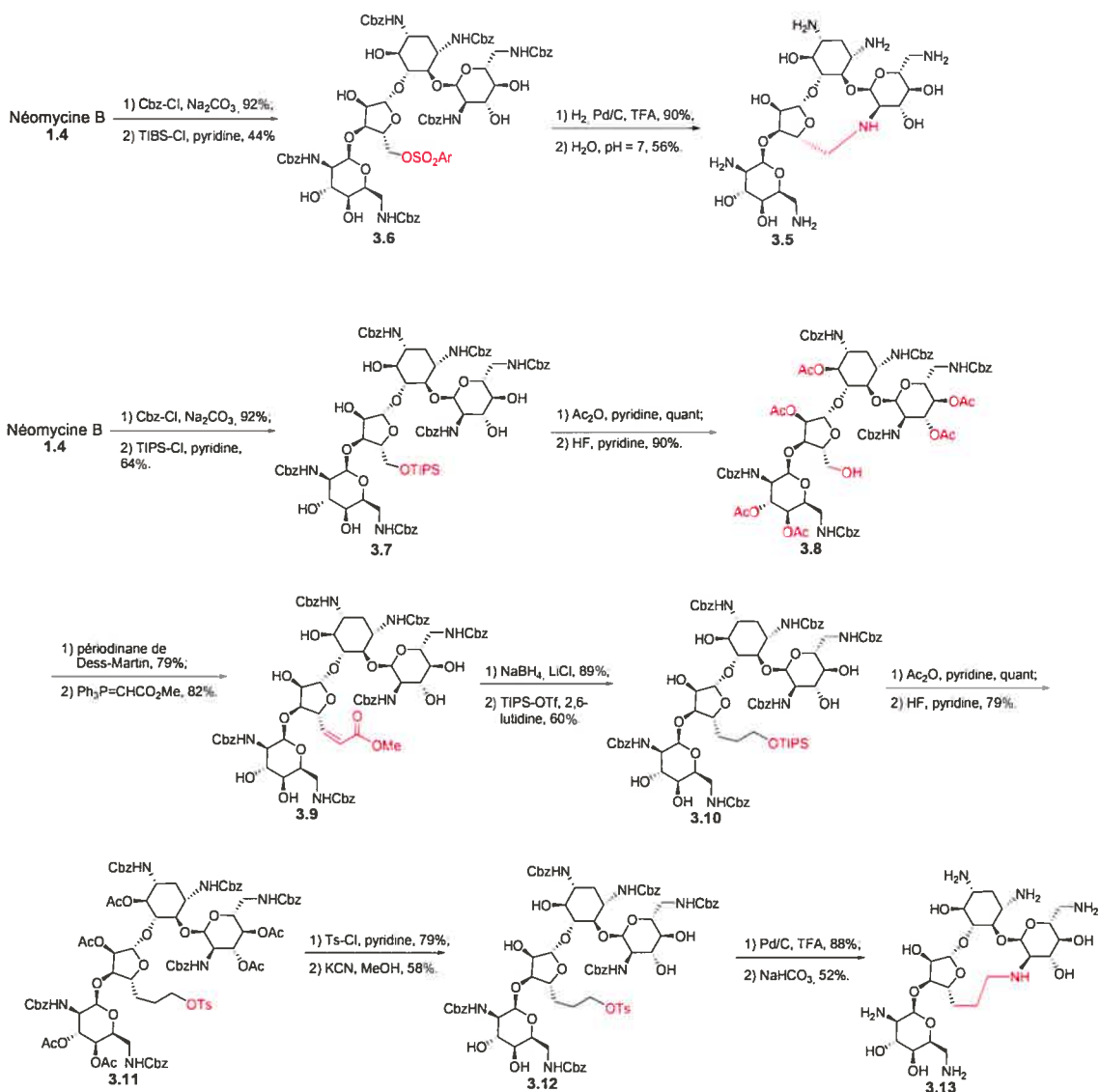


Schéma 3.2. Liaison des positions N2' et C5'' de la néomycine B avec des chaînes de longueurs différentes par Acencio *et al.*²³

Les deux analogues macrocycliques 3.5 et 3.13 ont une moins bonne affinité pour le site-A du ribosome procaryote ainsi que de moins bonnes activités antibactériennes que la néomycine B. Toutefois, l'ANT(4')-Ia ne catalyse pas l'adénylation du composé 3.5 et l'AAC(2')-Ic ne catalyse pas l'acétylation des composés 3.5 et 3.12. Par contre, ces deux analogues de la néomycine B sont phosphorylés en présence de l'APH(3')-IIIa.²³

3.4. Préparation d'analogues macrocycliques de la paromomycine reliée aux positions N6''' et O6.

Comme il a été mentionné précédemment, nous désirions bloquer une face de la paromomycine dans sa conformation bioactive en reliant les positions O6 et N6'''. Pour atteindre cet objectif, le composé **2.37**, décrit au chapitre précédent, a d'abord été traité avec de l'hydroxyde de sodium dans une solution aqueuse de dioxane pour libérer la seule amine primaire sur cette molécule et ainsi fournir le composé **3.15** via le carbamate cyclique **3.14**, observé lors du suivi de la réaction par spectrométrie de masse (Schéma 3.3). La régiosélectivité de la déprotection de cette amine primaire est discutée au prochain paragraphe. La formation d'amide avec l'acide 3-buténoïque, suivi de l'acétylation des alcools libres, a donné le composé **3.16**. La fermeture de cycle par métathèse en présence du catalyseur de Grubbs de deuxième génération,²⁴ suivi de la *O*-désacétylation, a fourni un mélange d'isomères *cis/trans* du macrocycle **3.17**. L'hydrolyse du benzylidène en milieu acide, puis l'hydrogénolyse des groupements benzyloxycarbonyles concomitante à la réduction de l'alcène, ont permis d'obtenir l'analogue macrocyclique **3.1**.²⁵

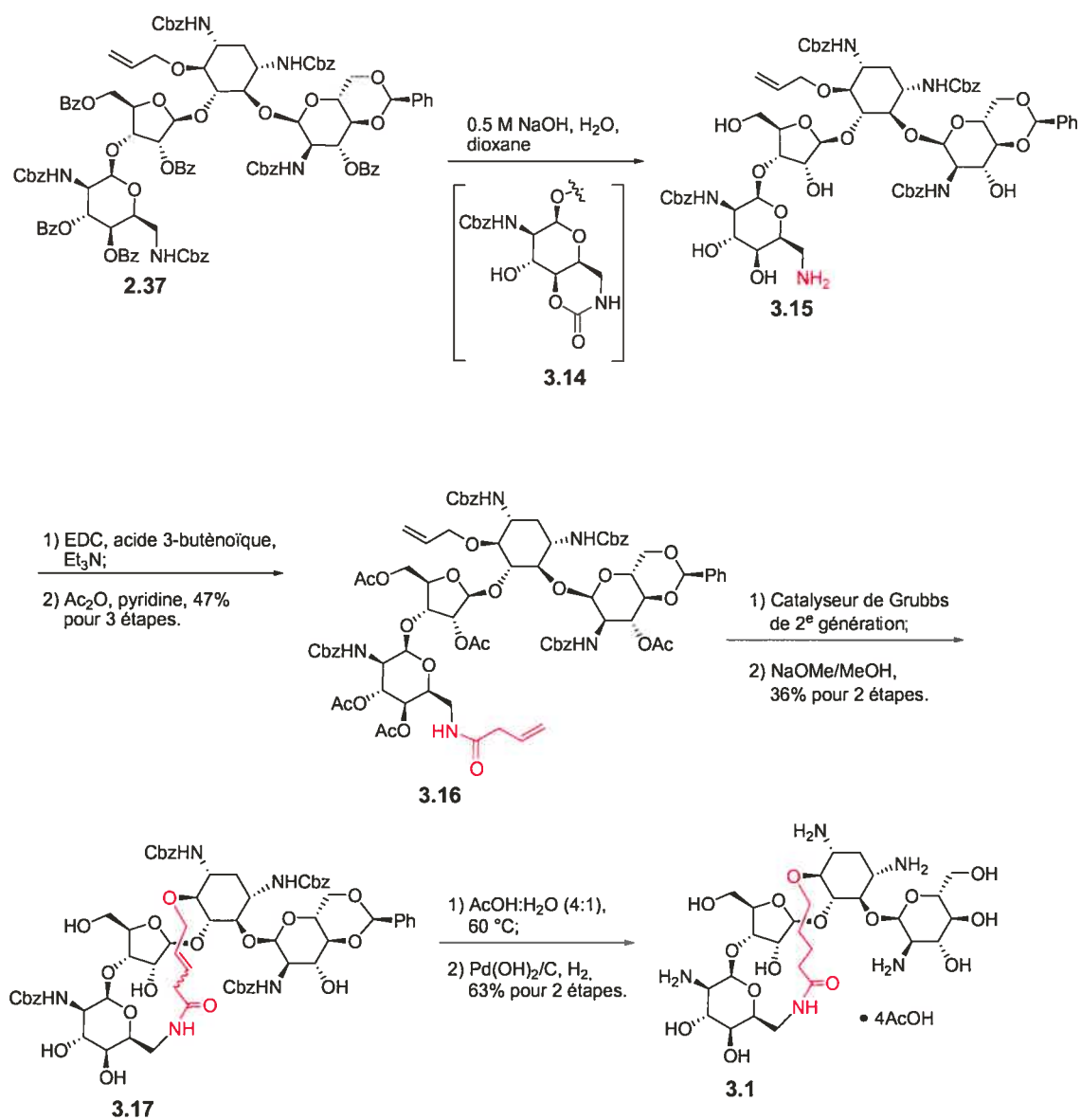


Schéma 3.3. Préparation de l'analogue macrocyclique **3.1** en reliant les positions N6''' et O6 de la paromomycine.²⁵

Tel que déterminé par la compagnie Isis Pharmaceuticals, le composé **3.1** n'est pas doté de bonnes propriétés antibiotiques. Nous avons ensuite préparé le macrocycle **3.2** pour vérifier que la perte d'activité n'était pas causée par la perte de la basicité de l'azote N6''' (Schéma 3.4). Le composé **2.1**²⁶ a été traité avec de l'hydroxyde de sodium dans une solution aqueuse de dioxane pour libérer la seule amine primaire de cette molécule et ainsi fournir le composé **3.18**, encore une fois via un carbamate cyclique semblable à celui du composé **3.14**. Nous déduisons la régiosélectivité de cette déprotection par le fait qu'il n'y a pas d'hydrolyse de groupement benzyloxycarbone lorsque l'alcool O4''' est protégé, ne pouvant alors s'engager dans la formation d'un carbamate cyclique. En effet, nous observons l'hydrolyse d'un groupement benzyloxycarbone lorsque les composés **2.1**,²⁶ **2.2**,²⁶ et **2.37** sont solubilisés dans une solution d'hydroxyde de sodium 0.5M pour une durée de 16 h alors que le composé **2.3**²⁶ est insensible dans ces conditions, et ce, même pour une durée de 48 h. De plus, cette déprotection sélective du groupement 6'''-NHCbz a été rapporté.²⁷

La 3-buténylation de l'amine 6'''-NH₂ suivi de la réintroduction du groupement benzyloxycarbone, a donné le composé **3.19** (Schéma 3.4). Les alcools secondaires ont été acétylés excepté l'alcool 6-OH qui est moins réactif tel que décrit dans la littérature²⁸ et tel que nous l'avons déterminé au chapitre précédent. L'alcool 6-OH a ensuite été allylé pour fournir le diène **3.20**. La fermeture de cycle par métathèse en présence du catalyseur de Grubbs de deuxième génération²⁴ a fourni un mélange isomérique *cis/trans* du composé **3.21**. La *O*-désacétylation avec le méthanolate de sodium suivi de l'hydrogénolyse des groupements benzyloxycarbonyles, a fourni l'analogue macrocyclique de la paromomycine **3.2** qui s'est également avéré inactif en tant qu'antibiotique.²⁵

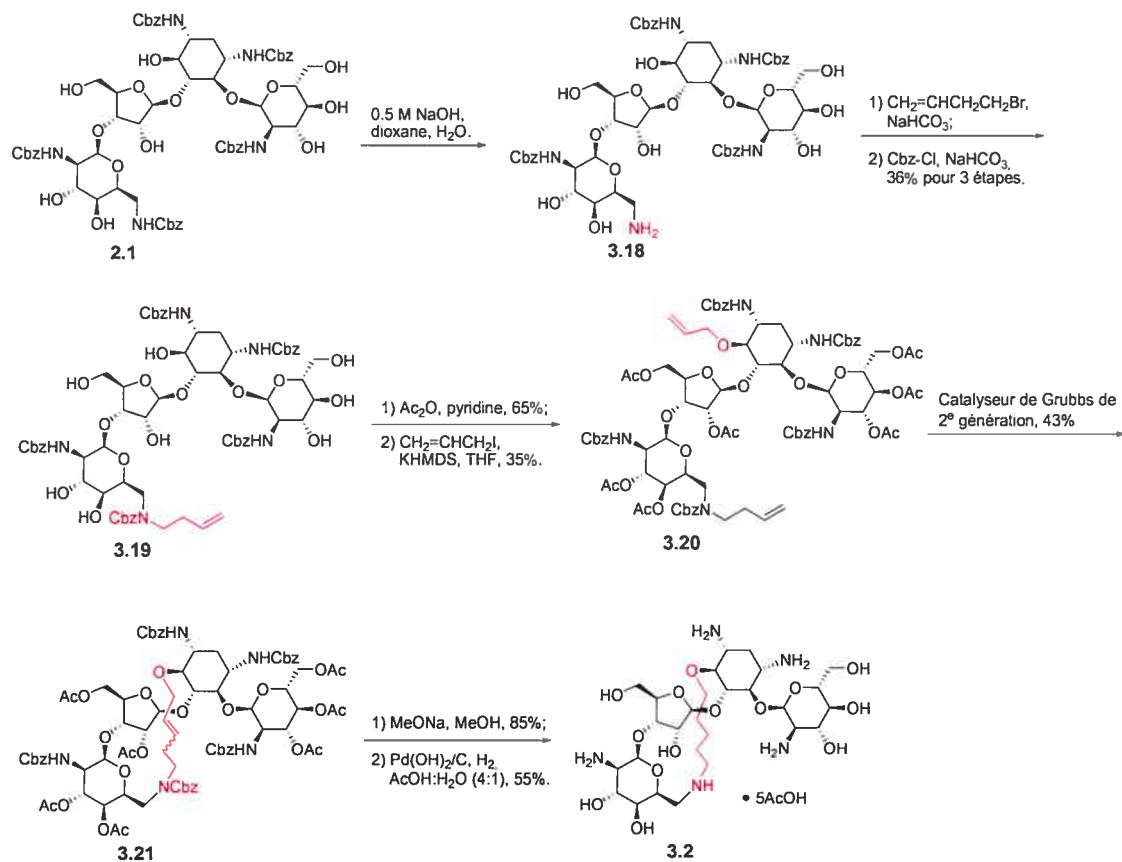


Schéma 3.4. Préparation de l'analogue macrocyclique **3.2** en reliant les positions N6''' et O6 de la paromomycine.²⁵

3.5. Phosphorylation d'analogues macrocycliques de la paromomycine reliée aux positions N6''' et O6.

L'objectif principal de la préparation des analogues macrocycliques **3.1** et **3.2** était de comparer l'aptitude de l'enzyme APH(3')-IIIa à catalyser la phosphorylation des alcools 3'-OH et 5''-OH comparativement à celle de la paromomycine.³ Je remercie sincèrement Nathalie Campos-Reales Pineda pour m'avoir montré comment exprimer et purifier l'APH(3')-IIIa ainsi que le professeur Jeffrey W. Keillor pour m'avoir permis d'utiliser son laboratoire pour tous les expériences avec l'APH(3')-IIIa. Pour mesurer la phosphorylation, nous avons utilisé une méthode standard (Figure 3.7).³ Selon cette méthode, la vitesse de la phosphorylation de l'aminoglycoside est déterminée en mesurant le taux de disparition de NADH, qui absorbe à 340 nm.

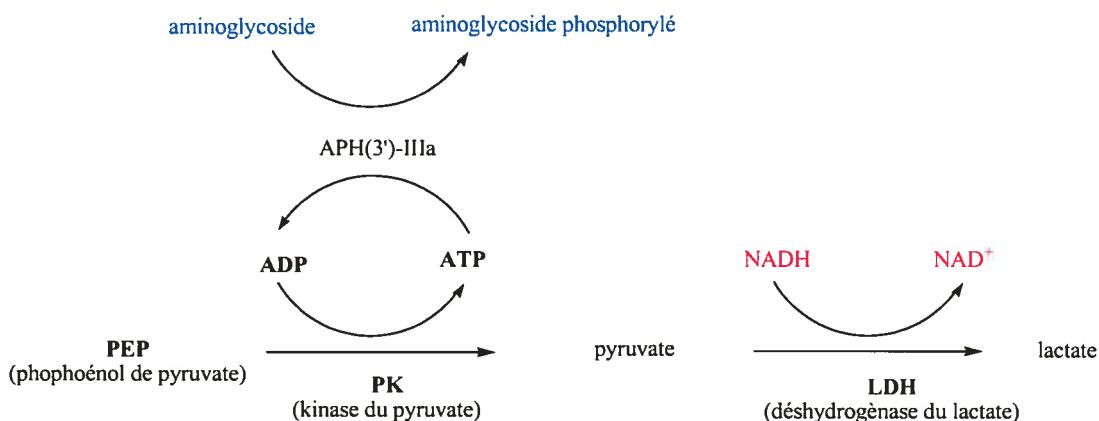


Figure 3.7. Méthode utilisée pour la détermination du taux de la phosphorylation d'aminoglycosides catalysée par l'APH(3')-IIIa.³

Nous avons alors observé que l'APH(3')-IIIa catalyse toujours la phosphorylation des deux analogues macrocycliques de la paromomycine **3.1** et **3.2** que nous avons préparés, même s'ils sont de moins bons substrats que la paromomycine (Figure 3.8). Les paramètres cinétiques déterminés pour l'analogue **3.1** sont présentés au Tableau X. À titre de comparaison, nous avons aussi mesuré les paramètres cinétiques pour la paromomycine à 4 °C (Figure 3.8). Le taux initial de la phosphorylation de la paromomycine a montré une dépendance diphasique hyperbolique par rapport à la

concentration du substrat. La consommation d'un seul équivalent d'ATP pendant cette réaction de phosphorylation démontre que ces résultats correspondent à deux différentes mono-phosphorylations de la paromomycine. Ce comportement a été observé préalablement et a été attribué à la phosphorylation des alcools 3'-OH ou 5''-OH à partir de deux complexes différents formés à partir du même substrat, lié de deux manières et avec des affinités différentes.^{4,5} Les paramètres cinétiques que nous avons obtenus pour la phosphorylation de la paromomycine en faisant la corrélation des données de basses et des hautes concentrations en substrat sont présentés au Tableau X. Les paramètres cinétiques pour la phosphorylation de la paromomycine de haute affinité que nous avons obtenus à 4 °C se comparent favorablement avec ceux publiés par Wright *et al.*³ mesurés à 37 °C (i.e., $k_{cat}^{37} = 3.62 \text{ s}^{-1}$, $K_m^{37} = 19.5 \text{ }\mu\text{M}$, $k_{cat}^{37}/K_m^{37} = 1.86 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

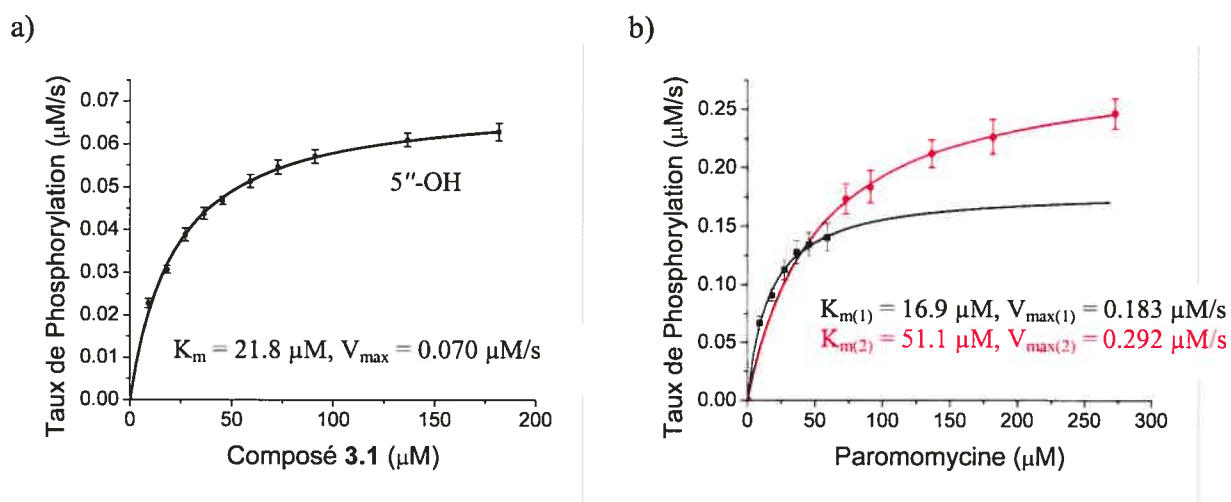


Figure 3.8. Phosphorylation de la paromomycine et de son analogue macrocyclique **3.1** en présence de l'APH(3')-IIIa. a) Phosphorylation de l'analogue **3.1** à la position O5''; b) Phosphorylation de paromomycine à la position O3' ou O5''.

Composé	Phosphorylation de grande affinité			Phosphorylation de faible affinité		
	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)
Paromomycine (1.3)	0.190	16.9	1.12×10^4	0.304	51.1	5.95×10^3
3.1	0.073	21.8	3.35×10^3	-	-	-

Tableau X. Paramètres cinétiques déterminés à 4 °C pour la phosphorylation de la paromomycine et de l'analogue 3.1.²⁵

Contrairement à la paromomycine, les analogues macrocycliques 3.1 et 3.2 n'ont été phosphorylés qu'à une seule position. Puisque la fragmentation des aminoglycosides en spectrométrie de masse est bien documentée,²⁹ nous avons déterminé l'unique site de phosphorylation par l'analyse des fragments observés en spectrométrie de masse pour le produit de la phosphorylation de l'analogue 3.1 en collaboration avec la Dre Alexandra Furtos. Une HPLC nous a d'abord permis d'identifier le produit de la réaction de phosphorylation de l'analogue 3.1 en présence de l'APH(3')-IIIa. Lors de l'analyse en spectrométrie de masse de ce produit mono-phosphorylé 3.22, nous avons observé les fragments 3.23 et 3.24 (Figure 3.9). Aucun produit de bis-phosphorylation n'a été observé lors de cette analyse, ce qui concorde avec le fait qu'un seul équivalent d'ATP est utilisé lors de la phosphorylation de l'analogue 3.1.

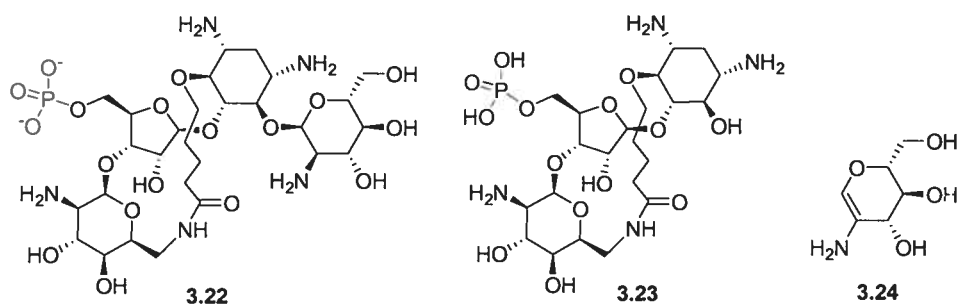


Figure 3.9. Structure proposée (3.22) et fragments observés (3.23-3.24) pour le produit de la mono-phosphorylation de l'analogue macrocyclique 3.1.

Nous avons utilisé les paromomycines mono- et bis-phosphorylées 3.25-3.27 que nous avons obtenues par la phosphorylation de la paromomycine pour valider notre approche expérimentale. Ces produits de phosphorylation ont d'abord été séparés par HPLC. Tel qu'attendu, nous avons observé les fragments 3.28-3.35 pour les deux produits de la mono-phosphorylation de la paromomycine^{4,5,29} qui ont virtuellement co-élués dans les conditions chromatographiques utilisées (Figure 3.10).

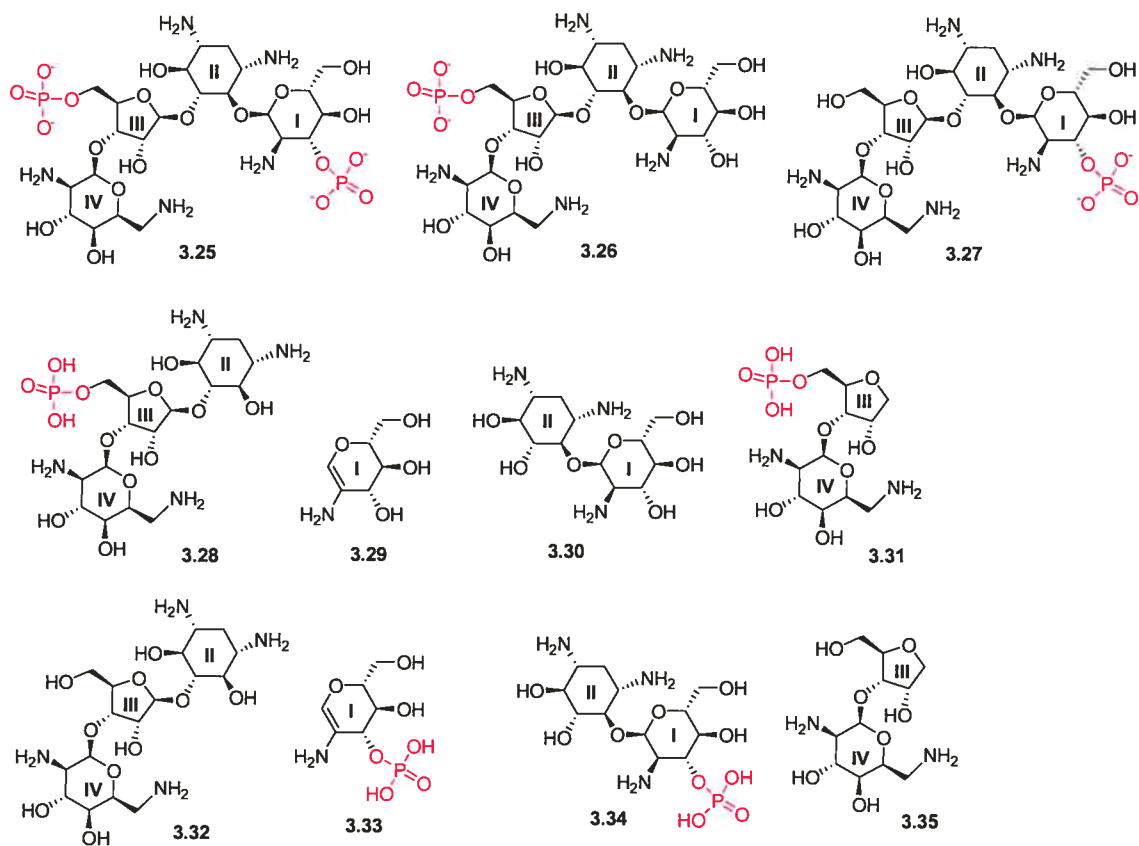


Figure 3.10. Fragments observés (3.28-3.35) pour les produits mono-phosphorylés de la paromomycine (3.26-3.27).

La mono-phosphorylation des analogues macrocycliques à la position O5'' 3.1 et 3.2 est probablement causée par blocage du cycle I par la chaîne carbonée qui relie les positions O6 et N6'''. Malheureusement, tel que démontré par la compagnie Isis Pharmaceuticals, les analogues macrocycliques 3.1 et 3.2 n'ont pas démontré d'activités antibactériennes appréciables, ni contre *S. aureus*, ni contre *E. coli* (CIM >40 µg/mL dans tous les cas). La chaîne à caractère hydrophobique d'une longueur de cinq carbones qui relie les positions O6 et N6''' altère probablement la liaison des cycles I et II dans le site-A, possiblement en excluant des molécules d'eau importantes. La préparation des analogues macrocycliques 3.1 et 3.2 demeure la première tentative pour exercer une discrimination entre l'accommodation d'un aminoglycoside par le site-A et sa reconnaissance par une APH.

3.6. Impact de la fonctionnalisation de la paromomycine sur la phosphorylation catalysée par l'APH(3')-IIIa.

Avec l'enzyme APH(3')-IIIa en main, nous avons entrepris de vérifier le comportement des différents analogues de la paromomycine que nous avons préparés. Nous étions particulièrement intéressés à vérifier si l'enzyme était en mesure de reconnaître certains analogues de la paromomycine auxquels nous avons ajouté des chaînes latérales volumineuses, justement afin de nuire à leur affinité pour les enzymes désactivantes. Nous avons donc, dans un premier temps, évalué l'impact de la fonctionnalisation de la position O6, N6''' ou O2'' de la paromomycine sur la phosphorylation catalysée par l'APH(3')-IIIa. Dans une deuxième temps, nous avons évalué l'impact de la modification des positions normalement ciblées par l'APH(3')-IIIa, c'est à dire les positions O3' et O5'' de la paromomycine.

3.6.1. Effet de la fonctionnalisation de la position O6 de la paromomycine.

L'introduction d'une chaîne latérale à la position O6 de la paromomycine n'a qu'un effet mineur sur la phosphorylation des analogues **2.46** et **2.48** catalysée par l'APH(3')-IIIa (Figure 3.11). La phosphorylation de deux alcools distincts, probablement 3'-OH et 5''-OH comme pour la paromomycine, à partir de deux complexes formés du même substrat, mais liés de deux manières et ayant des affinités différentes, a également été observée. Les paramètres cinétiques pour les phosphorylations des analogues **2.46** et **2.48** en comparaison avec ceux obtenus pour la paromomycine sont présentés au Tableau XI. L'effet de l'introduction d'une chaîne latérale à la position O6 de la paromomycine semble relié à la liaison du substrat avec l'enzyme car c'est surtout le K_m qui est affecté.

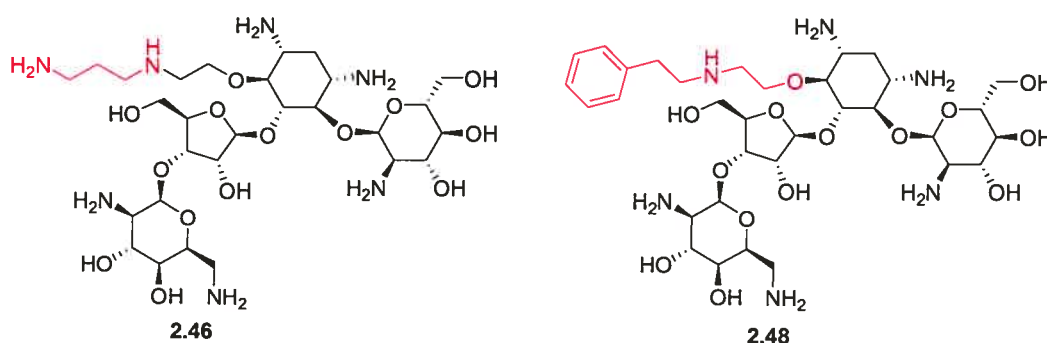


Figure 3.11. Structures des analogues **2.46** et **2.48** choisis pour évaluer l'impact de la fonctionnalisation de la position O6 de la paromomycine sur la phosphorylation catalysée par l'APH(3')-IIIa.

Composé	Phosphorylation de grande affinité			Phosphorylation de faible affinité		
	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)
Paromomycine (1.3)	0.190	16.9	1.12×10^4	0.304	51.1	5.95×10^3
2.46	0.226	43.7	5.17×10^3	0.357	166.5	2.14×10^3
2.48	0.231	38.9	5.94×10^3	0.346	153.4	2.26×10^3

Tableau XI. Paramètres cinétiques déterminés à 4 °C pour la phosphorylation des analogues **2.46** et **2.48**.

3.6.2. Effet de la fonctionnalisation de la position N6''' de la paromomycine.

3.6.2.1. Préparation d'analogue de la paromomycine fonctionnalisée à la position N6'''.

Dans le but de vérifier si la fonctionnalisation de l'amine 6'''-NH₂ de la paromomycine aurait un impact sur l'activité antibactérienne et/ou sur l'affinité pour les enzymes désactivantes, nous avons préparé quelques analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position N6''' (Schéma 3.5). L'amine 6'''-NH₂ du composé **3.18** a d'abord été fonctionnalisée par amination réductrice, ce qui nous a permis d'isoler l'amine secondaire **3.36** et l'amine tertiaire **3.37**. L'hydrogénolyse des groupements benzyloxycarbonyles a fourni les analogues **3.38** et **3.39**. La formation d'amide entre l'amine 6'''-NH₂ du composé **3.18** et le dérivé du tryptophane **3.40**, suivie de l'acétylation des alcools pour faciliter la purification, a donné le composé **3.41**. Les déprotections usuelles nous ont permis d'obtenir l'analogue **3.42**. Excepté le composé **3.38**, les analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position N6''' que nous avons préparés ont démontré des activités antibactériennes moins intéressantes que celles de la paromomycine. Les activités antibactériennes déterminées par Isis Pharmaceuticals de ces analogues (**3.38**, **3.39** et **3.42**) sont présentées au Tableau XIV à la fin de ce chapitre.

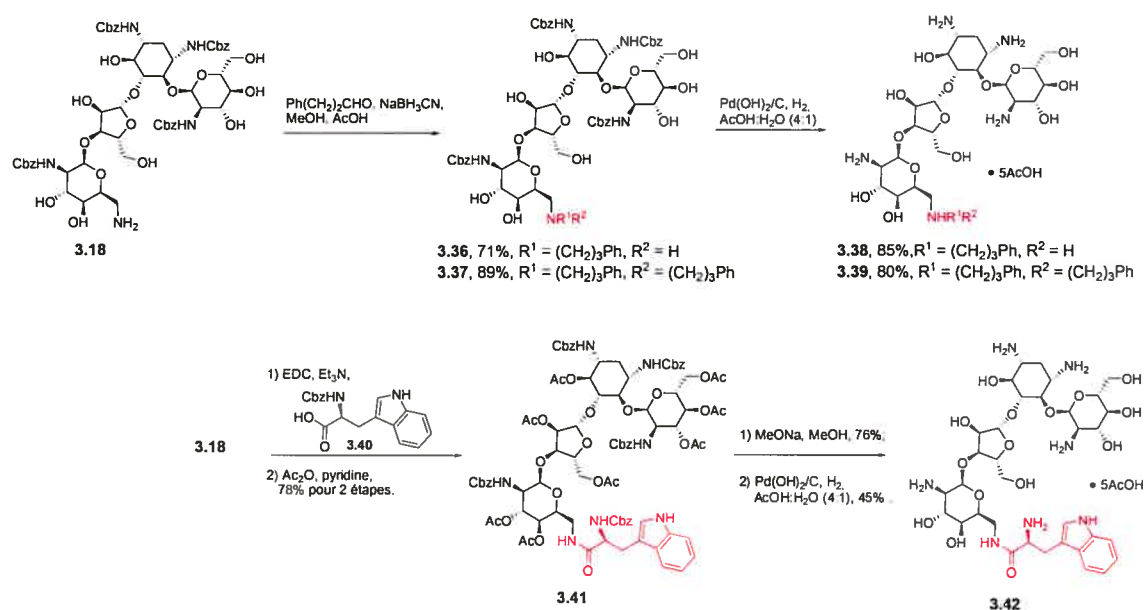


Schéma 3.5. Préparation des analogues **3.38**, **3.39** et **3.52**.

3.6.2.1. Effet de la fonctionnalisation de la paromomycine à la position N6''' sur la phosphorylation catalysée par l'APH(3')-IIIa.

L'introduction d'une chaîne latérale à la position N6''' de la paromomycine n'a qu'un effet mineur sur la phosphorylation des analogues **3.38** et **3.42** catalysée par l'APH(3')-IIIa (Figure 3.11). La phosphorylation de deux alcools distincts, probablement 3'-OH et 5''-OH comme pour la paromomycine, à partir de deux complexes formés du même substrat mais liés de deux manières et ayant des affinités différentes a également été observée. La fonctionnalisation de la position N6''' de la paromomycine a donc un effet comparable à l'introduction d'une chaîne latérale à la position O6 tel que décrit ci-haut. Les paramètres cinétiques pour la phosphorylation des analogues **3.38** et **3.42** (Figure 3.12) en présence de l'APH(3')-IIIa sont présentés au Tableau XII. Comme l'introduction d'une chaîne latérale à la position O6, l'effet de l'introduction d'une chaîne latérale à la position N6''' de la paromomycine semble relié à la liaison du substrat avec l'enzyme car c'est surtout le K_m qui est affecté.

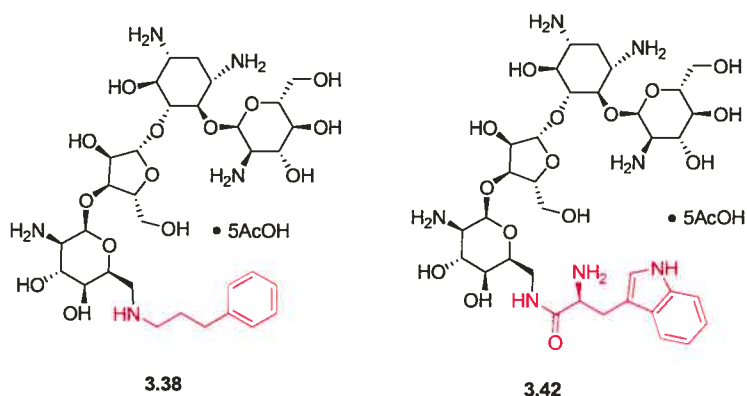


Figure 3.12. Structures des analogues **3.38** et **3.42** choisis pour évaluer l'impact de la fonctionnalisation de la position N6''' sur la phosphorylation catalysée par l'APH(3')-IIIa.

Composé	Phosphorylation de grande affinité			Phosphorylation de faible affinité		
	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($M^{-1}s^{-1}$)
Paromomycine (1.3)	0.190	16.9	1.12×10^4	0.304	51.1	5.95×10^3
3.38	0.215	32.1	6.70×10^3	0.334	137.3	2.43×10^3
3.42	0.219	34.6	6.33×10^3	0.328	132.8	2.47×10^3

Tableau XII. Paramètres cinétiques déterminés à 4 °C pour la phosphorylation des analogues 3.38 et 3.42.

3.6.3 Impact de la fonctionnalisation de la position O2'' de la paromomycine.

Nous avons observé que l'introduction d'une chaîne latérale à la position O2'' de la paromomycine a un effet majeur sur la phosphorylation de ces analogues en présence de l'APH(3')-IIIa. En effet, les analogues de la paromomycine fonctionnalisés à la position O2'' que nous avons étudiés ont été phosphorylés beaucoup plus lentement que la paromomycine. Pour certains de ces analogues nous n'avons pas été en mesure de détecter la phosphorylation. Nous avons donc entrepris des études plus approfondies pour comprendre l'effet de la fonctionnalisation de la position O2'' de la paromomycine sur la phosphorylation catalysée par l'APH(3')-IIIa. Ces investigations sont discutées au chapitre suivant.

3.7. Préparation d'analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la positions O5'' ou O3' qui sont normalement ciblées par l'enzyme APH(3')-IIIa.

Puisque l'APH(3')-IIIa catalyse la phosphorylation des alcools 3'-OH et 5''-OH de la paromomycine, nous avons envisagé de les modifier afin d'empêcher leur phosphorylation et aussi pour vérifier l'impact de telles modifications sur l'affinité pour l'enzyme. Bien entendu, nous désirions également vérifier l'activité antibactérienne de tels analogues. De plus, le fait que les analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O2'' sur le cycle III soient phosphorylés beaucoup plus lentement que la paromomycine en présence de l'APH(3')-IIIa nous a encouragé à vérifier si une modification à la position O5'' du même cycle conduirait à des résultats similaires.

3.7.1. Préparation d'analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O5''.

Pour arriver à fonctionnaliser la position O5'' de la paromomycine, nous avons utilisé l'approche présentée au Schéma 3.6.³⁰ Le composé **2.56**, décrit au chapitre précédent, a été traité avec le chlorure de benzoyle dans la pyridine à 70 °C pour fournir le composé **3.43**, dont l'alcool primaire a été libéré par un traitement avec fluorure de tétrabutyle d'ammonium, puis allylé pour fournir le composé **3.44**. Un clivage oxydatif de l'alcène a produit l'aldéhyde **3.45**. Des aminations réductrices suivies d'un traitement avec le méthanolate de sodium ont mené à l'obtention des composés **3.46** et **3.47**. L'hydrolyse acide du benzylidène, puis l'hydrogénolyse des groupements benzyloxy-carbonyles, ont permis d'obtenir les analogues **3.48-3.49**. Les activités antibactériennes de ces analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O5'' déterminées par Isis Pharmaceuticals se sont avérées moins intéressantes que celle de la paromomycine et sont présentées au Tableau XIV à la fin de ce chapitre.

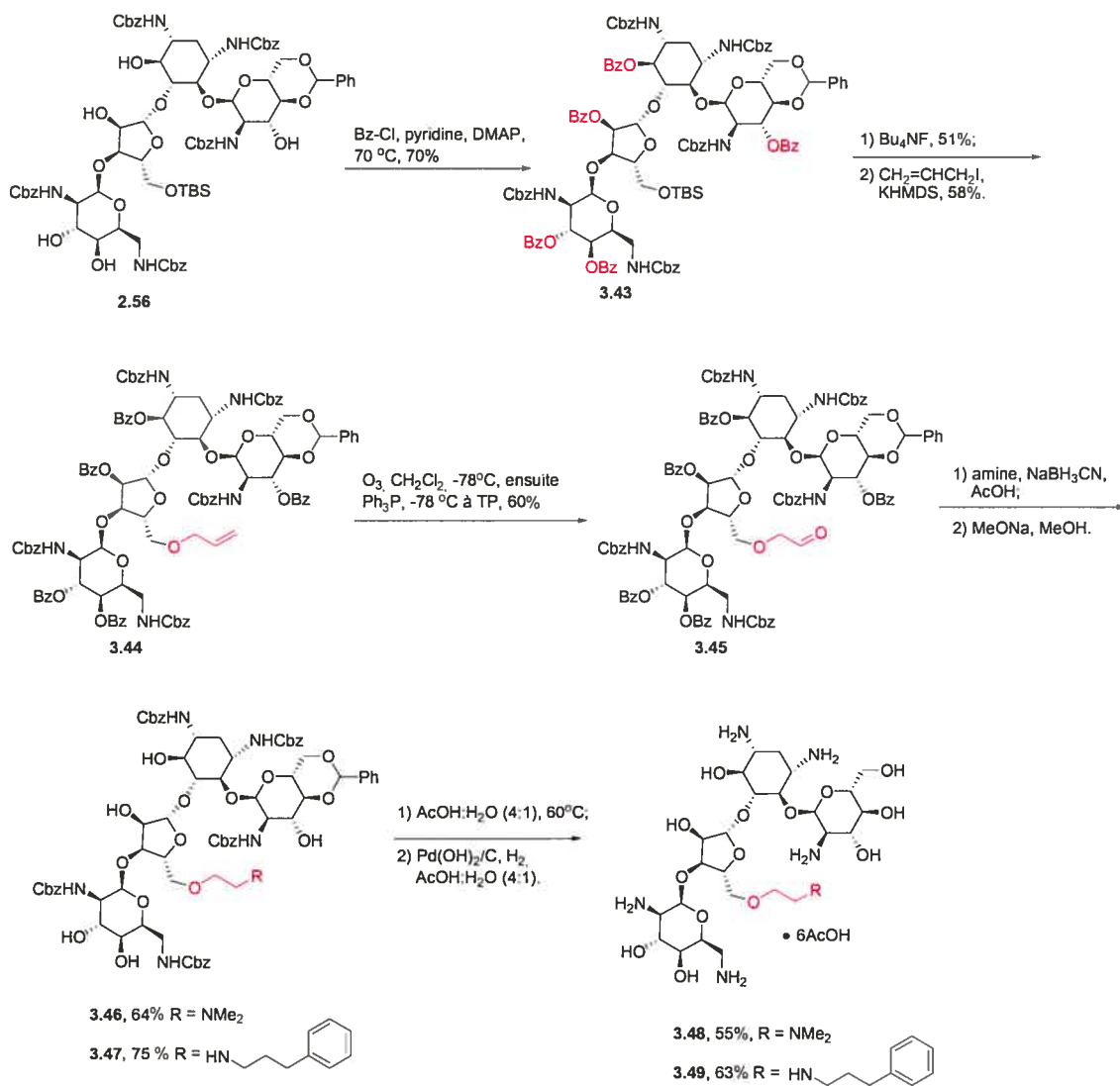


Schéma 3.6. Préparation des analogues **3.48** et **3.49**.

Pour préparer des analogues de la paromomycine fonctionnalisés à la position O5'' sans azote dans la chaîne latérale, nous avons traité le composé **2.2**, décrit au chapitre précédent, avec le bromure de cinnamyle en présence du KHMDS afin d'alkyler le seul alcool primaire pour obtenir le composé **3.50**, qui a été soumis aux conditions de déprotections usuelles pour fournir l'analogue **3.51** (Schéma 3.7). Les activités antibactériennes déterminées par Isis Pharmaceuticals de cet analogue de la paromomycine fonctionnalisé à la position O5'' se sont avérées moins intéressantes que celles de la paromomycine et sont présentées à la fin de ce chapitre au Tableau XIV.

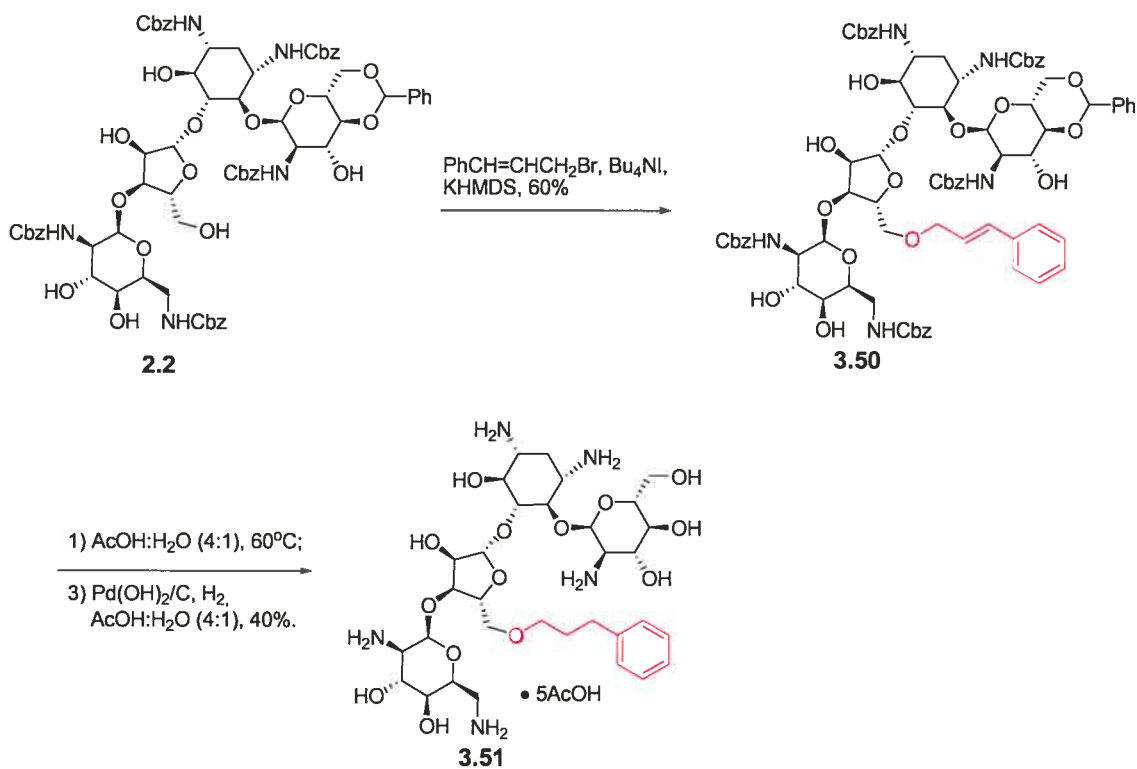
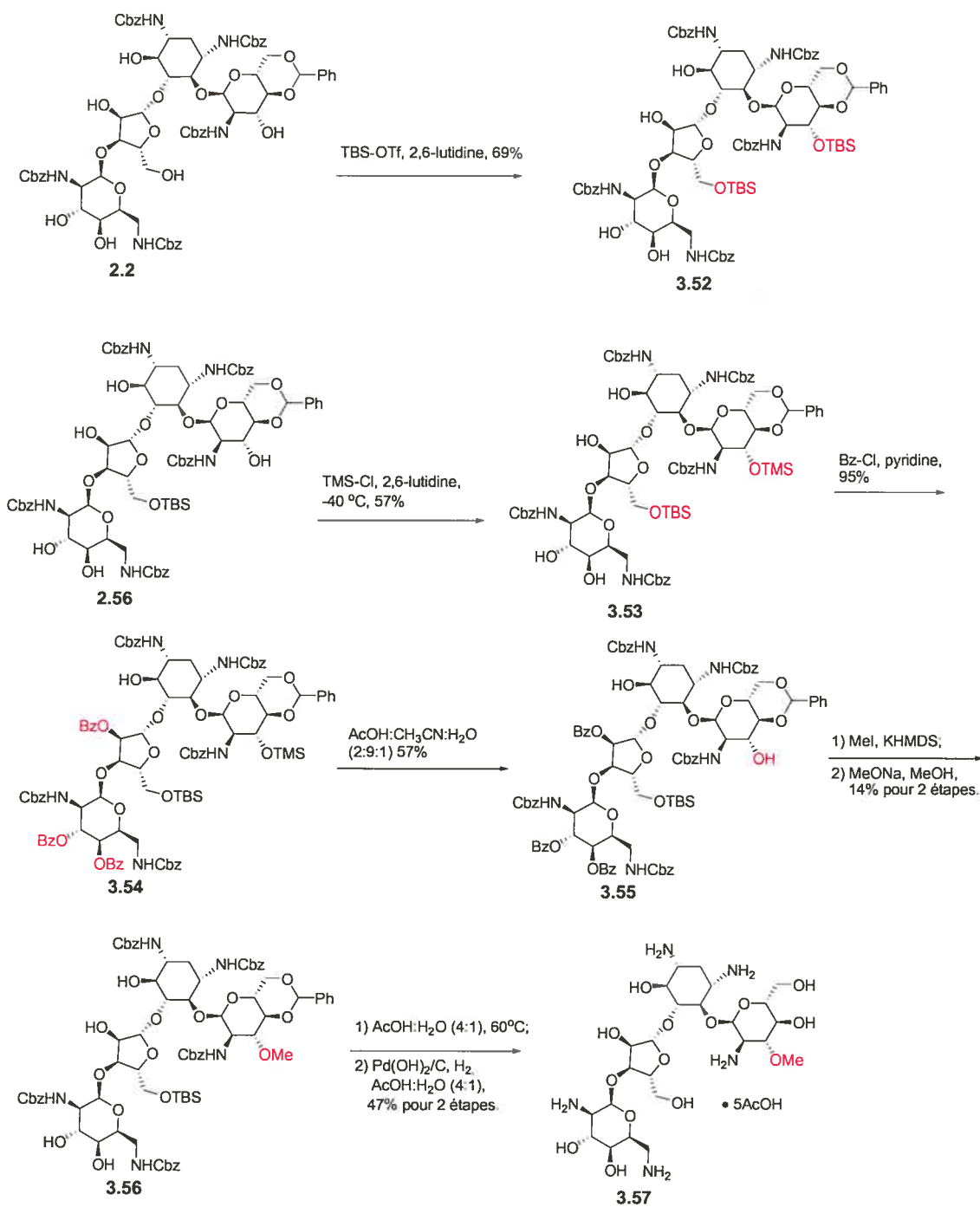


Schéma 3.7. Préparation de l'analogue **3.51**.

3.7.2. Préparation d'un analogue de la paromomycine méthylée à la position O3'.

Lors de la protection du composé **2.2**²⁶ avec le triflate de *tert*-butyldiméthylsilyle, nous avons remarqué que le produit **3.52** semble être obtenu lorsque deux équivalents du réactif sont utilisés (Schéma 3.8). Sachant que l'analyse des fragments en spectrométrie de masse est une méthode bien établie pour les caractérisation structurales dans le domaine des aminoglycosides,²⁹ nous avons déduit la régiosélectivité de la deuxième silylation à partir du patron de fragmentation observé en spectrométrie de masse pour le composé **3.52** et nous l'avons confirmé avec l'analyse des fragments observés pour le composé **3.53** préparé par la même approche que le composé **3.52**. Nous avons donc protégé l'alcool 3'-OH du composé **2.56** avec un groupement TMS pour avoir un groupement orthogonal au TBS présent sur l'alcool 3'-OH. Le patron de fragmentation du composé **3.53** en spectrométrie de masse a montré que le groupement TMS se trouve sur le cycle I ou II (voir la partie expérimentale au Chapitre 6) alors que nous savons que l'alcool 6-OH a une réactivité moindre que les autres alcools libres du composé **2.2** tel que décrit dans la littérature²⁸ et tel que nous l'avons déterminé au chapitre précédent.

Nous avons ensuite protégé les autres alcools à l'exception du 6-OH qui est moins réactif tel que décrit au paragraphe précédant afin d'obtenir le composé **3.54**. L'hydrolyse sélective du groupement triméthylsilyle en milieu acide a produit le composé **3.55**, qui a été méthylé avec l'iodure de méthyle en présence du KHMDS pour donner le dérivé méthylé correspondant. Un traitement avec du méthanolate de sodium dans le méthanol a fourni le composé **3.56**. L'hydrolyse acide du benzylidène et de l'éther de silicium, suivi de l'hydrogénolyse des groupements benzyloxycarbonyles, nous ont permis d'obtenir l'analogue de la paromomycine méthylée à la position O3' **3.57**, qui s'est avéré avoir une activité antibactérienne diminuée par rapport à celle de la paromomycine, tel que déterminée par la compagnie Isis Pharmaceuticals (voir Tableau XIV à la fin de ce chapitre). Nous n'avons pas introduit de groupements plus volumineux à la position O3' de la paromomycine, car la structure rayon X de cet antibiotique lié à un modèle du site-A (voir Chapitre 1) montre qu'il n'y pas d'espace pour de tels groupements.



Sch\u00e9ma 3.8. Pr\u00e9paration de l'analogue 3.57.

3.8. Impact de la fonctionnalisation de la paromomycine à la position O3' ou O5'', normalement ciblées par l'enzyme APH(3')-IIIa sur la phosphorylation catalysée par cette enzyme.

L'analogue de la paromomycine méthylée à la position O3' **3.57** est, tel que prévu, phosphorylé une seule fois. Nous assumons que la position de cette monophosphorylation est la position O5'', puisque c'est l'autre position qui est normalement ciblée par l'APH(3')-IIIa. Les paramètres cinétiques de la phosphorylation de l'analogue méthylé **3.57** sont présentés au Tableau XIII.

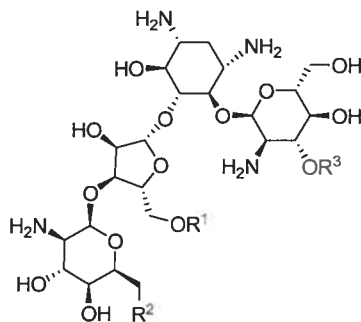
Composé	Phosphorylation de grande affinité			Phosphorylation de faible affinité		
	kcat (s ⁻¹)	Km (μM)	kcat/Km (M ⁻¹ s ⁻¹)	kcat (s ⁻¹)	Km (μM)	kcat/Km (M ⁻¹ s ⁻¹)
Paromomy- cine (1.3)	0.190	16.9	1.12 x10 ⁴	0.304	51.1	5.95 x10 ³
3.57	0.164	26.8	6.12 x10 ³	-	-	-

Tableau XIII. Paramètres cinétiques pour la phosphorylation de l'analogue **3.57**.

Similairement aux analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O2'', les analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O5'' **3.48-3.49** et **3.51** sont phosphorylés beaucoup plus lentement que la paromomycine par l'APH(3')-IIIa. La fonctionnalisation du cycle III est donc une bonne approche pour interférer avec la phosphorylation des analogues de la paromomycine. Nous avons étudié d'avantage l'impact de la fonctionnalisation de la position O5'' sur la phosphorylation catalysée par l'APH(3')-IIIa. Ces résultats sont discutés au chapitre suivant.

3.9. Activités antibactériennes des analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O3', O5'' ou N6'''.

Les activités antibactériennes ont été déterminées par la compagnie Isis Pharmaceuticals que je remercie sincèrement.



Composé	R ¹	R ²	R ³	CIM	CIM
				($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)
				<i>E. coli</i> ^a	<i>S. aureus</i> ^b
Paromomycine (1.3)	H	NH ₂	H	3-6	1-2
3.38	H		H	1.25-2.5	2.5-5
3.39	H		H	5-10	2-40
3.42	H		H	32	64
3.48		NH ₂	H	6-12	25-50
3.49		NH ₂	H	6-12	3-6
3.51		NH ₂	H	20-40	3-5
3.57	H	NH ₂	Me	10-20	1-3

^a ATCC 25922; ^b ATCC 13709.

Tableau XIV. Activités antibactériennes des analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O3', O5'' ou N6'''.

3.10. Conclusion pour le Chapitre 3.

Afin de sonder l'enzyme APH(3')-IIIa qui est responsable de la résistance observée chez certaines souches de bactéries d'importance clinique, des analogues de la paromomycine ont été préparés et l'impact des modifications structurales de la paromomycine sur l'affinité pour l'enzyme a été évalué. Les analogues de la paromomycine macrocyclique (3.1 et 3.2) ont une moins bonne affinité pour l'enzyme, par rapport à la paromomycine. Ces analogues macrocyclique ne sont phosphorylés qu'une fois alors que la paromomycine est bis-phosphorylée en présence de l'APH(3')-IIIa. Toutefois, ces analogues macrocycliques sont néanmoins de bons substrats pour l'enzyme ($k_{cat}/K_m = 3.35 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ pour 3.1).

Malheureusement, les analogues de la paromomycine fonctionnalisés à la position O6 (2.46 et 2.48) tout comme ceux qui sont fonctionnalisés à la position N6''' (3.38 et 3.42) sont de bons substrats pour l'APH(3')-IIIa. La méthylation de la position O3' de la paromomycine (structure 3.57), normalement ciblée par l'enzyme, n'a pas vraiment d'impact sur l'enzyme puisqu'elle catalyse tout de même la phosphorylation de la position O5'', qui est l'autre position normalement ciblée par l'enzyme.

Toutefois, nous avons découvert que la fonctionnalisation des positions O2'' et O5'' de la paromomycine a un effet majeur sur l'affinité pour l'APH(3')-IIIa. En effet, les analogues de la paromomycine fonctionnalisés à ces positions que nous avons étudiés ont tous été phosphorylés beaucoup plus lentement que la paromomycine. De plus, certains analogues de la paromomycine fonctionnalisés à la position O2'' ou O5'' ont démontré de bonnes activités antibiotiques contre des souches de bactéries qui ne sont pas résistantes, ce qui nous laisse croire que ces analogues pourraient être également actifs contre des souches qui expriment l'APH(3')-IIIa. Nous avons étudié d'avantage l'impact de la fonctionnalisation de la position O2'' ou O5'' sur la phosphorylation catalysée par l'APH(3')-IIIa et ces résultats sont discutés au chapitre suivant.

3.11. Références pour le Chapitre 3.

- 1) Rosen, B. P.; Mobashery, S. *Resolving the Antibiotic Paradox: Progress in Understanding Drug Resistance and Development of New Antibiotics*. Kluwer Academic / Plenum Publisher, New York, **1998**.
- 2) Magnet, S.; Blanchard, J. S. Molecular Insights into Aminoglycoside Action and Resistance. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 477-497.
- 3) McKay, G. A.; Thompson, P. R.; Wright, G. D. Broad Spectrum Aminoglycoside Phosphotransferase Type III from *Enterococcus*: Overexpression, Purification, and Substrate Specificity. *Biochemistry* **1994**, *33*, 6936-6944.
- 4) Trieu-Cuot, P.; Courvalin, P. Nucleotide Sequence of the Streptococcus faecalis Plasmid Gene Encoding the 3',5"-aminoglycoside Phosphotransferase Type III. *Gene* **1983**, *23*, 331-341.
- 5) Thompson, P. R.; Hughes, D. W.; Wright, G. D. Regiospecificity of Aminoglycoside Phosphotransferase from Enterococci and Staphylococci (APH(3')-IIIa). *Biochemistry* **1996**, *35*, 8686-8695.
- 6) Cox, J. R.; McKay, G. A.; Wright, G. D.; Serpersu, E. H. Arrangement of Substrates at the Active Site of an Aminoglycoside Antibiotic 3'-Phosphotransferase as Determined by NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1295-1301.
- 7) Fong, D. H.; Berghuis, A. M. Substrate Promiscuity of an Aminoglycoside Resistance Enzyme via Target Mimicry. *EMBO J.* **2002**, *21*, 2323-2331.
- 8) Hon, W, C.; McKay, G. A.; Thompson, P. R.; Sweet, R. M.; Yang, D. S. C.; Wright, G. D.; Berghuis, A. M. Structure of an Enzyme Required for Aminoglycoside Resistance Reveals Homology to Eukaryotic Protein Kinase. *Cell* **1997**, *89*, 887-895.

- 9) McKay, G. A.; Wright, G. D. Kinetic Mechanism of Aminoglycoside Phosphotransferase type IIIa. Evidence for a Theorell-Chance Mechanism. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 24686-92.
- 10) McKay, G. A.; Wright, G. D. Catalytic mechanism of enterococcal kanamycin Kinase (APH(3')-IIIa): Viscosity, Thio, and Solvent Isotope Effects Support a Theorell-Chance Mechanism. *Biochemistry* **1996**, *35*, 8680-8685.
- 11) (a) Burk, D. L.; Hon, W. C.; Leung, A. K.; Berghuis, A. M. Structural Analyses of Nucleotide Binding to an Aminoglycoside Phosphotransferase. *Biochemistry* **2001**, *40*, 8756-8764; (b) Thompson, P. R.; Boehr, D. D.; Berghuis, A. M.; Wright, G. D. Mechanism of Aminoglycoside Antibiotic Kinase APH(3')-IIIa: Role of the Nucleotide Positioning Loop. *Biochemistry* **2002**, *41*, 7001-7007.
- 12) (a) Carter, A. P.; Clemons, W. M.; Bordersen, D. E.; Morgan-Warren, R. J.; Wimberly, B. T.; Ramakrishnan, V. Functional Insights from the Structure of the 30S Ribosomal Subunit and its Interactions with Antibiotics. *Nature* **2000**, *407*, 340-348; (b) Vicens, Q.; Westhof, E. Crystal Structure of Paromomycin Docked Into the Eubacterial Ribosomal Decoding A-Site. *Structure* **2001**, *9*, 647-658.
- 13) (a) Kondo, J.; François, B.; Russell, R. J.; Murray, J. B.; Westhof, E. Crystal Structure of the Bacterial Ribosomal Decoding site Complexed with Amikacin Containing the γ -amino- α -hydroxybutyryl (haba) Group. *Biochimie* **2006**, *88*, 1027-1031; (b) François, B.; Russell, R. J.; Murray, J. B.; Aboul-ela, F.; Masquida, B.; Vicens, Q.; Westhof, E. Crystal Structures of Complexes Between Aminoglycosides and Decoding A-site Oligonucleotides: Role of the Number of Rings and Positive Charges in the Specific Binding Leading to Miscoding. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 5677-5690; (c) Vicens, Q.; Westhof, E. Crystal Structure of Geneticin Bound to a Bacterial 16 S Ribosomal RNA A-Site Oligonucleotide. *J. Mol. Biol.* **2003**, *326*, 1175-1188; (d) Vicens, Q.; Westhof, E. Crystal Structure of a Complex Between the

- Aminoglycoside Tobramycin and an Oligonucleotide Containing the Ribosomal Decoding A-Site. *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 747–755.
- 14) Zhao, F.; Zhao, Q.; Blount, K. F.; Han, Q.; Tor, Y.; Hermann, T. Molecular Recognition of RNA by Neomycin and a Restricted Neomycin Derivative. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2-6.
- 15) Pedersen, L. C.; Benning, M. M.; Holden, H. M. Structural Investigation of the Antibiotic and ATP-binding Sites in Kanamycin Nucleotidyltransferase. *Biochemistry* **1995**, *34*, 13305-11.
- 16) Vetting, M. W.; Hegde, S. S.; Javid-Majd, F.; Blanchard, J. S.; Roderick, S. L. Aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase from Mycobacterium Tuberculosis in Complex with Coenzyme A and Aminoglycoside Substrates. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 653-658.
- 17) Vetting, M. W.; Magnet, S.; Nieves, E.; Roderick, S. L.; Blanchard, J. S. A Bacterial Acetyltransferase Capable of Regioselective N-Acetylation of Antibiotics and Histones. *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 565-573.
- 18) Nurizzo, B.; Shewry, S. C.; Perlin, M. H.; Brown, S. A.; Dholakia, J. N.; Fuchs, R. L.; Deva, T.; Baker, E. N.; Smith, C. A. The Crystal Structure of Aminoglycoside-3'-Phosphotransferase-IIa, an Enzyme Responsible for Antibiotic Resistance. *J. Mol. Biol.* **2003**, *327*, 491–506.
- 19) (a) Grubbs, R. H. *Handbook of Metathesis, Vols. 1, 2 & 3*. Ed. Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **2003**; pour des articles de revues, voir : (b) Conrad, J. C.; Fogg, D. E. Ruthenium-Catalyzed Ring-Closing Metathesis : Recent Advances, Limitations and Opportunities. *Curr. Org. Chem.* **2006**, *10*, 185-202; (c) Martin, S. F. Ring-Closing Metathesis: A facile Construct for Alkaloid Synthesis. *Pure and Applied Chemistry* **2005**, *77*, 1207-1212; (d) Grubbs, R. H. Olefin Metathesis

- Tetrahedron* **2004**, *60*, 7117-7140; (e) Schmidt, B.; Hermanns, J. Olefin Metathesis Directed to Organic Synthesis: Principles and Applications. *Top. Organomet. Chem.* **2004**, *7*, 223-267; (f) Connon, S. J.; Blechert, S. Recent Advances in Alkene Metathesis. *Top. Organomet. Chem.* **2004**, *7*, 93-124; (g) Connon, S. J.; Blechert, S. Recent Developments in Olefin Cross-Metathesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1900-1923; (h) Trnka, T. M.; Grubbs, R. H. The Development of $L_2X_2Ru:CHR$ Olefin Metathesis Catalysts: An Organometallic Success Story. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 18-29. (i) Fürstner, A. Olefin Metathesis and Beyond. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3012-3043.
- 20) Blount, K. F.; Zhao, F.; Hermann, T.; Tor, Y. Conformational Constraint as a Means for Understanding RNA-Aminoglycoside Specificity. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9818-9829.
- 21) (a) Tor, Y.; The Ribosomal A-site as an Inspiration for the Design of RNA Binders. *Biochimie* **2006**, *88*, 1045-1051; (b) Tor, Y. Targeting RNA with Small Molecules. *ChemBioChem* **2003**, *4*, 998-1007.
- 22) Zhao, F.; Zhao, Q.; Blount, K. F.; Han, Q.; Tor, Y.; Hermann, T. Molecular Recognition of RNA by Neomycin and a Restricted Neomycin Derivative. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5329-5334.
- 23) (a) Asensio, J. L.; Hidalgo, A.; Bastida, A.; Torrado, M.; Corzana, F.; Chiara, J. L.; Garcia-Junceda, E.; Canada, J.; Jimenez-Barbero, J. A Simple Structural-Based Approach to Prevent Aminoglycoside Inactivation by Bacterial Defense Proteins. Conformational Restriction Provides Effective Protection Against Neomycin-B Nucleotidylation by ANT4'. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8278-8279; (b) Bastida, A.; Hidalgo, A.; Chiara, J. L.; Torrado, M.; Corzana, F.; Pérez-Canadillas, J. M.; Groves, P.; Garcia-Junceda, E.; Gonzalez, C.; Jimenez-Barbero, J.; Asensio, J. L. Exploring the Use of Conformationally Locked Aminoglycosides as a New Strategy to Overcome Bacterial Resistance. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 100-116.

- 24) Scholl, M.; Ding, S.; Lee, C. W.; Grubbs, R. H. Synthesis and Activity of a New Generation of Ruthenium-Based Olefin Metathesis Catalysts Coordinated with 1,3-dimesityl-4,5-dihydroimidazol-2-ylidene Ligands. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 953-956.
- 25) Hanessian, S.; Szychowski, J.; Campos-Reales Pineda, N. B.; Furtos, A.; Keillor, J. W. 6-Hydroxy to 6'''-Amino Tethered Ring-to-Ring Macrocyclic Aminoglycosides as Probes for APH(3')-IIIa Kinase. *Bioorg. Med. Chem Lett.* **2007**, *17*, 3221-3225.
- 26)(a) Hanessian, S.; Takamoto, T. Aminoglycoside Antibiotics: Chemical Transformation of Paromomycin Into a Bioactive Pseudotrisaccharide. *Tetrahedron Lett.* **1974**, *46*, 4009-4012; (b) Hanessian, S.; Takamoto, T.; Massé, R.; Patil, G. Aminoglycoside Antibiotics: Chemical Conversion of Neomycin B, Paromomycin, and Lividomycin B Into Bioactive Pseudosaccharides. *Can. J. Chem.* **1978**, *56*, 1482-1491.
- 27) *Synthèse et Hémisynthèse d'aminoglycosides*. Thèse de Doctorat de Jean-Michel Vatele. Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, septembre **1981**.
- 28) Battistini, C.; Franceschi, G.; Zarini, F.; Cassinelli, G.; Arcamone, F. Semisynthetic Aminoglycoside Antibiotics. IV 3',4'-dideoxyparomomycin and Analogues. *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 98-101.
- 29)(a) Heller, D. N.; Clark, S. B.; Righter, H. F. Confirmation of Gentamicin and Neomycin in Milk by Weak Cation-Exchange Extraction and Electrospray Ionization/Ion Trap Tandem Mass Spectrometry. *J. Mass. Spectrom.* **2000**, *35*, 39-49; (b) Kalinkevich, A. N.; Sukhodub, L. F. Interactions Between Aminoglycoside Antibiotics and Carbohydrates Studied by 252Cf Plasma Desorption Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 2370-2372; (c) Kotretsou, S. I.; Constantinou-Kokotou, V. Mass Spectrometric Studies on the Fragmentation and

Structural Characterization of Aminoacyl Derivatives of Kanamycin A. *Carbohydr. Res.* **1998**, *310*, 121-127.

- 30) Hanessian, S.; Adhikari, S.; Szychowski, J.; Pachamuthu, K.; Wang, X.; Migawa, M. T.; Griffey, R. H.; Swayze, E. E. Probing the Ribosomal RNA A-site with Functionally Diverse Analogues of Paromomycin-Synthesis of Ring I Mimetics. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 827-846.

Chapitre 4
Inhibition de l'enzyme APH(3')-IIIa par
des analogues de la paromomycine

4.1. Exemples choisis dans la littérature décrivant l'inhibition d'enzyme désactivantes d'aminoglycoside.

L'inhibition des enzymes qui désactivent les aminoglycosides est un domaine de recherche très actif puisque ces enzymes sont la principale source de résistance à ces antibiotiques.¹ On peut diviser les inhibiteurs préparés à cette fin en deux catégories, ceux qui sont eux-mêmes des aminoglycosides et ceux qui ne le sont pas. Quelques antibiotiques aminoglycosides naturels sont des inhibiteurs de certaines enzymes désactivantes (Figure 4.1). Par exemple, la tobramycine, qui n'a pas de 3'-OH, est un inhibiteur compétitif de l'APH(3')-IIIa par rapport à la phosphorylation des autres aminoglycosides.² La constante d'inhibition (K_i) de la tobramycine pour l'APH(3')-IIIa a été déterminée à 2 μM .² Également, la paromomycine et les lividomycines, qui n'ont pas de 6'-NH₂ mais plutôt un 6'-OH, sont des inhibiteurs compétitifs (K_i entre 0.5 et 1 μM) de l'AAC(6')-II par rapport à l'acétylation des autres aminoglycosides.³

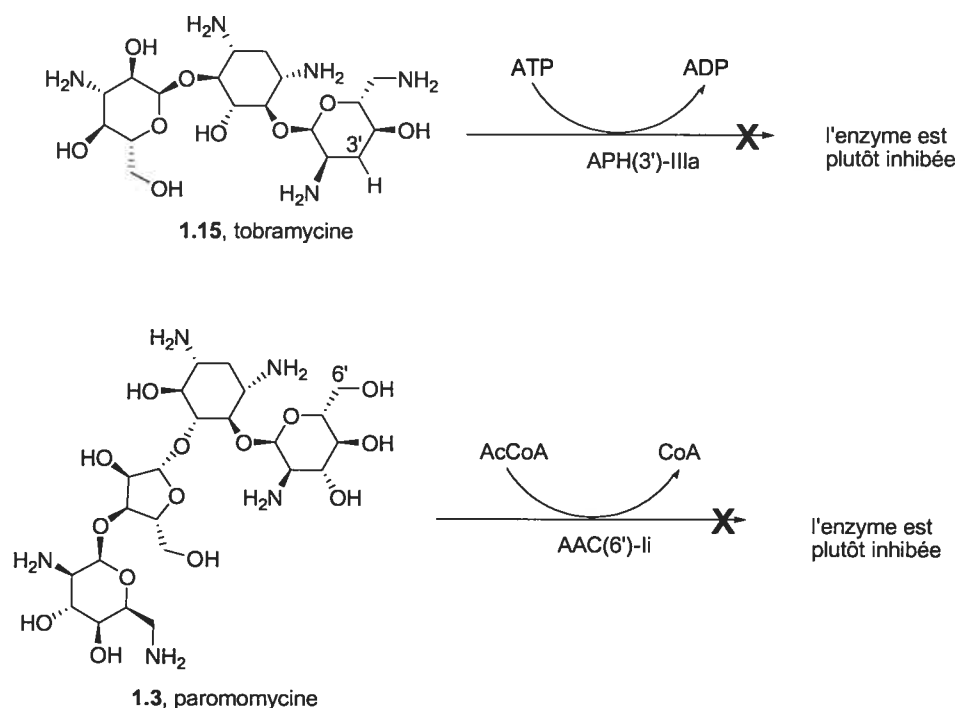


Figure 4.1. Aminoglycosides naturels qui sont des inhibiteurs d'enzymes désactivantes d'aminoglycosides.^{2,3}

4.1.1. Inhibiteurs aminoglycosidiques (1979 et 1994-2006).

En 1979, Northrop *et al.*⁴ ont préparé un inhibiteur de type disubstrat de l'AAC(3)-I en incubant d'abord la gentamicine C1a et le dérivé de l'AcCoA 4.1 en présence de l'AAC(3)-I, puis en déplaçant le chlore du composé 4.2 par le CoA en milieu basique pour obtenir l'inhibiteur 4.3 (Schéma 4.1). Un K_i de 9.2 nM a été mesurée pour cet inhibiteur par rapport à l'acétylation de la gentamicine C1a catalysée par l'AAC(3)-I. Cependant, l'inhibiteur 4.3 n'a pas été en mesure de renverser la résistance observée chez une souche de *E. coli* connue pour exprimer l'AAC(3)-I, probablement à cause de sa difficulté à traverser les membranes cellulaires.

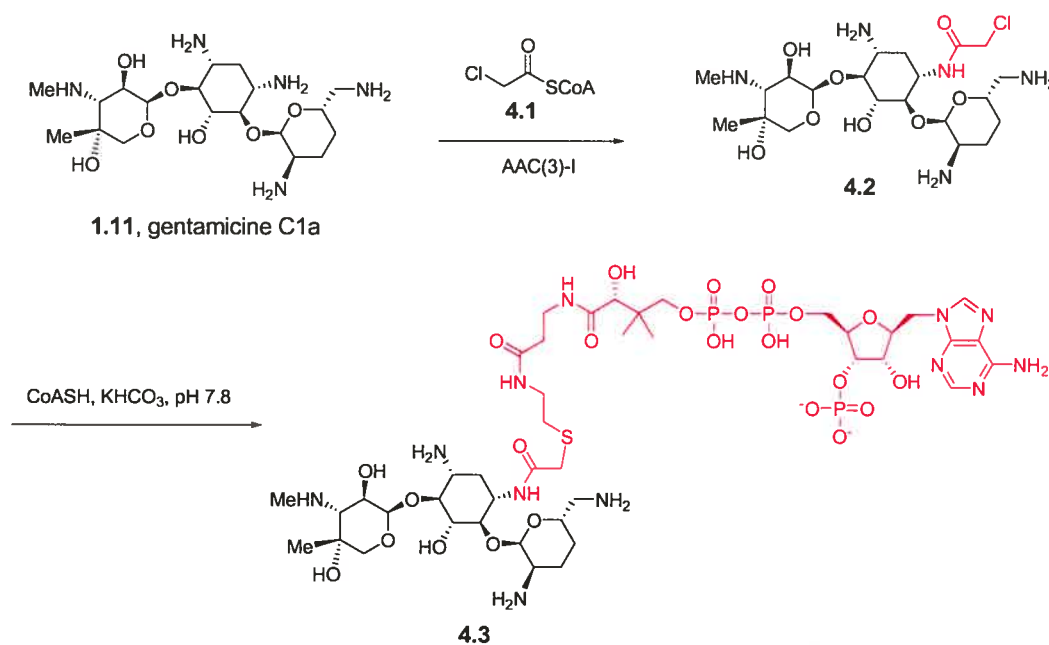


Schéma 4.1. Préparation d'un inhibiteur de l'AAC(3)-I par Northrop *et al.*⁴

D'autres inhibiteurs de type disubstrat ont été préparés par Mobashery *et al.*⁵, qui ont tenté d'inhiber des enzymes de la famille des APH(3'). La néamine (4.4), obtenue par la méthanolyse acide de la néomycine B (1.4),⁶ a été *N*-protégée, puis une formation sélective d'un acétal de la cyclohexanone a été effectuée pour obtenir le composé 4.5 (Schéma 4.2). L'alcool 3'-OH a été sélectivement protégé sous forme d'éther silylé, puis un traitement avec l'hydrure de sodium et le bromure de benzyle a mené à la formation du carbamate cyclique 4.6. La déprotection de l'éther silylé avec le fluorure de tétrabutylammonium puis l'alkylation de l'alcool 3'-OH ont permis l'isolation de bromures aliphatiques de différentes longueurs 4.7-4.10. Ces composés ont d'abord été traités avec le dérivé de l'adénosine 4.11 en présence d'hydroxyde de potassium, puis avec de l'hydroxyde de sodium en milieu aqueux afin de fournir les composés 4.12-4.15. Ceux-ci ont été traités avec l'acide trifluoroacétique puis avec de l'hydrogène en présence d'hydroxyde de palladium pour fournir les inhibiteurs de type disubstrat 4.16-4.19.

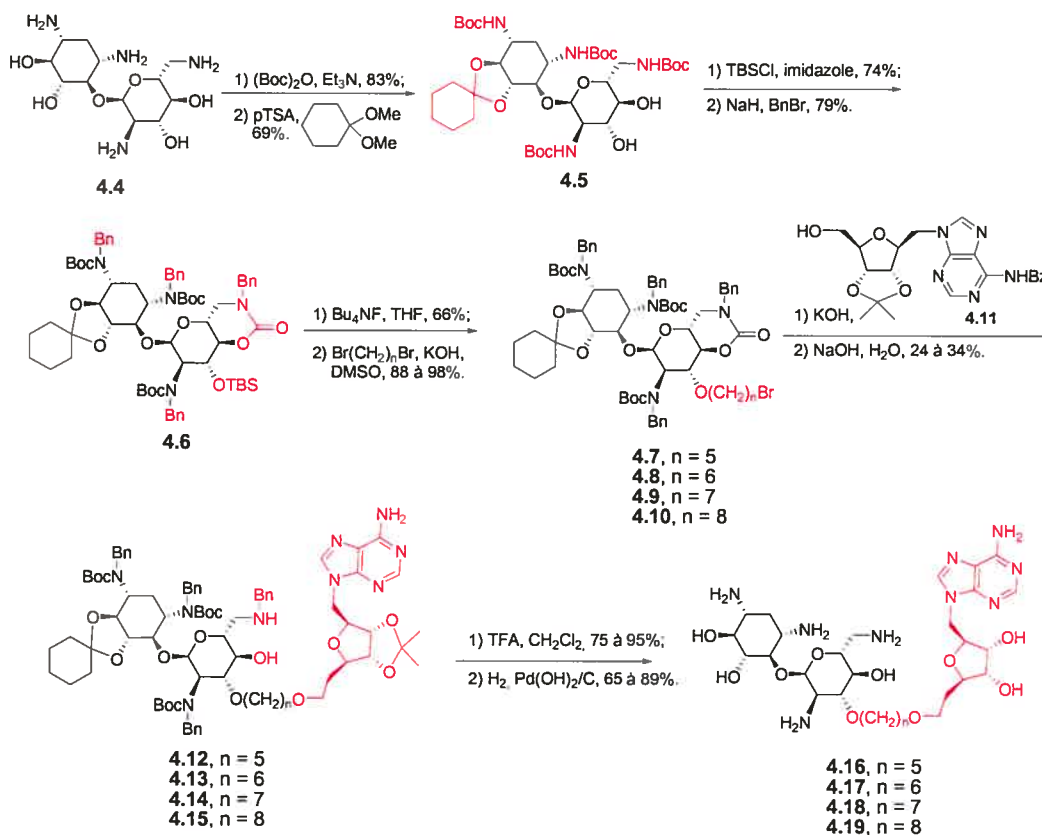


Schéma 4.2. Préparation d'inhibiteurs des APH(3')-Ia et -IIa par Mobashery *et al.*⁵

Les inhibiteurs (4.16-4.19) ont tous montré une inhibition globale non-compétitive, c'est à dire compétitive par rapport à la kanamycine A et partiellement compétitive par rapport à l'ATP. Deux de ces inhibiteurs (4.17 et 4.18) ont démontré des K_i entre 3 et 17 μM pour les enzymes APH(3')-Ia et -IIa par rapport à la phosphorylation de la kanamycine A. La capacité de ces inhibiteurs à renverser la résistance de souches bactériennes n'a pas été évaluée. Cependant, leur inaptitude probable à pénétrer les membranes cellulaires suppose qu'ils ne seraient pas en mesure de sensibiliser des souches de bactéries qui expriment des APH(3').

Des inhibiteurs de type disubstrat de l'AAC(6')-Ii ont été préparés récemment par Auclair *et al.*⁷ Le traitement de la néamine (4.4) avec le réactif 4.20, qui a réagi sélectivement avec l'amine primaire 6'-NH₂, suivi d'un traitement avec le CoA en milieu légèrement basique, a permis d'obtenir l'inhibiteur 4.21 (Schéma 4.3). Les inhibiteurs 4.22 et 4.23 ont été obtenus par une séquence réactionnelle similaire, à partir de la ribostamycine et de la kanamycine A, respectivement.

L'effet de la longueur de la chaîne carbonée entre le motif CoA et le motif néamine de l'inhibiteur 4.21 a été évalué en comparant son K_i avec ceux des inhibiteurs 4.25-4.27, qui ont été préparés d'une manière similaire à 4.21. Les inhibiteurs 4.21, 4.25 et 4.26 ont démontré des K_i entre 43 et 162 nM pour une inhibition de type compétitive de l'AAC(6')-Ii par rapport à l'AcCoA. Ces résultats démontrent que le cycle III des aminoglycosides n'est pas nécessaire pour ce type d'inhibiteur, puisque l'inhibiteur 4.21 est aussi puissant que les inhibiteurs 4.22 et 4.23.

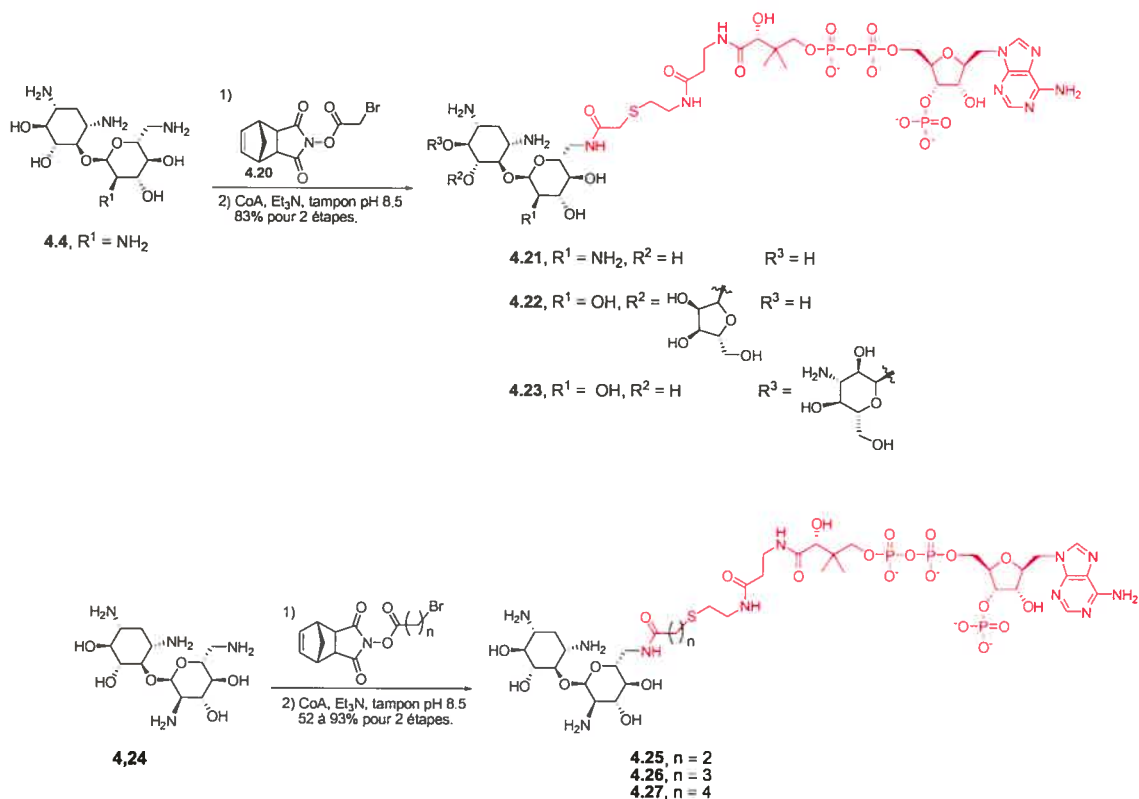
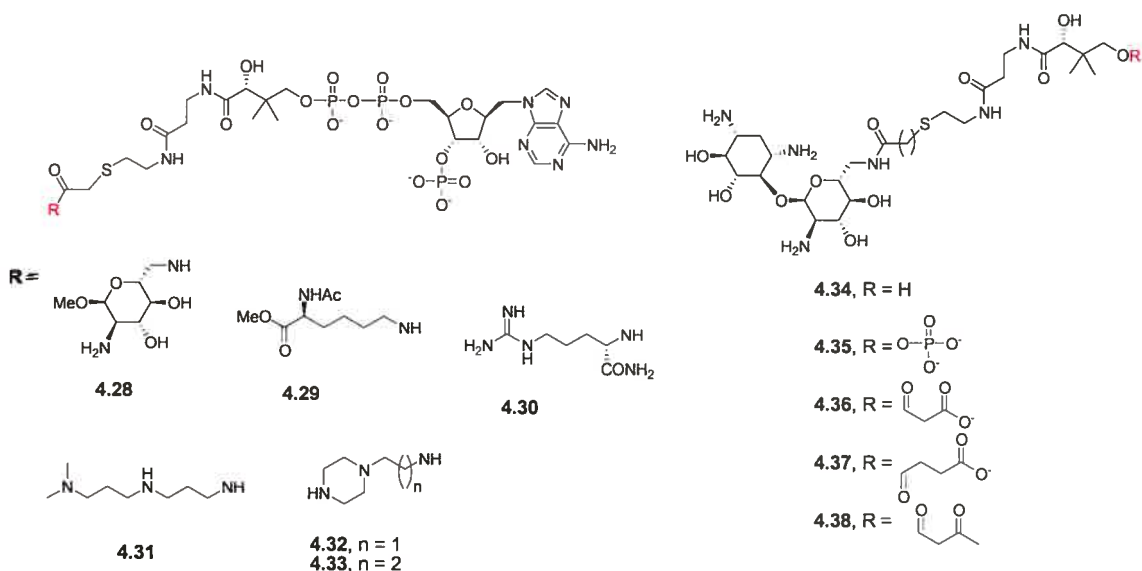


Schéma 4.3. Préparation d'un inhibiteur de l'AAC(6')-Ii par Auclair *et al.*⁷

L'inhibiteur **4.21**, décrit ci-haut, a fait l'objet d'une étude approfondie réalisée par Auclair *et al.*⁸ afin d'établir la relation entre sa structure et son pouvoir inhibiteur. Les résultats de cette étude sont présentés à la Figure 4.2 et résumés à la Figure 4.3. Aucun des inhibiteurs de deuxième génération (structures **4.29-4.38**) n'a démontré une K_i aussi intéressante que celle de l'inhibiteur initial **4.21**. Cependant, il a été établi que l'inhibiteur de deuxième génération **4.38**, probablement plus apte à pénétrer les membranes cellulaires, a diminué la résistance à la kanamycine A observée pour *E. faecium* C238, qui possède le gène codant pour l'AAC(6')-Ii.



Inhibiteur	K_i (μM)	Inhibiteur	K_i (μM)
4.28	3.2	4.34	≥ 200
4.29	130	4.35	12.8
4.30	1.2	4.36	≥ 1000
4.31	3.4	4.37	2.2
4.32	3.6	4.38	11
4.33	7.4		

Figure 4.2. Étude entre la structure et l'activité des inhibiteurs de l'AAC(6')-Ii préparés par Auclair *et al.*⁸

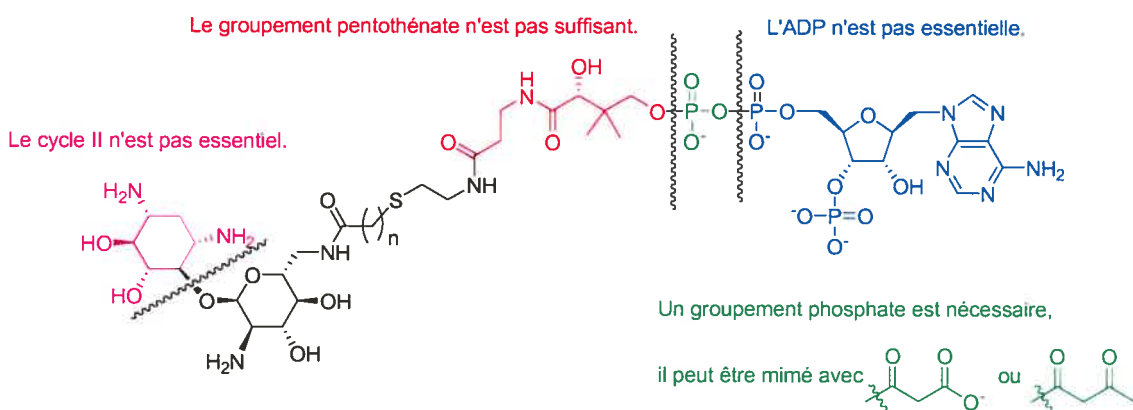


Figure 4.3. Résumé schématique de l'étude entre la structure et l'activité des inhibiteurs de l'AAC(6')-Ii préparés par Auclair *et al.*⁸

En 1995, Mobashery *et al.*⁹ ont préparé des aminoglycosides semi-synthétiques dans le but d'inhiber irréversiblement les enzymes APH(3')-Ia et -IIa. Pour ce faire, ils ont protégé les amines de la néamine (**4.4**) – à l'exception de l'amine 2'-NH₂ – avec le réactif **4.39**¹⁰ afin d'obtenir le composé **4.40** (Schéma 4.4). Ensuite, ils ont protégé les alcools – excepté l'alcool 6-OH – et l'amine 2'-NH₂ avec des groupements triméthylsilyles (TMS). Une hydrolyse du groupement 2'-N-TMS a été effectuée pour libérer l'amine correspondante. L'oxydation de cette amine avec l'acide *mé*ta-chloro-perbenzoïque (m-CPBA) a fourni le composé **4.41**. La déprotection des groupements *N*-*tert*-butyloxycarbonyles par un traitement à l'acide trifluoroacétique a fourni l'inhibiteur **4.42**.

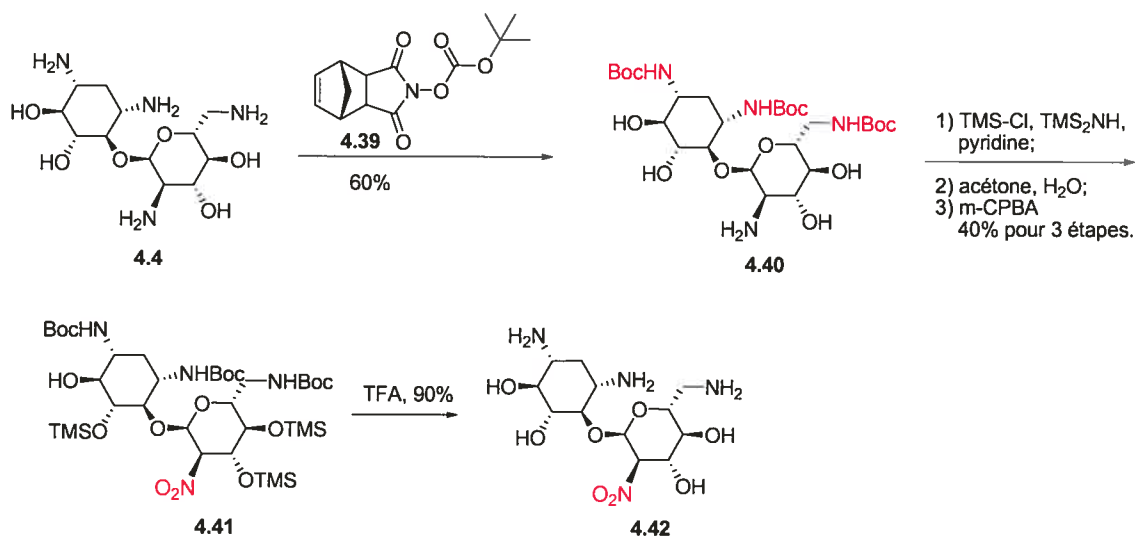


Schéma 4.4. Préparation d'un inhibiteur des APH(3')-Ia et -IIa par Mobashery *et al.*⁹

Les K_i de l'inhibiteur **4.42** pour les APH(3')-Ia et -IIa ont été déterminés à 24 et 15 mM, respectivement. Le mécanisme d'action proposé pour cet inhibiteur est illustré à la Figure 4.4. Le pKa du proton C2'-H est diminué par la présence du groupement C2'-NO₂ et lorsque le groupement hydroxyle 3'-OH est phosphorylé, le phosphate résultant (composé **4.43**) est éliminé. Même si les auteurs n'ont pas obtenu d'évidences, une fonction nucléophile de l'enzyme s'ajouterait de manière conjuguée sur le nitroalcène correspondant et l'enzyme ainsi piégée ne serait plus en mesure de catalyser la phosphorylation des aminoglycosides.

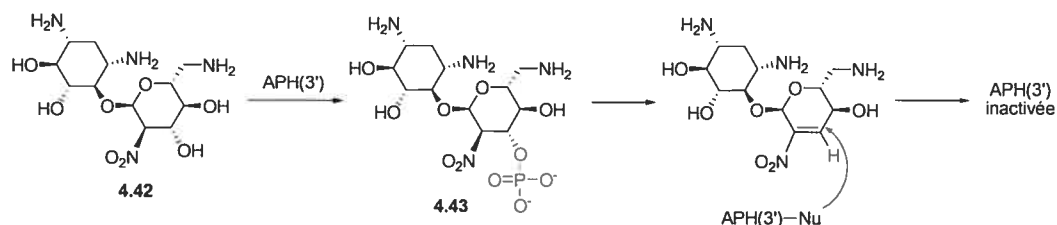


Figure 4.4. Mécanisme d'action proposé pour un inhibiteur irréversible des APH(3')-Ia et -IIa, préparé par Mobashery *et al.*⁹

En 1998, Mobashery *et al.*¹¹ ont préparé d'autres aminoglycosides semi-synthétiques dans le but d'inhiber l'enzyme APH(3')-IIa de manière irréversible. L'inhibiteur 4.44 a été obtenu en traitant le composé 4.40, décrit ci-haut, avec l'anhydride 2-bromoacétique, puis avec l'acide trifluoroacétique (Schéma 4.5). Le brome est déplacé par une fonction nucléophile de l'enzyme, qui devient incapable de catalyser la phosphorylation des aminoglycosides. Une K_i de 12 mM a été observée pour l'inhibiteur 4.44 pour l'APH(3')-IIa. La détermination des résidus de l'APH(3')-IIa qui agissent comme nucléophiles a été réalisée par spectrométrie de masse.¹²

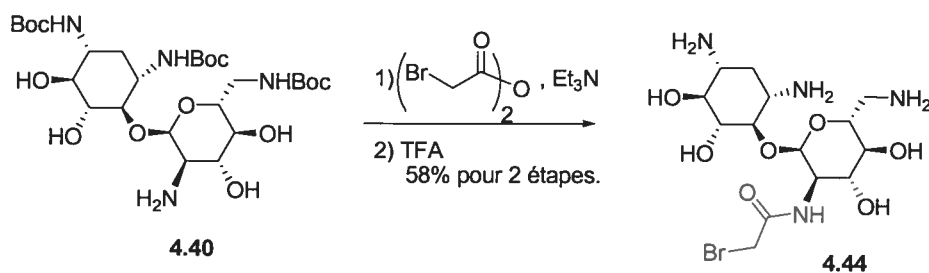


Schéma 4.5. Préparation d'un inhibiteur irréversible de l'APH(3')-IIa par Mobashery *et al.*¹²

D'autres travaux de Mobashery *et al.*¹³ ont permis l'obtention d'un aminoglycoside semi-synthétique qui est un substrat pour les APH(3')-Ia et -IIa, mais qui est régénéré après avoir été phosphorylé. La kanamycine A (1.7) a été traitée avec le chloroformate de benzyle puis avec la 1,1-diméthoxycyclohexane afin d'obtenir le composé 4.45 (Schéma 4.6). L'unique groupement hydroxyle a été protégé avec un groupement méthoxyméthyle (MOM), puis les deux acétals cyclohexylidéniques les plus tendus ont été méthanolysés en milieu acide pour obtenir le composé 4.46. Un carbamate cyclique a été formé par traitement avec l'hydruide de sodium dans la diméthylformamide, puis un groupement cyclohexylidène a été introduit à nouveau pour fournir le composé 4.47. Un groupement *tert*-butyloxycarbonyle a ensuite été introduit sur l'azote du carbamate cyclique et le groupement hydroxyle 3'-OH a été oxydé par le périodinate de Dess-Martin pour préparer la cétone 4.48. L'ouverture du carbamate cyclique en milieu aqueux basique, le clivage du groupement *N-tert*-butyloxycarbonyle en présence d'acide trifluoroacétique puis l'hydrogénolyse des groupements benzyloxycarbonyles ont produit le composé désiré 4.49.

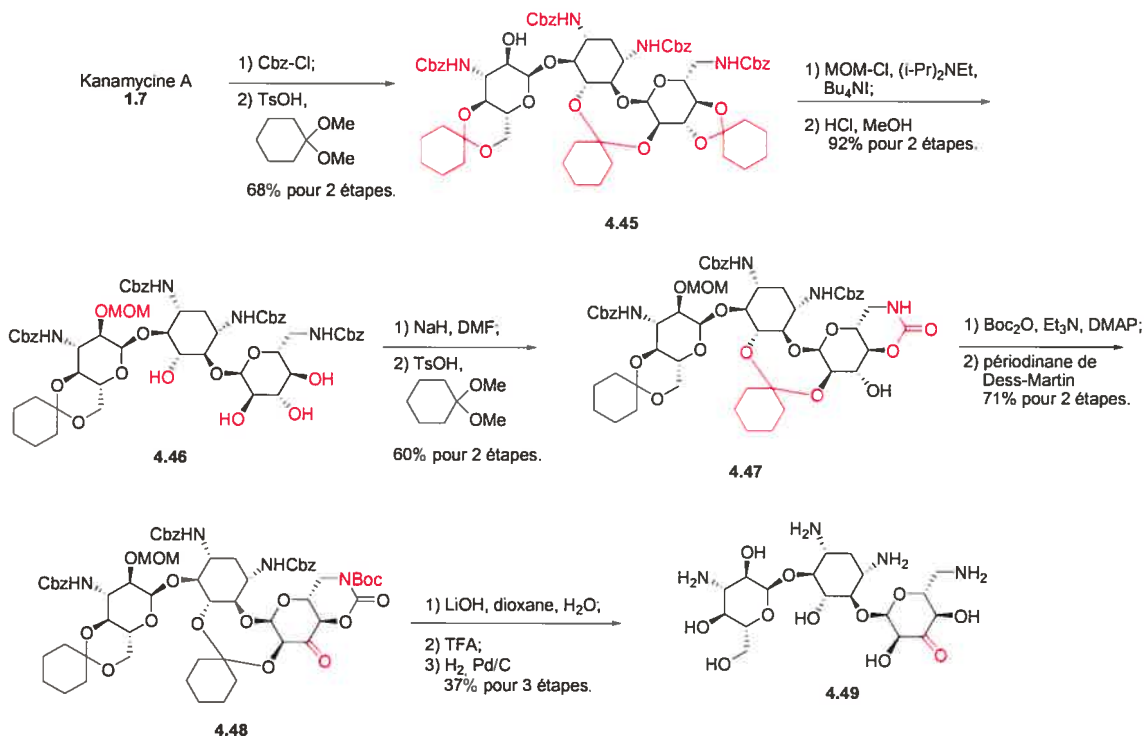


Schéma 4.6. Préparation de l'aminoglycoside semi-synthétique **4.49** par Mobashery *et al.*¹³

Il a été démontré que l'activité antibactérienne de l'analogue **4.49** est de 4 à 8 fois meilleure que celle de la kanamycine A (**1.7**) contre des souches bactériennes qui expriment l'APH(3')-Ia. Par contre, cet analogue est moins actif que la kanamycine A (**1.7**) contre une souche non-résistante. En milieu aqueux, l'hydratation de la cétone du composé **4.49** se produit pour former le composé **4.50**. La phosphorylation d'un groupement hydroxyle, catalysée par une APH(3'), permet la régénération de la cétone par l'élimination intramoléculaire d'un phosphate (Figure 4.5).

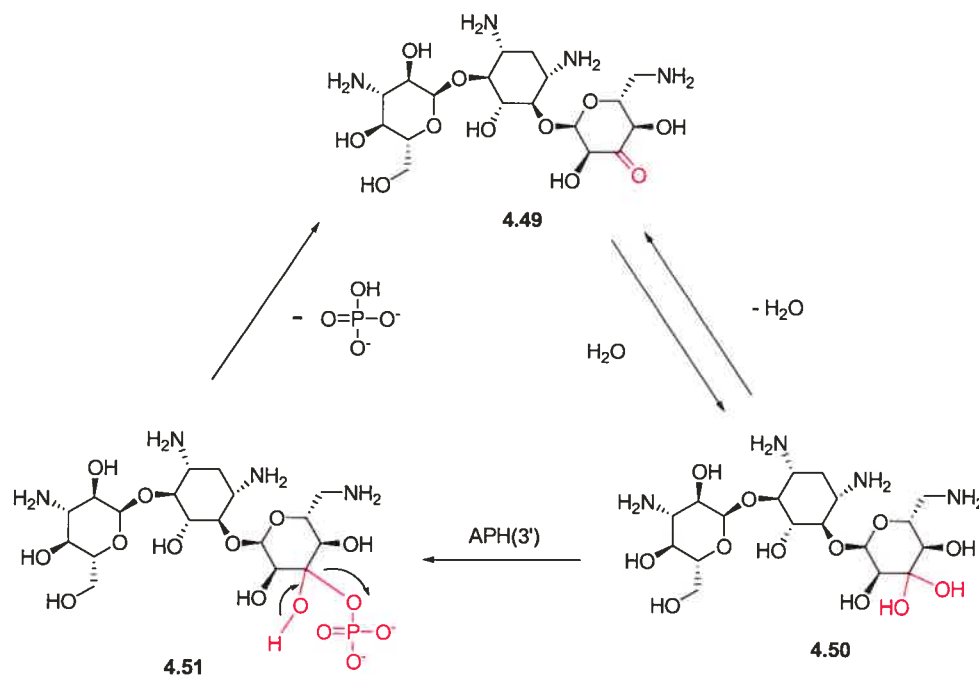


Figure 4.5. Mécanisme proposé pour la phosphorylation-régénération d'un aminoglycoside semi-synthétique préparé par Mobashery *et al.*¹³

4.1.2. Inhibiteurs non-aminoglycosidiques.

En 1982, Allen *et al.*¹⁴ ont observé que la 7-hydroxytropolone (**4.52**) inhibe une enzyme de la famille des ANT(2'') avec une K_i de 10 μM et une inhibition compétitive par rapport à l'ATP (Figure 4.6). Une souche de *E. coli* qui est normalement peu susceptible à la tobramycine non plus qu'à la gentamicine a été sensibilisée par la présence de cet inhibiteur.

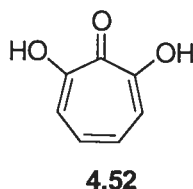
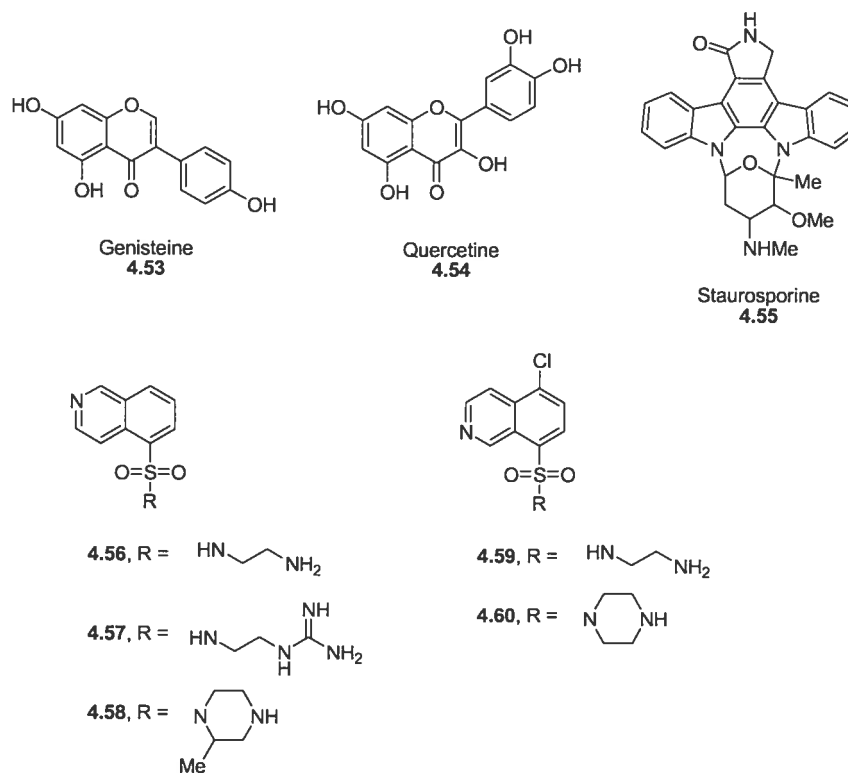


Figure 4.6. La 7-hydroxytropolone (**4.52**) inhibe une ANT(2'') selon Allen *et al.*¹⁴

Après que la similarité entre la structure de l'APH(3')-IIIa et quelques kinases eucaryotes ait été établie,¹⁵ Wright *et al.*¹⁶ ont évalué le potentiel d'inhibition de l'APH(3')-IIIa et de l'enzyme bifonctionnelle AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia (Figure 4.7) par quelques inhibiteurs connus de kinases eucaryotes (**4.53-4.60**). La plupart des inhibiteurs de kinases d'eucaryotes étudiés ont été capables d'inhiber ces deux enzymes désactivantes d'aminoglycosides (voir les K_i à la Figure 4.7). Cependant, les K_i qu'ils ont déterminées se sont avérées beaucoup moins intéressantes que celles obtenues pour les kinases eucaryotiques. Puisque les inhibiteurs étudiés inhibent aussi des kinases eucaryotiques importantes pour les humains en imitant l'ATP, ces molécules (**4.53-4.60**) auraient probablement des effets secondaires indésirables si elles étaient utilisées conjointement à des aminoglycosides.



Composé	K_i (μM)	
	APH(3')-IIIa	AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia
4.53	≥ 500	≥ 250
4.54	126	≥ 250
4.55	≤ 0.7	≤ 1
4.56	138	63
4.57	49	151
4.58	730	137
4.59	66	87
4.60	290	≥ 500

Figure 4.7. Évaluation du potentiel d'inhibiteurs de kinases eucaryotes à inhiber l'APH(3')-IIIa ainsi que l'enzyme bifonctionnelle AAC(6')-Ie-APH(2'')-Ia par Wright *et al.*¹⁶

Puisque qu'on retrouve une prépondérance de résidus anioniques dans le site actif de la plupart des enzymes qui désactivent les aminoglycosides, Wright *et al.*¹⁷ ont vérifié le potentiel de plusieurs antibiotiques peptidiques polycationiques à inhiber différentes AACs et APHs (Figure 4.8). Les inhibiteurs qu'ils ont identifiés (4.61-4.62) restent encore aujourd'hui les seuls à pouvoir inhiber des enzymes désactivantes d'aminoglycosides de deux classes différentes (AAC et APH). Cependant, aucun de ces inhibiteurs n'a été en mesure d'améliorer l'activité d'aminoglycosides contre des organismes qui possèdent des gènes de résistance.

Séquence d'acides aminés de l'inhibiteur 4.61 : ILAWKWAWWAWRR-NH₂

Séquence d'acides aminés de l'indolicidine (4.62) : ILPWKWPWWPWRR-NH₂

Enzyme	Inhibiteur	Substrat variable	Mode d'inhibition ^a	K _i	K _i '
APH(2'')-Ia	4.61	Kanamycine A	NC	22.1	b
		ATP	NC	23.8	b
	4.62	Kanamycine A	NC	10.1	b
		ATP	NC	7.7	b
APH(3')-IIIa	4.61	Kanamycine A	NC	14.6	b
		ATP	NC	10.3	b
	4.62	Kanamycine A	NC	30.5	b
		ATP	NC	13.8	b
AAC(6')-Ii	4.61	Kanamycine A	C	4.2	
		AcCoA	NC	38.0	b
	4.62	Kanamycine A	C	2.4	
		AcCoA	NCM	4.8	31.7

^a NC = non-compétitif simple, C = compétitif, NCM = non-compétitif mixte.

^b pour un mode d'inhibition non-compétitif simple : K_i = K_i'.

Figure 4.8. Évaluation du potentiel inhibiteur d'antibiotiques peptidiques polycationiques par Wright *et al.*¹⁷

En 2003, Wright *et al.*¹⁸ ont observé que le 1-(bromométhyl)phénanthrène (**4.63**) est un inhibiteur irréversible de l'AAC(6')-Ie (Figure 4.9). Le déplacement du brome par un groupement carboxylate d'un résidu du site actif agissant comme base générale lors de l'acétylation des aminoglycosides serait responsable de l'inactivation de l'enzyme. En raison de problèmes reliés à son insolubilité, les paramètres cinétiques conventionnels de l'inhibiteur **4.63** n'ont pas été déterminés mais les auteurs ont démontré qu'il est un inhibiteur irréversible qui alkyle la base générale de l'enzyme, le groupement carboxylate du résidu Asp99. Pour ce faire, ils ont d'abord préparé les mutants Asp99Ala, Asp99Asn et Asp99Glu de l'AAC(6')-Ie et ils ont établi que les deux premiers mutants, qui n'ont pas de groupement carboxylate, ne sont pas inhibés par le 1-(bromométhyl)phénanthrène (**4.63**) alors que le troisième mutant, qui possède un groupement carboxylate, l'est partiellement. Ils ont aussi démontré que le pK_a de la réaction d'inactivation est de 7.2, ce qui correspond au pK_a du résidu Asp99.

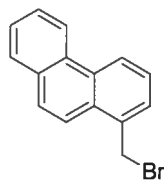
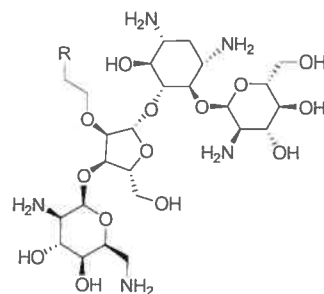
**4.63**

Figure 4.9. Le 1-(bromométhyl)phénanthrène (**4.63**) est un inhibiteur irréversible de l'AAC(6')-Ie selon Wright *et al.*¹⁸

4.2. Inhibitions de l'APH(3')-IIIa par des analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O2''.

Je tiens d'abord à remercier le professeur Jeffrey W. Keillor pour m'avoir permis d'utiliser son laboratoire pour tous les expériences avec l'APH(3')-IIIa et pour ses nombreux conseils. Comme il a été mentionné au chapitre précédent, nous avons observé que les analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O2'' que nous avons étudiés ont été phosphorylés plus lentement que la paromomycine (Tableau XV). Dans le but d'identifier quels analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O2'' sont phosphorylés les plus lentement, nous avons comparé leur vitesse de phosphorylation initiale (V_0), c'est-à-dire leur vitesse de phosphorylation dans les mêmes conditions expérimentales (Tableau XV). Ceci nous a permis de calculer leur vitesse de phosphorylation relative (V_{rel}). Pour les analogues **2.106**, **2.108**, **2.124** et **2.128**, nous n'avons pas été en mesure de détecter la phosphorylation dans les conditions expérimentales utilisées. Pour les autres analogues, nous avons constaté que la fonctionnalisation de la position O2'' de la paromomycine provoque une diminution de la vitesse de la phosphorylation d'un ordre de grandeur par rapport à celle de la paromomycine, sans que l'identité de la chaîne latérale ajoutée n'est d'effet significatif.

Le fait que les analogues **2.116**, **2.118**, **2.119**, **2.124** et **2.127** soient phosphorylés plus lentement que la paromomycine ne nous a pas étonnés, puisque nous avons délibérément choisi d'introduire des chaînes latérales volumineuses (et parfois hydrophobiques) à la position O2'' de la paromomycine justement pour diminuer l'affinité pour les enzymes désactivantes en générale (voir Chapitre 2). Par contre, le fait que la phosphorylation d'analogues possédant des chaînes latérales moins volumineuses soit significativement plus lente que celle de la paromomycine et que la phosphorylation de quelques analogues soit indétectable nous a agréablement surpris. D'autant plus que l'APH(3')-IIIa une enzyme reconnue pour la flexibilité de son site actif et pour tolérer une grande variété de substrats aminoglycosidiques¹⁹ (pour une description plus détaillée du site actif et du mécanisme de l'APH(3')-IIIa, voir Chapitre 3).



Composé	R	V_0^a nM/s	V_{rel}	Composé	R	V_0^a nM/s	V_{rel}
paromomycine (1.3)	N.A.	54.9	1	2.116		7.6	0.14
2.95		9.1	0.17	2.118		8.7	0.16
2.102		12.2	0.22	2.119		9.5	0.17
2.104		8.3	0.15	2.120		11.1	0.20
2.105		9.8	0.18	2.121		10.9	0.20
2.106		N.D. ^b	< 0.08	2.122		6.8	0.12
2.107		6.4	0.12	2.123		5.6	0.10
2.108		N.D. ^b	< 0.08	2.124		N.D. ^b	< 0.08
2.109		7.0	0.13	2.127		5.4	0.10
2.110		8.3	0.15	2.128		N.D. ^b	< 0.08
2.111		6.2	0.11	2.129		6.6	0.12
2.114		7.2	0.13	2.130		11.7	0.21
2.115		5.4	0.10	2.141		5.2	0.09

^a les conditions utilisées pour déterminer V_0 sont détaillées dans la partie expérimentale.

^b N.D. non détectable.

Tableau XV. Vitesses relatives pour la phosphorylation des analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O2''.

Pour comprendre pourquoi l'APH(3')-IIIa ne semble pas être en mesure de catalyser la phosphorylation de certains analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O2'', comme **2.106**, **2.108**, **2.124** et **2.128**, nous avons vérifié si certains d'entre eux (**2.106** et **2.108**) étaient admis dans le site actif de l'enzyme. Pour ce faire, nous avons évalué l'impact de leur présence à différentes concentrations sur la vitesse de la phosphorylation de l'amikacine, un substrat connu de l'enzyme. Nous avons supposé que si ces analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O2'' étaient admis dans le site actif de l'enzyme, ils auraient un impact sur le taux de phosphorylation des autres substrats de l'APH(3')-IIIa en entrant en compétition avec eux pour le site actif de l'enzyme.

Nous avons choisi d'utiliser l'amikacine comme substrat de l'APH(3')-IIIa pour des raisons pratiques. En effet, son K_m publié² de 245 μM (quoique nous avons observé 150 μM) est plus élevé que celui des autres aminoglycosides commercialement disponibles, ce qui facilite la détection du signal relié à sa phosphorylation aux concentrations utiles. Aussi, l'amikacine n'est phosphorylée qu'une fois, contrairement à d'autres aminoglycosides tels que la paromomycine et la néomycine B, qui montrent une courbe de phosphorylation diphasique²⁰ compliquant inutilement les mesures.

4.2.1. Détermination des constantes d'inhibition et du type d'inhibition par rapport à l'amikacine.

En mesurant la vitesse de la phosphorylation de l'amikacine en présence de différentes concentrations des composés **2.106** et **2.108**, nous avons déterminé que ces analogues de la paromomycine exercent une inhibition de type non-compétitive mixte ($K_i \neq K_i'$). C'est à dire que l'inhibition est compétitive et incompétitive à la fois. En effet, les régressions non-linéaires des vitesses de phosphorylations de l'amikacine en fonction de la concentration de l'amikacine à différentes concentrations d'inhibiteur montrent que le $K_m(\text{app})$ augmente, alors que le $V_{\text{max}}(\text{app})$ diminue lorsque la concentration de l'inhibiteur augmente, ce qui est typique d'une inhibition de type non-compétitive mixte (Figures 4.10 et 4.11).

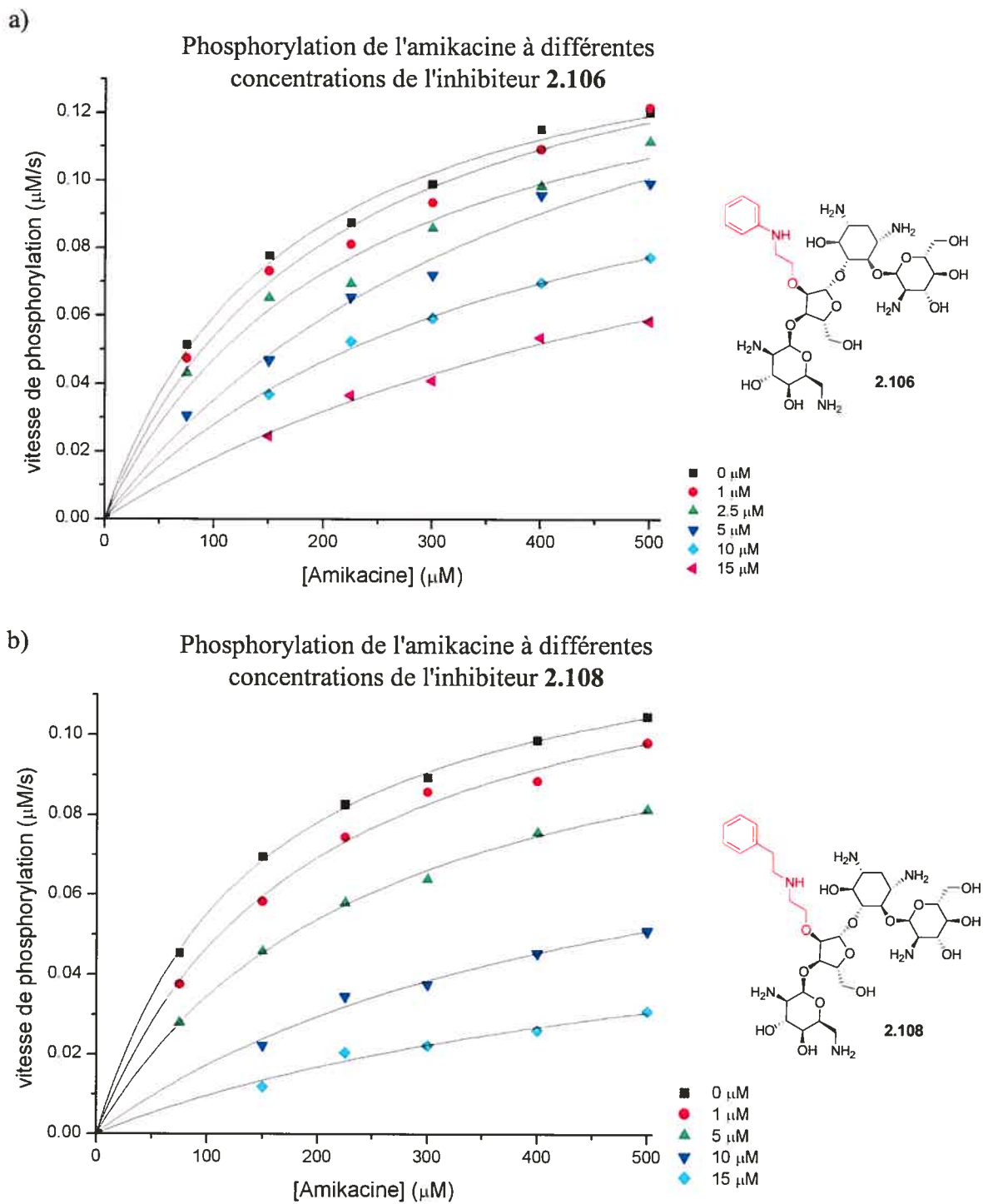


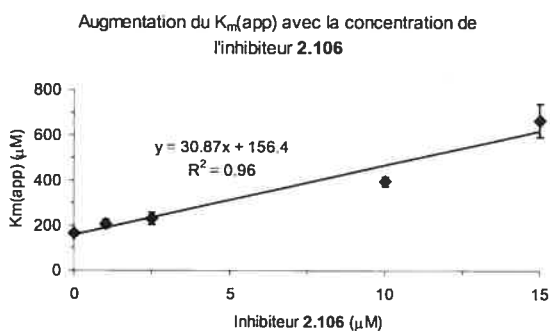
Figure 4.10. Impact des analogues 2.106 et 2.108 sur la vitesse de la phosphorylation de l'amikacine.

a)

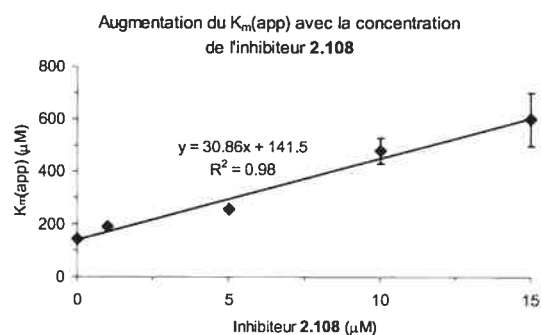
Concentration de l'inhibiteur (μM)	$K_m(\text{app})$ avec 2.106 ^a (μM)	$K_m(\text{app})$ avec 2.108 ^a (μM)	$V_{\text{max}}(\text{app})$ avec 2.106 ^a ($\mu\text{M/s}$)	$V_{\text{max}}(\text{app})$ avec 2.108 ^a ($\mu\text{M/s}$)
0	164.7 ± 19	142.9 ± 5	0.159 ± 0.007	0.134 ± 0.002
1	207.1 ± 35	190.1 ± 19	0.166 ± 0.011	0.135 ± 0.005
2.5	229.7 ± 51	n.d. ^c	0.156 ± 0.015	n.d. ^c
5	435.4 ± 92^b	255.2 ± 18	0.189 ± 0.023^b	0.122 ± 0.004^b
10	394.1 ± 41	477.4 ± 101	0.138 ± 0.008	0.100 ± 0.012
15	666.0 ± 148	598.5 ± 206	0.138 ± 0.020	0.067 ± 0.015

^a Déterminé à partir des régressions non-linéaires (Figure 4.10), ^b valeurs rejetées, ^c non déterminé.

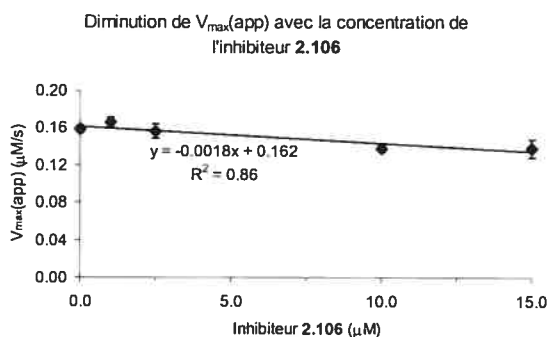
b)



c)



d)



e)

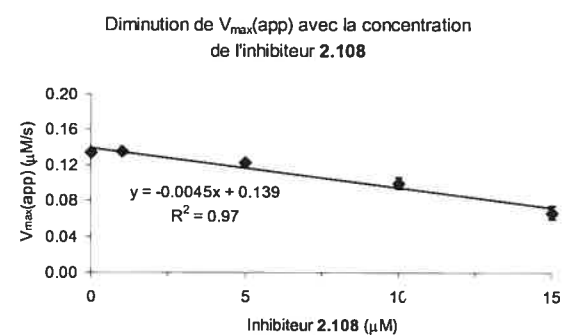


Figure 4.11. Variation des $K_m(\text{app})$ et $V_{\text{max}}(\text{app})$ de l'amikacine pour l'APH(3')-IIIa en fonction de la concentration des inhibiteurs 2.106 et 2.108.

Ces observations nous laissent croire que le mécanisme de l'inhibition de l'APH(3')-IIIa par les analogues de la paromomycine fonctionnalisés à la position O2'' **2.106** et **2.108** serait celui qui est représenté à la Figure 4.12. Selon ce modèle, l'inhibiteur est en compétition avec le substrat pour chaque forme de l'enzyme connue pour lier le substrat.

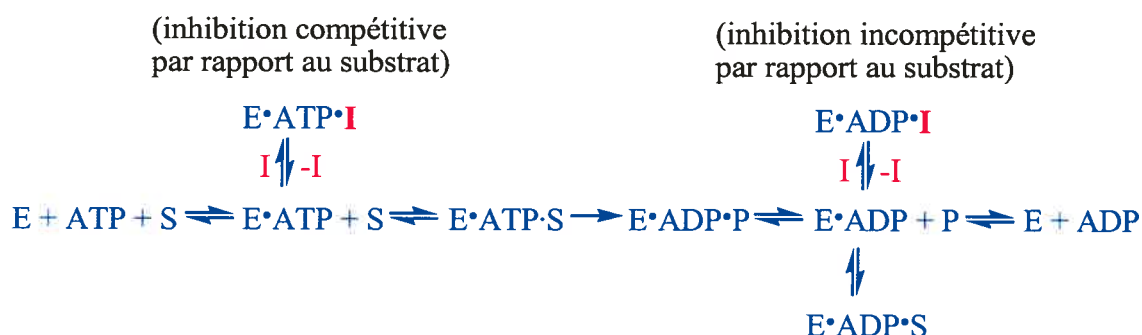
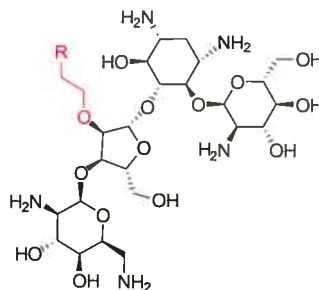


Figure 4.12. Mécanisme proposé pour l'inhibition non-compétitive mixte de l'APH(3')-IIIa par rapport à la phosphorylation de l'amikacine pour les inhibiteurs **2.106** et **2.108**.

À partir des équations des régressions linéaires des graphiques présentés à la Figure 4.11, nous avons déterminé une K_i de 3.9 μM et une K_i' de 69.4 μM pour l'inhibiteur **2.106** et une K_i de 1.0 μM et une K_i' de 14.2 μM pour l'inhibiteur **2.108** (Tableau XVI). L'inhibition compétitive est donc beaucoup plus importante que l'inhibition incompétitive pour ces inhibiteurs.




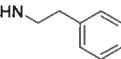
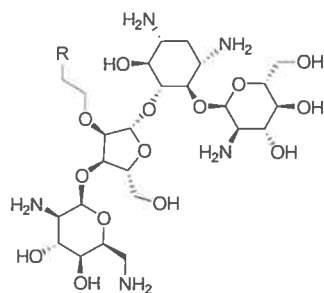
Inhibiteur	R	K_i (μM)	K_i' (μM)
2.106		3.9	69.4
2.108		1.0	14.2

Tableau XVI. K_i' et K_i des analogues **2.106** et **2.108**.

4.2.2. Détermination des IC_{50} .

Nous avons déterminé les IC_{50} (concentration inhibitrice à 50%) de plusieurs analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O2'' (Tableau XVII). Comme les analogues 2.106 et 2.108, nous supposons que ces composés démontrent une inhibition de type non-compétitive mixte de l'APH(3')-IIIa. Ces IC_{50} indiquent que la chaîne latérale a peu d'influence sur le pouvoir inhibiteur des analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O2''. En effet, les IC_{50} varient seulement d'un ordre de grandeur ce qui est minime considérant la grande variabilité stérique, électronique ainsi que du caractère hydrophobique des chaînes latérales étudiées. Pour cette raison, nous croyons que ces chaînes latérales contribuent peu à l'affinité de ces inhibiteurs pour le site actif de l'enzyme. Il est fort probable que l'affinité pour l'enzyme qui est due à la portion aminoglycosidique soit tellement importante par rapport à celle provenant de la chaîne latérale que cette dernière contribue peu à l'affinité globale de l'inhibiteur pour le site actif de l'APH(3')-IIIa.



Composé	R	IC ₅₀ μM	Composé	R	IC ₅₀ μM
paromomycine (1.3)	N.A. ^a	N.A. ^a	2.116		5.0
2.95		17.2	2.118		30.3
2.102		30.6	2.119		37.1
2.104		2.0	2.120		6.0
2.105		4.3	2.121		2.3
2.106		12.3	2.122		12.4
2.107		16.1	2.123		21.1
2.108		9.5	2.124		2.8
2.109		18.5	2.127		39.2
2.110		24.2	2.128		5.5
2.111		11.7	2.129		4.3
2.114		3.1	2.130		12.7
2.115		16.0	2.141		2.2

^a N.A. = non applicable.

Tableau XVII. IC₅₀ des analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O2".

4.2.3. Identification des meilleurs inhibiteurs.

En tentant d'identifier les meilleurs inhibiteurs pour les analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O2'' que nous avons, nous avons postulé qu'un tel inhibiteur serait celui qui aurait la plus grande affinité pour l'APH(3')-IIIa, tout en étant phosphorylé le plus lentement possible, ou idéalement pas phosphorylé du tout. Nous avons alors construit le graphique représenté à la Figure 4.13 qui prend en considération l'affinité pour l'enzyme (reliée au facteur IC_{50}) et la vitesse de phosphorylation (V_{rel}) pour chaque inhibiteur. Selon notre postulat, les meilleurs inhibiteurs seraient ceux situés le plus près du point 0,0 dans le graphique présenté à la Figure 4.13. Nous avons fixé arbitrairement que les meilleurs inhibiteurs sont ceux qui sont phosphorylés avec une V_{rel} inférieure ou égale à 0.09 et qui ont un IC_{50} inférieur à 15 μ M. Cette étude entre la structure et le potentiel inhibiteur ne nous a pas permis d'établir les pré-requis structuraux pour qu'un inhibiteur se retrouve dans la zone des bons inhibiteurs. Toutefois cette étude nous a permis de déterminer que les meilleurs inhibiteurs dans la série des composés que nous avons sont **2.106**, **2.108**, **2.124**, **2.128** et **2.141**.

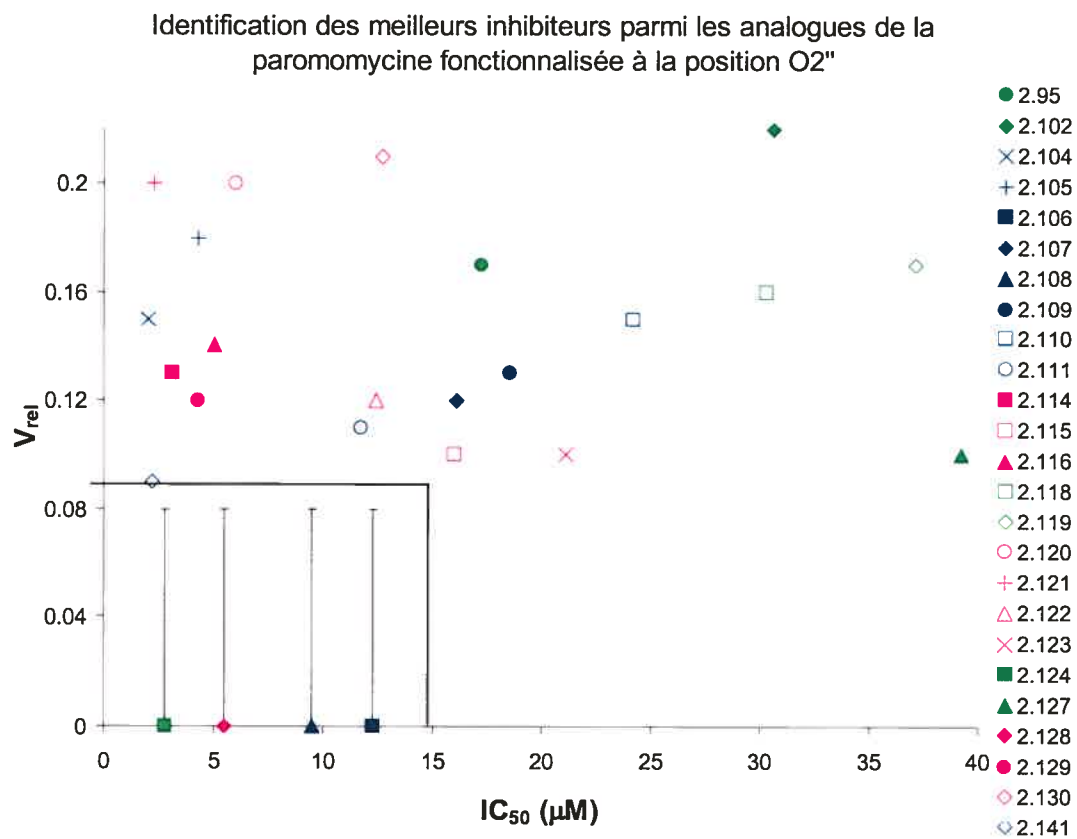


Figure 4.13. Relation entre la vitesse de phosphorylation relative (V_{rel}) et le IC_{50} des analogues de la paromomycine fonctionnalisée à la position O2''

4.2.4. Détermination du type d'inhibition par rapport à l'ATP.

Pour mieux comprendre le mécanisme de l'inhibition de l'APH(3')-IIIa par les analogues de la paromomycine fonctionnalisés à la position O2'', nous avons étudié l'impact de l'inhibiteur **2.108** sur la phosphorylation de l'amikacine à différentes concentrations d'ATP (Figure 4.14). Aux basses concentrations d'inhibiteur (<5 μM), nous avons observé une inhibition de type incompétitive pour l'inhibiteur **2.108** par rapport à l'ATP lors de la phosphorylation de l'amikacine. Ceci indique que la chaîne latérale à la position O2'' de la paromomycine n'est pas en compétition avec l'ATP pour son site de liaison dans l'enzyme.

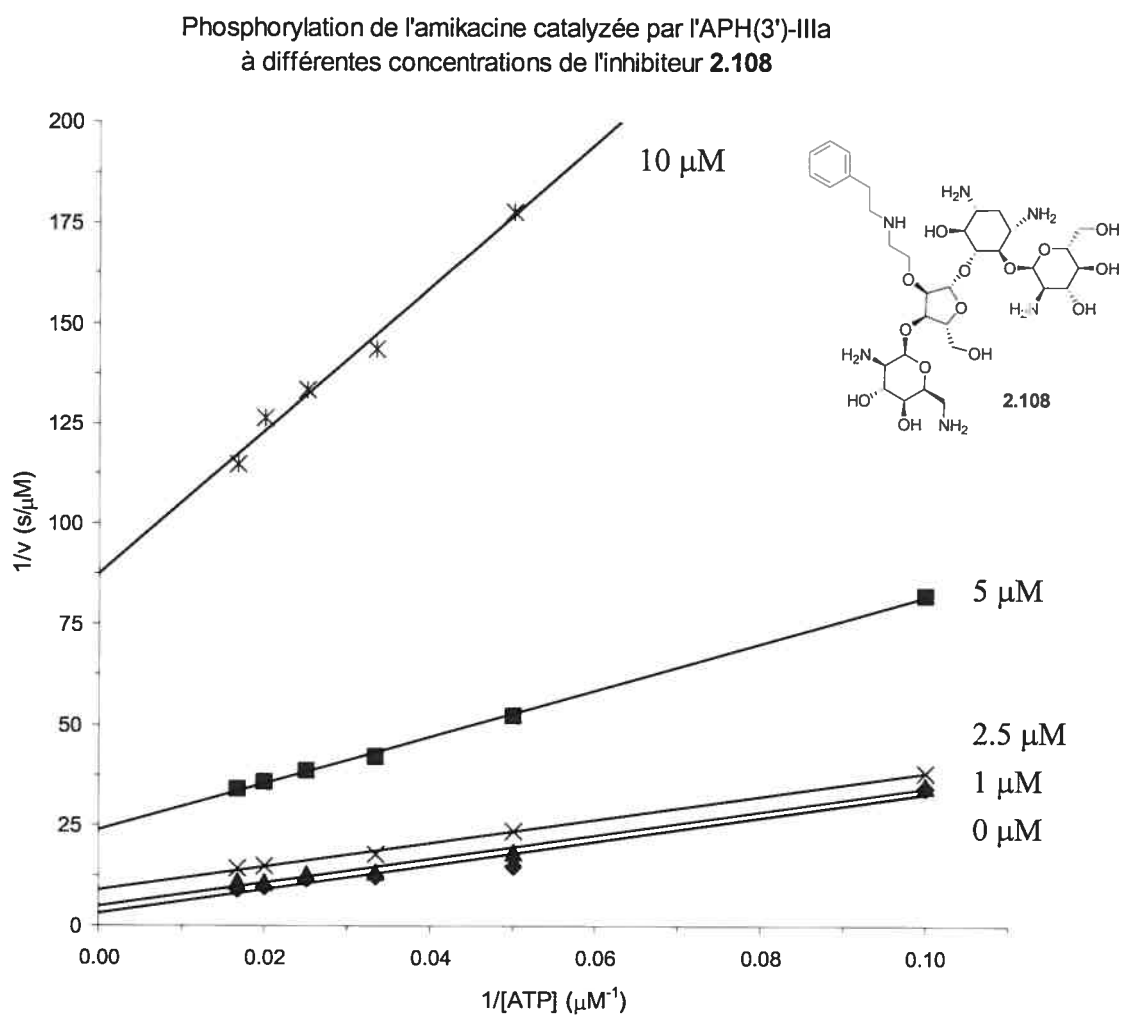


Figure 4.14. Impact de l'analogue **2.108** sur la vitesse de la phosphorylation de l'amikacine catalysée par l'APH(3')-IIIa à différentes concentrations d'ATP.

Les régressions non linéaires des vitesses de phosphorylations de l'amikacine en fonction de la concentration de l'ATP à différentes concentrations d'inhibiteur nous a également permis de déterminer que l'inhibition est incompétitive aux concentrations en inhibiteur inférieures à 5 μM (Figure 4.15) et non-compétitive mixte aux plus hautes concentration en inhibiteurs, comme prévue par le modèle de l'inhibition que nous proposons (Figure 4.12).

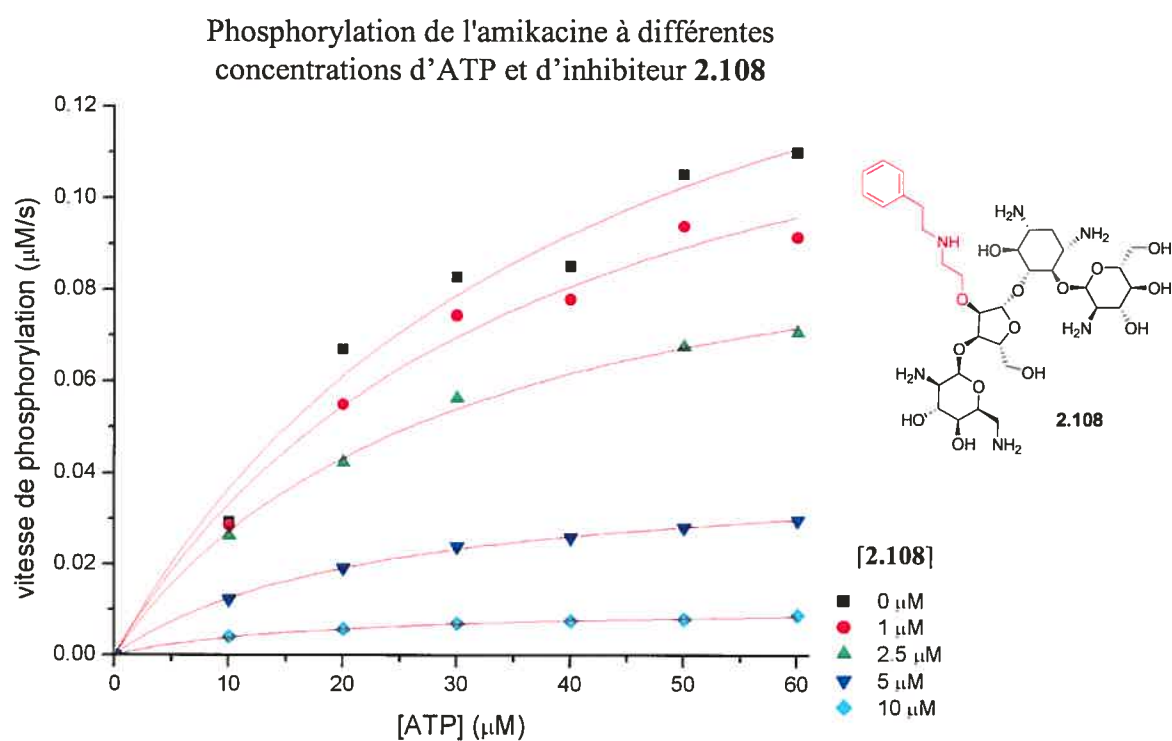


Figure 4.15. Régressions non linéaires pour la détermination des $K_m(\text{app})$ et $V_{\text{max}}(\text{app})$ de l'ATP en présence de l'inhibiteur **2.108**.

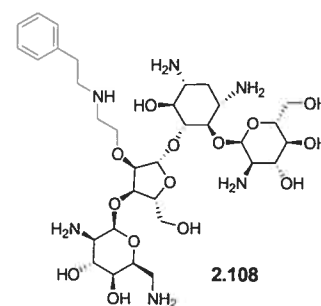
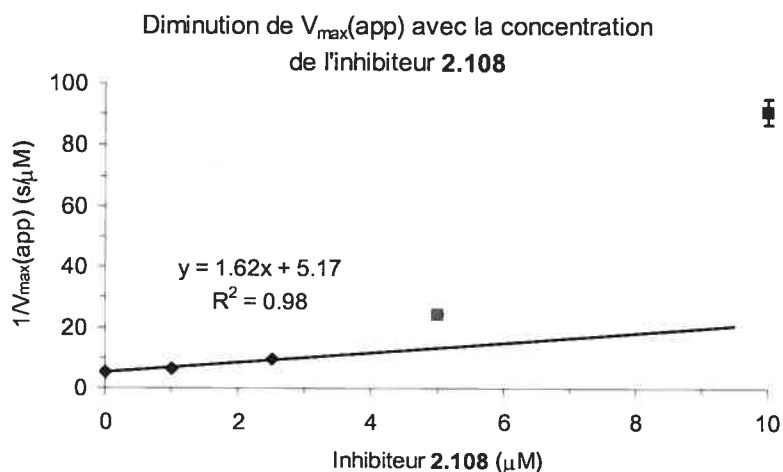
La présence de l'inhibiteur **2.108** à différentes concentrations montre que le $V_{\max(\text{app})}$ et le $K_m(\text{app})$ diminuent linéairement avec l'augmentation de la concentration de l'inhibiteur lorsqu'elle est inférieure à $5 \mu\text{M}$, ce qui est typique du mode d'inhibition incompétitif (Figure 4.16). Par contre, aux concentrations plus élevées de l'inhibiteur, nous avons remarqué que l'inhibition n'est plus qu'incompétitive. Cette observation peut s'expliquer par le fait qu'à concentration plus élevée, il est possible pour l'inhibiteur de lier à l'enzyme avant l'ATP, ou plus probablement au complexe E·ADP comme le font les substrats de cette enzyme.²¹ Nous avons déterminé un K_i de $3.2 \mu\text{M}$ à partir de l'équation linéaire du graphique présenté à la Figure 4.16b ($V_{\max(\text{app})}$) et un K_i de $8.2 \mu\text{M}$ à partir de l'équation linéaire du graphique présenté à la Figure 4.16c ($K_m(\text{app})$) pour l'inhibiteur **2.108**.

a)

Concentration de l'inhibiteur 2.108 (μM)	$V_{\text{max}}(\text{app})^{\text{a}}$ ($\mu\text{M/s}$)	$K_{\text{m}}(\text{app})^{\text{a}}$ (μM)
0	0.187 ± 0.026	41.3 ± 12
1	0.154 ± 0.018	36.4 ± 9
2.5	0.107 ± 0.005	29.2 ± 3
5	0.041 ± 0.001	22.4 ± 1
10	0.011 ± 0.001	18.2 ± 2

^a Déterminé à partir des régressions non-linéaires (Figure 4.15)

b)



c)

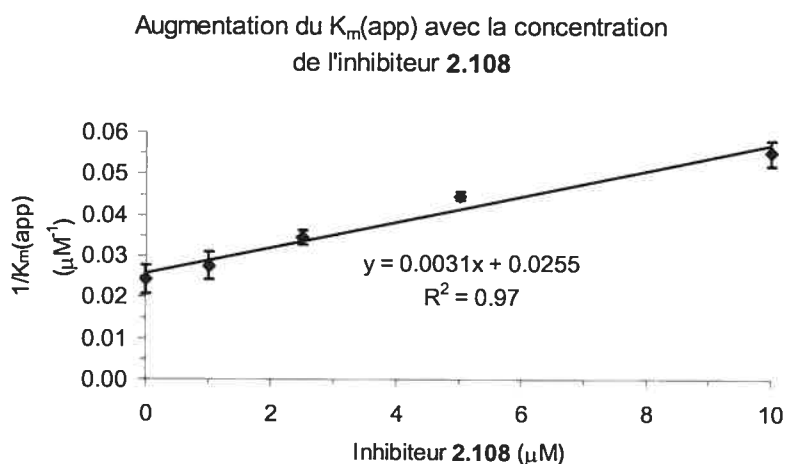
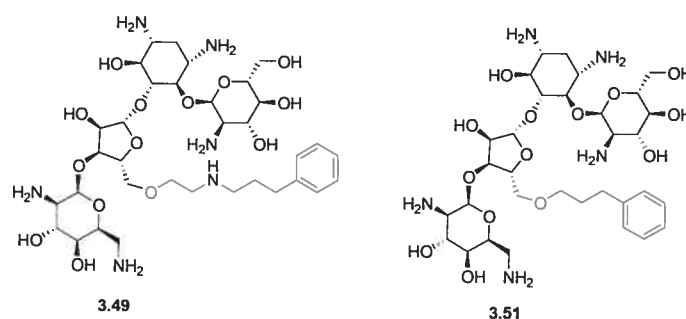


Figure 4.16. Variation du $V_{\text{max}}(\text{app})$ et du $K_{\text{m}}(\text{app})$ à différentes concentrations d'ATP lors de la phosphorylation de l'amikacine catalysée par l'APH(3')-IIIa en fonction de la concentration de l'inhibiteur **2.108**.

4.3. Inhibitions de l'APH(3')-IIIa par des analogues de la paromomycine fonctionnalisés à la position O5''.

Comme pour les analogues de la paromomycine fonctionnalisés à la position O2'', nous avons observé que deux des analogues de la paromomycine fonctionnalisés à la position O5'' (3.49 et 3.51) ont été phosphorylés plus lentement que la paromomycine en présence de l'APH(3')-IIIa (Figure 4.17). En réalité, nous avons remarqué que les composés 3.49 et 3.51 sont des inhibiteurs de l'APH(3')-IIIa. Nous avons donc déterminé les vitesses de phosphorylation initiales (V_0), les vitesses de phosphorylation relatives (V_{rel}) et les IC_{50} pour ces composés afin de déterminer s'ils sont de bons inhibiteurs (Figure 4.17).



Composé	V_0^a $\mu\text{M/s} \times 10^{-3}$	V_{rel}	IC_{50} μM
paromomycine (1.3)	54.9	1	-
3.49	5.1	0.09	2.3
3.51	9.0	0.16	14.8

^a les conditions utilisées pour déterminer V_0 sont détaillées dans la partie expérimentale.

Figure 4.17. Vitesses relatives de phosphorylation et IC_{50} des composés 3.49 et 3.51.

Le composé 3.49 fait donc partie des meilleurs inhibiteurs de l'APH(3')-IIIa que nous avons identifiés, c'est-à-dire ceux qui ont un V_{rel} inférieure ou égale à 0.09 et qui ont un IC_{50} inférieur à 15 μM (voir Figure 4.13). Nous avons donc constaté que la modification du cycle III de la paromomycine à la position O2'' ou O5'' est une bonne option pour préparer des composés qui sont capables d'inhiber l'APH(3')-IIIa.

4.4. Conclusion pour le Chapitre 4.

Le composé **2.108**, dont nous n'avons pas détecté la phosphorylation en présence de l'APH(3')-IIIa, a servi de modèle pour démontrer que les analogues de la paromomycine fonctionnalisés à la position O2'' sont des inhibiteurs de l'enzyme. Pour l'inhibiteur **2.108**, nous avons déterminé une K_i' de 14.2 μM et une K_i de 1.0 μM . L'inhibition observée est de type non-compétitive mixte par rapport à l'amikacine. Une inhibition incompétitive par rapport à l'ATP aux concentrations inférieures à 5 μM en inhibiteur a été observée. Les IC_{50} de plusieurs analogues de la paromomycine fonctionnalisés à la position O2'' ou O5'' ont été déterminés. La relation entre la vitesse relative de la phosphorylation et le IC_{50} pour ces composés nous a permis d'identifier que les meilleurs inhibiteurs que nous avons sont **2.106**, **2.108**, **2.124**, **2.128**, **2.141** et **3.41**. La compréhension des pré-requis structuraux de composés qui seraient phosphorylés lentement, ou pas phosphorylés, tout en ayant une bonne affinité pour l'APH(3')-IIIa, pourrait mener à la découverte d'inhibiteurs plus puissants.

Il a été démontré que le cycle III de la paromomycine est un site de prédilection pour fonctionnaliser cette molécule afin d'obtenir des inhibiteurs de l'APH(3')-IIIa. Le composé **2.108** est le premier exemple d'un aminoglycoside semi-synthétique doté d'une bonne activité antibactérienne capable d'inhiber une enzyme (l'APH(3')-IIIa) qui désactive des antibiotiques aminoglycosidiques d'une manière non irréversible. Bref, nous avons démontré qu'il est possible de préparer des aminoglycosides semi-synthétiques dotés d'une bonne activité antibactérienne, qui sont de mauvais substrats pour une enzyme désactivante d'aminoglycosides et qui peuvent même l'inhiber.

Selon une stratégie similaire à celle utilisée pour des antibiotiques de type β -lactame,²² nos découvertes pourraient donner une seconde vie à certains aminoglycosides qui ont été mis de côté à cause de leur susceptibilité à l'APH(3')-IIIa. L'utilisation de ces aminoglycosides obsolètes en combinaison avec le composé **2.108** pourrait restaurer leurs activités antibiotiques contre des souches qui expriment l'APH(3')-IIIa (Figure 4.18).

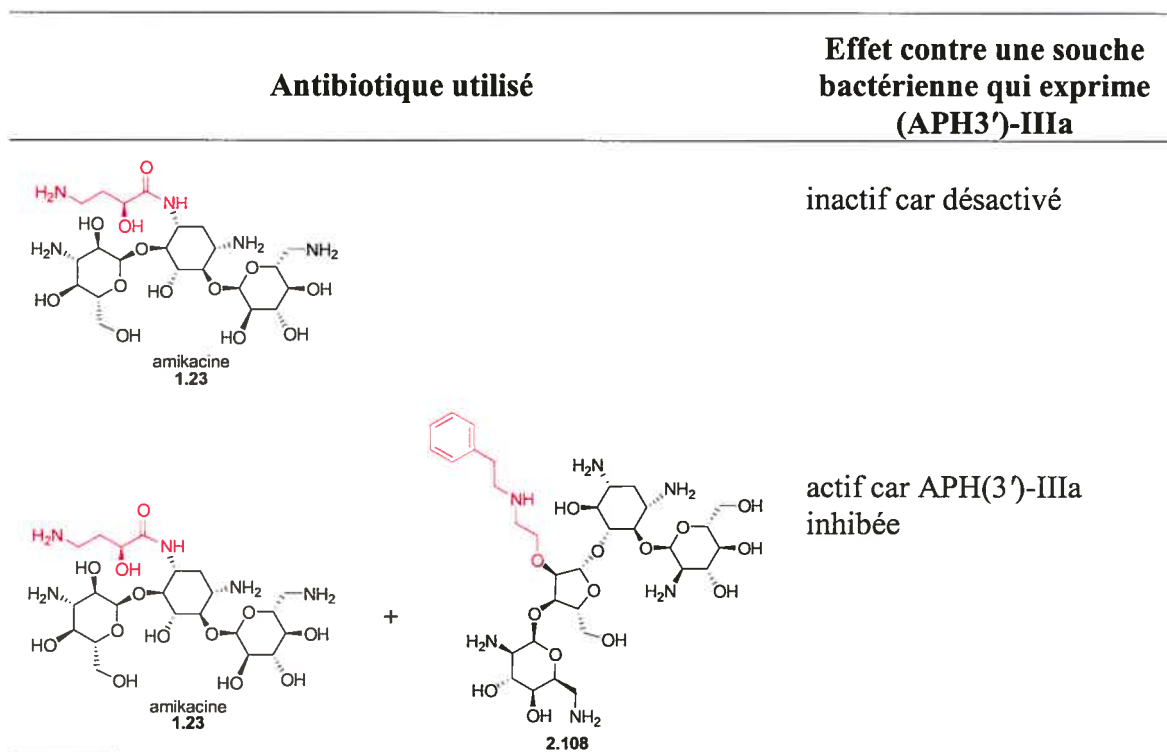


Figure 4.18. Application potentielle de l'inhibiteur **2.108** pour restaurer l'activité antibactérienne de l'amikacine contre les souches de bactéries qui expriment l'APH(3')-IIIa.

4.5. Références pour le Chapitre 4.

- 1) (a) Magnet, S.; Blanchard, J. S. Molecular Insights into Aminoglycoside Action and Resistance. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 477-497; (b) Stuart, B. L. *The Antibiotic Paradox: How the Misuse of Antibiotics Destroys Their Curative Powers*. HarperCollins Publishers **2002**, ISBN-10: 0738204404; (c) Rosen, B. P.; Mobashery, S. *Resolving the Antibiotic Paradox: Progress in Understanding Drug Resistance and Development of New Antibiotics*. Kluwer Academic / Plenum Publisher, New York, **1998**.
- 2) McKay, G. A.; Thompson, P. R.; Wright, G. D. Broad Spectrum Aminoglycoside Phosphotransferase Type III from Enterococcus: Overexpression, Purification, and Substrate Specificity. *Biochemistry* **1994**, *33*, 6936-6944.
- 3) Wright, G. D.; Ladak, P. Overexpression and Characterization of the Chromosomal Aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase from Enterococcus faecium. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 956-960.
- 4) Williams, J. W.; Northrop, D. B. Synthesis of a Tight-binding, Multisubstrate Analog Inhibitor of Gentamicin Acetyltransferase I. *J. Antibiot.* **1979**, *32*, 1147-1154.
- 5) Liu, M.; Haddad, J.; Azucena, E.; Kotra, L. P.; Kirzhner, M.; Mobashery, S. Tethered Bisubstrate Derivatives as Probes for Mechanism and as Inhibitors of Aminoglycoside 3'-Phosphotransferases. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 7422-7431.
- 6) Dutcher, J. D.; Donin, M. N. The Identity of Neomycin A, Neamine, and the Methanolysis Product of Neomycin B and C. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 3420-3422.
- 7) Gao, F.; Yan, X.; Baettig, O. M.; Berghuis, A. M.; Auclair, K. Regio- and Chemoselective 6'-N-derivatization of Aminoglycosides: Bi-Substrate Inhibitors as

- Probes to Study Amino-glycoside 6'-N-acetyltransferase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6859-6862.
- 8) Gao, F.; Yan, X.; Shakya, T.; Baettig, O. M.; Ait-Mohand-Brunet, S.; Berghuis, A. M.; Wright, G. D.; Auclair, K. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Truncated Bisubstrate Inhibitors of Aminoglycoside 6'-N-Acetyltransferases. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5273-5281.
- 9) Roestamadji, J.; Grapsas, I.; Mobashery, S. Mechanism-Based Inactivation of Bacterial Aminoglycoside 3'-Phosphotransferases. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 80-84.
- 10) Grapsas, I.; Cho, Y. J.; Mobashery, S. N-(tert-Butoxycarbonyloxy)-5-norbornene-endo-2,3-dicarboximide, a Reagent for the Regioselective Introduction of the tert-Butoxycarbonyl (BOC) Protective Group at Unhindered Amines: Application to Aminoglycoside Chemistry. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 1918-1922.
- 11) Roestamadji, J.; Mobashery, S. The Use of Neamine as a Molecular Template: Inactivation of Bacterial Antibiotic Resistance Enzyme Aminoglycoside 3'-phosphotransferase Type IIa. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3483-3488.
- 12) Yang, Y.; Roestamadji, J.; Mobashery, S.; Orlando, R. The Use of Neamine as a Molecular Template: Identification of Active Site Residues in the Bacterial Antibiotic Resistance Enzyme Aminoglycoside 3'-phosphotransferase Type IIa by Mass Spectroscopy. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 3489-3494.
- 13) Haddad, J.; Vakulenko, S.; Mobashery, S. An Antibiotic Cloaked by its Own Resistance Enzyme. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11922-11923.

- 14) Allen, N. E.; Alborn, W. E. Jr.; Hobbs, J. N. Jr.; Kirst, H. A. 7-Hydroxytropolone: an Inhibitor of Aminoglycoside-2"-O-adenylyltransferase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1982**, *22*, 824-831.
- 15) Hon, W. C.; McKay, G. A.; Thompson, P. R.; Sweet, R. M.; Yang, D. S.; Wright, G. D.; Berghuis, A. M. Structure of an Enzyme Required for Aminoglycoside Antibiotic Resistance Reveals Homology to Eukaryotic Protein Kinases. *Cell* **1997**, *89*, 887-895.
- 16) Daigle, D. M.; McKay, G. A.; Wright, G. D. Inhibition of Aminoglycoside Antibiotic Resistance Enzymes by Protein Kinase Inhibitors. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 24755-24758.
- 17) Boehr, D. D.; Draker, K.; Koteva, K.; Bains, M.; Hancock, R. E.; Wright, G. D. Broad-Spectrum Peptide Inhibitors of Aminoglycoside Antibiotic Resistance Enzymes. *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 189-196.
- 18) Boehr, D. D.; Jenkins, S. I.; Wright, G. D. The Molecular Basis of the Expansive Substrate Specificity of the Antibiotic Resistance Enzyme Aminoglycoside Acetyltransferase-6'-aminoglycoside Phosphotransferase-2". The Role of ASP-99 as an Active Site Base Important for Acetyl Transfer. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 12873-12880.
- 19) Fong, D. H.; Berghuis, A. M. Substrate Promiscuity of an Aminoglycoside Resistance Enzyme via Target Mimicry. *EMBO J.* **2002**, *21*, 2323-2331.
- 20) (a) Thompson, P. R.; Hughes, D. W.; Wright, G. D. Regiospecificity of Aminoglycoside Phosphotransferase from Enterococci and Staphylococci (APH(3')-IIIa). *Biochemistry* **1996**, *35*, 8686-8695; (b) Trieu-Cuot, P.; Courvalin, P. Nucleotide Sequence of the Streptococcus faecalis Plasmid Gene Encoding the 3',5"-Aminoglycoside Phosphotransferase Type III. *Gene* **1983**, *23*, 331-341.

- 21) McKay, G. A.; Wright, G. D. Catalytic Mechanism of Enterococcal Kanamycin Kinase (APH(3')-IIIa): Viscosity, Thio, and Solvent Isotope Effects Support a Theorell-Chance Mechanism. *Biochemistry* **1996**, *35*, 8680-8685.
- 22) Lee, N.; Yuen, K-Y.; Kumana, C. R. Clinical Role of β -lactam/ β -lactamase Inhibitor Combinations. *Drugs* **2003**, *63*, 1511-1524.

Chapitre 5

Fonctionnalisation de la position N6' ou C6' de la sisomicine

5.1. Exemples choisis dans la littérature décrivant des modifications de la sisomicine.

5.1.1. Fonctionnalisation de la position N1 de la sisomicine.

Comme il a été mentionné au Chapitre 1, la recherche d'antibiotiques aminoglycosidiques semi-synthétiques au cours de la décennie 1970-1980 avait pour objectif principal d'élargir le spectre d'action de ces antibiotiques, car leur utilisation fréquente a mené à l'apparition de bactéries résistantes aux aminoglycosides. On avait remarqué que les propriétés antibactériennes de la butirosine (1.2) étaient plus intéressantes que celles de la ribostamycine (1.1), alors qu'ils diffèrent seulement par la présence de la chaîne acide (2*S*)-4-amino-2-hydroxybutanoïque à la position N1 chez la butirosine. On a donc introduit la chaîne acide (2*S*)-4-amino-2-hydroxybutanoïque à la position N1 de la kanamycine A (1.7) et de la dibekacine (1.22) pour obtenir l'amikacine (1.23)¹ et l'arbekacine (1.24)² respectivement (Figure 5.1). Constatant l'effet bénéfique de la fonctionnalisation de la position N1 des aminoglycosides de la classe B, l'introduction d'un groupement éthyle sur la position N1 de la sisomicine (1.16) a été réalisé pour fournir la nétilmicine (1.25)³ alors que l'isepamicine (1.26)⁴ a été obtenue par l'introduction de la chaîne acide (2*S*)-3-amino-2-hydroxypropanoïque à la position N1 de la gentamicine B (1.14). Trente ans après leur préparation, ces quatre antibiotiques aminoglycosidiques semi-synthétiques (1.23-1.26) sont toujours utilisés en milieu clinique.⁵

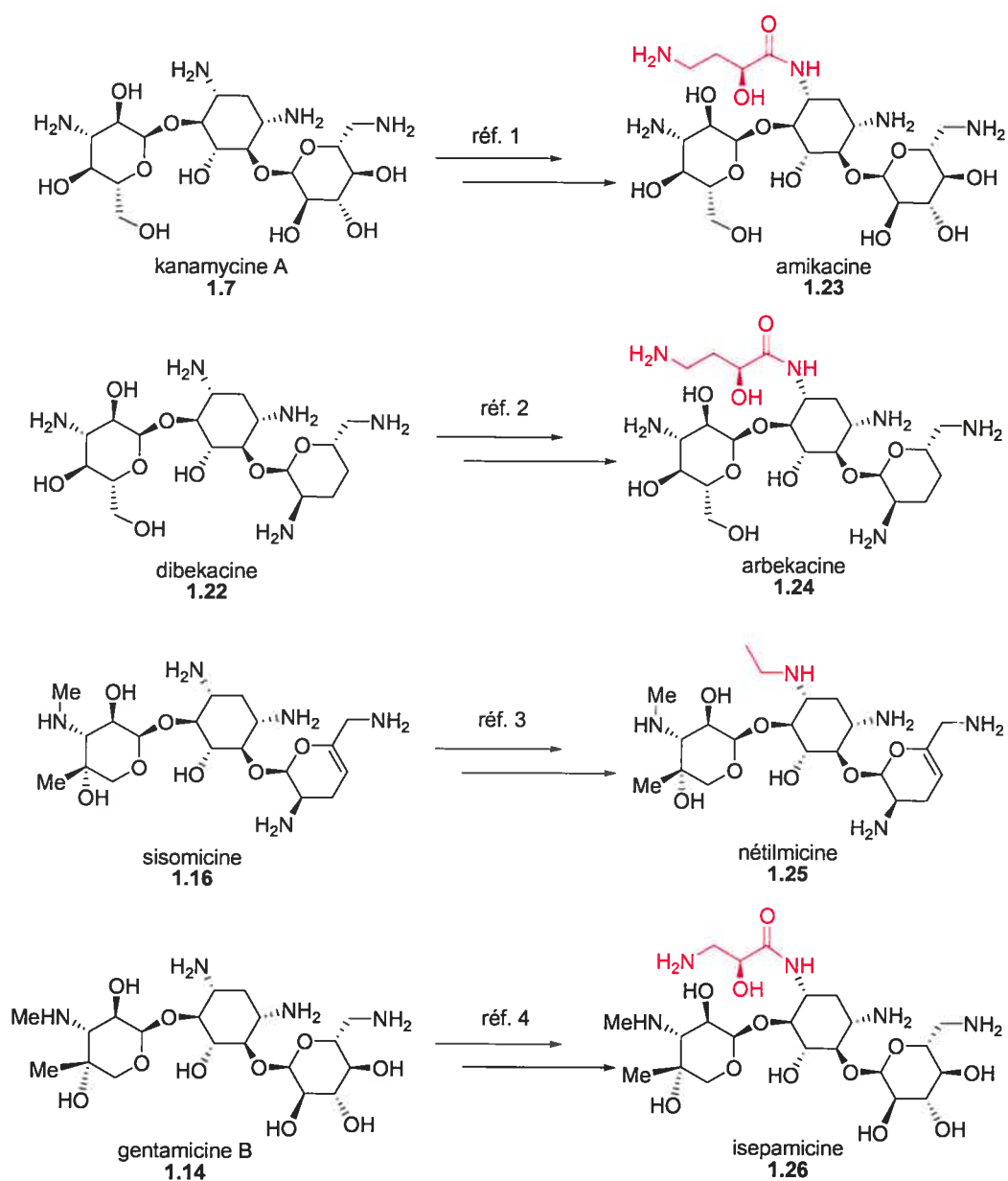


Figure 5.1. Aminoglycosides semi-synthétiques fonctionnalisés à la position N1 préparés entre 1972 et 1975.

Puisque la fonctionnalisation de la position N1 des aminoglycosides de la classe B a donné de nouveaux antibiotiques possédant des propriétés désirables, la recherche d'analogues de la sisomicine fonctionnalisée à cette position a été entreprise par Boxler *et al.*⁶ La préparation de la sisomicine partiellement N-acétylée **5.1** a été réalisée par l'acétylation des amines 6'-NH₂, 2'-NH₂ et 3-NH₂ alors que les amines 1-NH₂ et 3''-NHMe étaient temporairement protégées sous forme de chélates métalliques (voir structure **5.2**) (Schéma 5.1). La chélation des métaux par des groupements amino-alcool d'aminoglycosides⁷ a été indépendamment étudiée en 1978 par Nagabhushan⁸ et Hanessian⁹ avec leurs collaborateurs respectifs. Boxler *et al.*⁶ ont ensuite transformé le seul groupement amine primaire du composé **5.1** en cétone à l'aide du réactif **5.3**, développé par Corey *et al.*¹⁰ La cétone obtenue (**5.4**) a permis la fonctionnalisation de la position N1 de la sisomicine par des aminations réductrices pour fournir les paires de diastéréoisomères **5.5-5.6**, **5.7-5.8** et **5.9-5.10**, qui ont été séparées par chromatographie. Ces analogues de la sisomicine sont tous dotés d'une bonne activité antibactérienne.

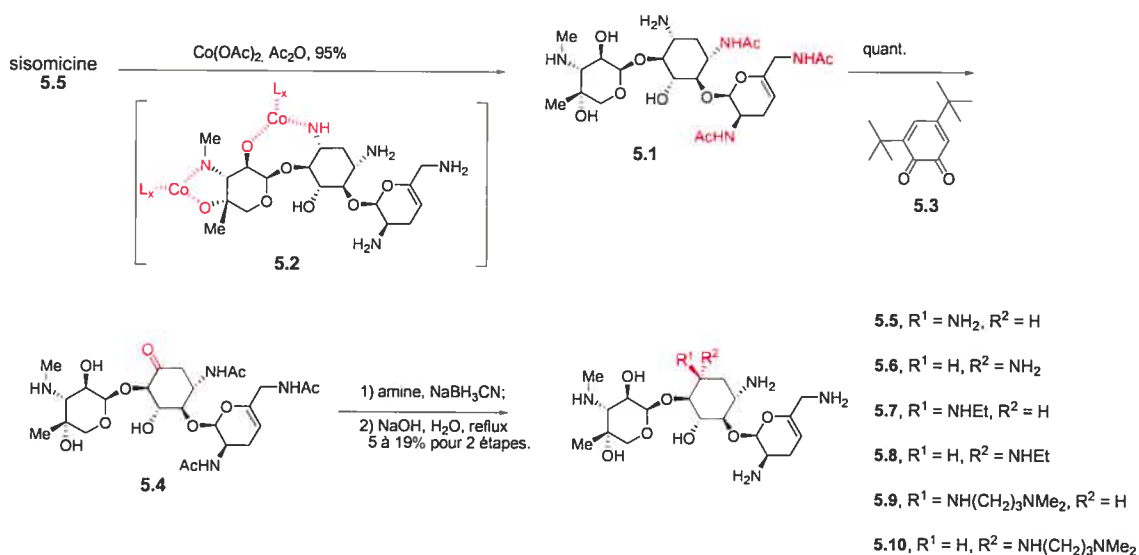


Schéma 5.1. Fonctionnalisation de la position N1 de la sisomicine par Boxler *et al.*⁶

L'utilisation du zinc pour former des chélates métalliques avec les aminoglycosides, développée par Kirst^{11a} et Umezawa,^{11b} a récemment permis la préparation de l'isepamicine (**1.26**) à partir de la sisomicine (**1.16**). Moon *et al.*¹² ont traité la sisomicine avec le réactif **5.11** en présence d'acétate de zinc pour obtenir le composé **5.12**. Puis, un couplage peptidique avec l'acide **5.13** a permis d'obtenir le composé **5.14** (Schéma 5.2). La protection de l'amine secondaire avec un groupement benzyloxycarbonyle, puis la méthanolyse du cycle I a permis l'isolation du composé **5.15**. l'isepamicine (**1.26**) a été obtenue par une glycosylation avec le dérivé **5.16** en présence de triflate d'argent suivie d'un traitement avec de l'hydrogène en présence de palladium.

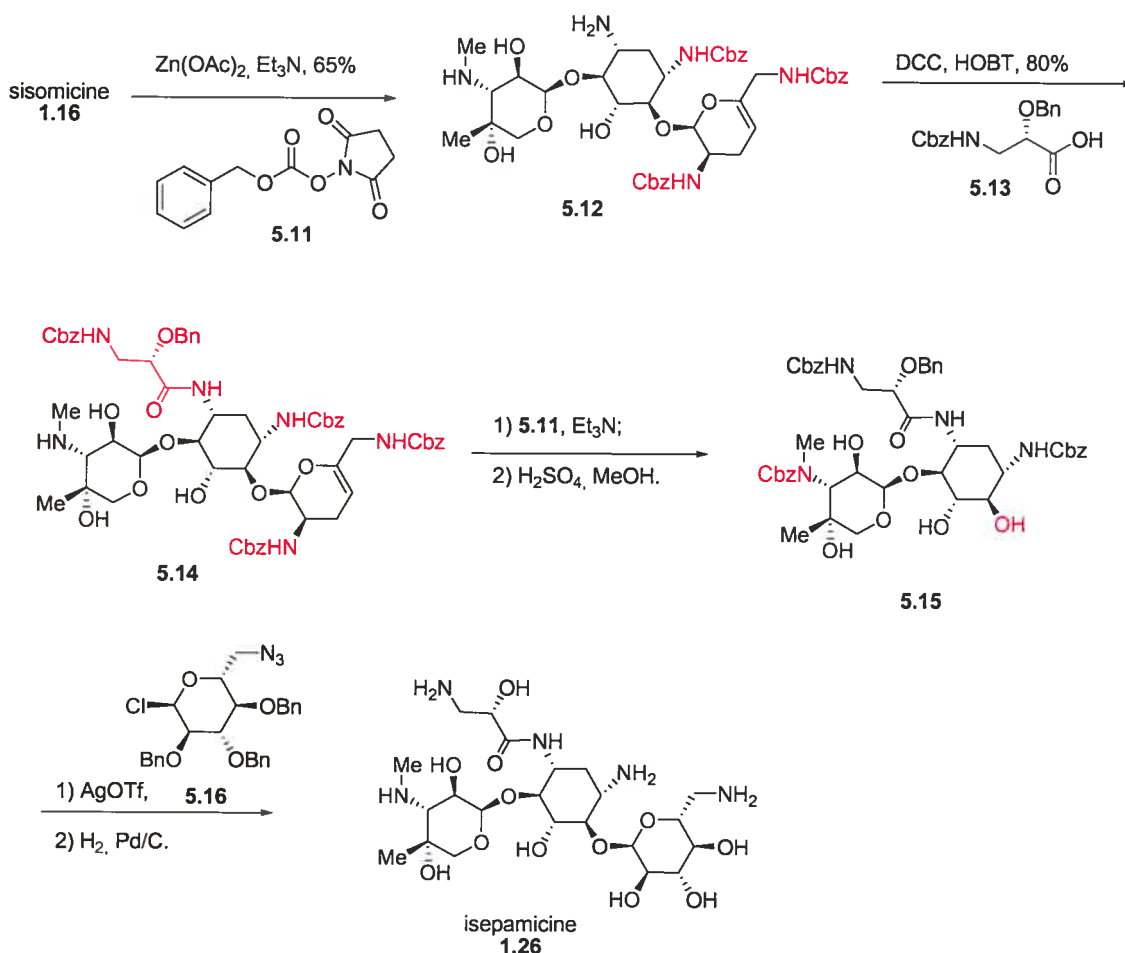


Schéma 5.2. Préparation récente de l'isepamicine par Moon *et al.*¹²

Une utilisation récente des chélates métalliques a permis la préparation de la nétilmicine (**1.25**) avec un rendement supérieur à celui obtenu par la voie synthétique originale³ qui consiste au traitement de la sisomicine avec l'acétaldéhyde en présence d'un agent réducteur pour obtenir la nétilmicine selon un rendement de 25% après la séparation des régioisomères *N*-éthylés. Ainsi, Nam *et al.*¹³ ont traité le dérivé de la sisomicine **5.1** avec le borohydrure de sodium et l'acide acétique dans le chloroforme pour mono-alkyler l'amine 1-NH₂ sélectivement (Schéma 5.3). Un traitement avec l'hydroxyde de sodium en milieu aqueux à reflux a mené à l'isolation de la nétilmicine (**1.25**). Par cette approche, la nétilmicine a été produite en trois étapes à partir de la sisomicine et ce avec un rendement global de 82%.

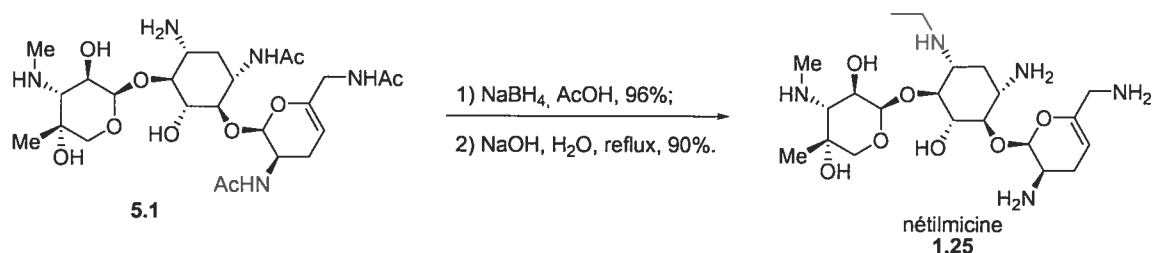


Schéma 5.3. Préparation récente de la nétilmicine par Nam *et al.*¹³

5.1.2. Fonctionnalisation de la position N6' de la sisomicine.

Même si la fonctionnalisation de la position N1 de la sisomicine (1.16) demeure la plus documentée, l'effet de la fonctionnalisation de la position N6' sur les propriétés antibiotiques de la sisomicine a aussi été étudié. Lors de la fermentation du micro-organisme *Micromonospora inyoensis* dans le but de produire la sisomicine, Davies *et al.*¹⁴ ont observé la formation, en faible quantité, du composé 5.17 qui n'est pas doté d'activité antibactérienne (Schéma 5.4). La transamination de cette sisomicine dimérique (5.17) avec différentes amines, suivie d'un traitement avec le borohydrure de sodium, a produit les analogues de la sisomicine fonctionnalisés à la position N6' 5.18-5.21 qui seraient tous dotés d'une certaine activité antibactérienne. L'antibiotique G-52 (5.18) ainsi préparé est un antibiotique aminoglycosidique naturel qui a été isolé d'une culture de *Micromonospora zionensis* par Weinstein *et al.*¹⁵ en 1974.

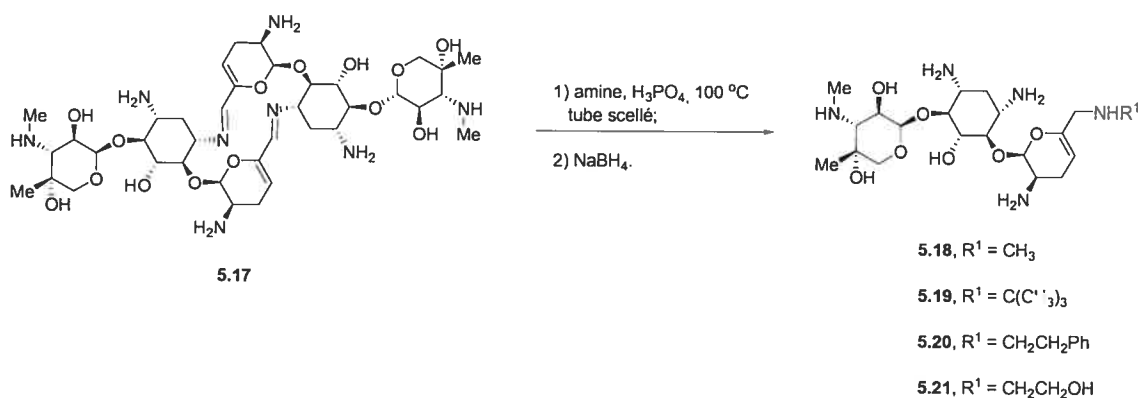


Schéma 5.4. Fonctionnalisation de la position N6' de la sisomicine par Davies *et al.*¹⁴

La fonctionnalisation de la position N6' de la sisomicine (**1.16**) semble diminuer l'affinité de ces analogues pour les nombreuses enzymes de la famille AAC(6') car, selon Davies *et al.*¹⁴, les analogues **5.18** et **5.21** sont plus actifs que la sisomicine envers certaines souches qui expriment ces enzymes désactivantes. Il avait déjà été démontré que la présence d'un groupement méthyle sur la position N6' des aminoglycosides diminue l'affinité pour les enzymes de la famille des AAC(6'). Par exemple, la gentamicine C1 (**1.10**) n'est pas un substrat pour la plupart des AAC(6')-I,¹⁶ une des plus importantes familles d'enzymes désactivantes. Aussi, Umezawa *et al.*¹⁷ ont déterminé qu'un analogue de la kanamycine B méthylée à la position N6' est actif contre des souches de bactéries qui désactivent normalement la kanamycine B avec une AAC(6'). Toutefois, l'introduction d'une chaîne trop hydrophobique et/ou volumineuse à la position N6' de la sisomicine semble à éviter car il a été démontré que les analogues **5.19** et **5.20** ont une moins bonne activité antibactérienne que les analogues **5.18** et **5.21**, qui sont aussi actifs que la sisomicine. Il est surprenant que Davies *et al.*¹⁴ se soient limité à étudier des analogues de la sisomicine mono-fonctionnalisée à la position N6', laissant di-fonctionnalisation de cette position non explorée. Nous nous sommes donc intéressés à mettre au point une voie synthétique qui permettrait à nos collaborateurs industriels de préparer des analogues de la sisomicine de type 6'-NR¹R² à partir de la sisomicine, qui est un substrat de départ plus disponible que le composé **5.17**.

5.1.3. La verdamicine, un analogue de la sisomicine méthylée à la position C6'.

La verdamicine, que nous nommerons verdamicine C2a (5.23) dans ce texte, est un analogue méthylé de la sisomicine à la position C6' (Figure 5.2). Cet antibiotique a été isolé comme produit secondaire d'une culture du microorganisme *Micromonospora grisea* par Weinstein *et al.* en 1973 (Figure 5.2).¹⁸ L'activité antibiotique de la verdamicine C2a a été évaluée comme étant deux à trois fois meilleure que celle de la tobramycine et de la gentamicine.¹⁹ Cette gentamicine commercialement disponible est en réalité un mélange de quatre congénères majoritaires, les gentamicines C1, C1a, C2 et C2a (Figure 5.2). Les excellentes activités antibactériennes de la verdamicine naturelle démontrent que la présence d'un méthyle à la position C6' de la sisomicine est bénéfique. Cependant, ce méthyle ne semble pas avoir un impact pour l'affinité des enzymes désactivantes de la famille des AAC(6') car la verdamicine possède le même spectre d'action que la sisomicine.²⁰ Aucune étude n'a été entreprise pour établir l'effet de l'introduction de groupements autres qu'un méthyle à la position C6' de la sisomicine sur les activités antibactériennes ainsi que sur l'affinité des enzymes désactivantes de la famille des AAC(6').

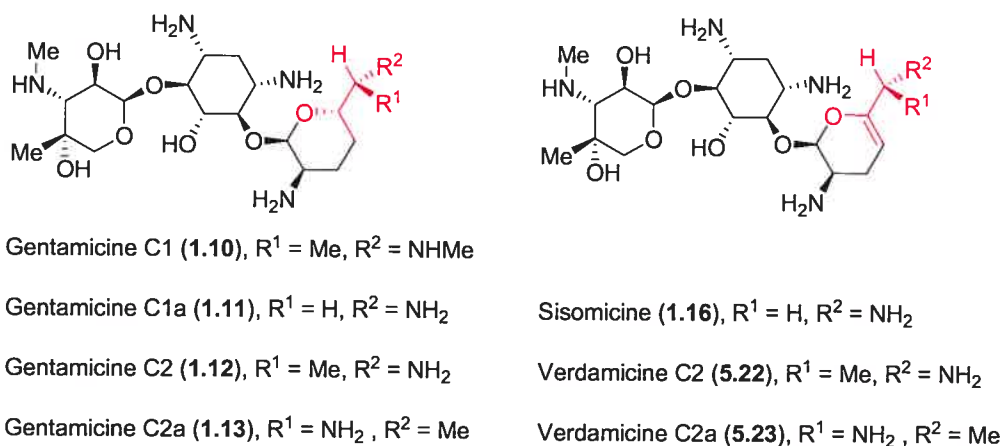


Figure 5.2. Structures des gentamicines et des verdamicines.

La configuration absolue du carbone C6' de la verdamicine naturelle est restée longtemps imprécisée. L'opinion initiale, publiée en 1975 par Weinstein *et al.*, supposait que la configuration absolue du carbone C6' était la même que celle de la gentamicine C2, soit 6'-(*R*)-NH₂.¹⁹ Suite à l'isolation du congénère C2a de la gentamicine par Daniels *et al.*²¹, Weinstein *et al.* ont, sans expliquer leur motif, rectifié la configuration absolue du carbone C6' de la verdamicine naturelle afin qu'elle concorde avec celle de la gentamicine C2a, soit 6'-(*S*)-NH₂.²² C'est cette configuration dite 'C2a' qui a été retenue par la suite. En 1982, la biotransformation de la verdamicine naturelle en gentamicine C2a par le mutant KY11525 de *M. sagamiensis* a confirmé que la verdamicine existe sous la forme de l'épimère C2a (**5.23**).²³

Nous nous sommes intéressés à préparer les deux épimères en C6' de la verdamicine afin de déterminer si la stéréochimie du carbone C6' a un impact sur les activités antibiotiques ainsi que sur l'acétylation des ces antibiotiques en présence d'une AAC(6'). Aussi, il nous a semblé important d'évaluer l'impact de l'introduction de groupements plus volumineux qu'un méthyle à la position C6' de la sisomicine.

5.1.4. Effet de la présence d'un méthyle à la position C6' sur la néphrotoxicité des gentamicines.

La possibilité de réduire la néphrotoxicité associée à l'utilisation de la sisomicine constitue une raison supplémentaire nous ayant encouragés à développer une voie synthétique permettant de fonctionnaliser la position C6' en intégrant les connaissances acquise avec les gentamicines C1, C1a, C2 et C2a (Figure 5.2). La récente séparation des congénères de la gentamicine par chromatographie a permis de déterminer qu'ils possèdent tous une activité antibactérienne comparable.²⁴ Toutefois, seul celui possédant le motif 6'-(*R*)-NH₂, soit la gentamicine C2 (**1.12**), s'avère être non néphrotoxique.²⁵ Cette absence de néphrotoxicité nous a induit à comparer la néphrotoxicité des deux épimères en C6' de la verdamicine (**5.22-5.23**) afin d'évaluer si celui possédant le motif 6'-(*R*)-NH₂ (**5.22**) s'avère moins néphrotoxique.

5.2. Fonctionnalisation de la position C6' ou N6' de la sisomicine.

5.2.1. Fonctionnalisation de la position C6' de la sisomicine.

Comme il a été expliqué à la section précédente, les deux objectifs de ce projet étaient de développer une voie synthétique qui permettrait de fonctionnaliser la position N6' et/ou C6' de la sisomicine (1.16). Le premier défi consistait donc à fonctionnaliser la position C6' de la sisomicine par la formation d'un lien carbone-carbone pour obtenir les verdamicines C2 (5.22) et C2a (5.23). Nous avons envisagé qu'une fonction aldéhyde en C6' de la sisomicine serait idéale pour nous permettre d'atteindre nos deux objectifs.

La sisomicine (1.16) est un antibiotique aminoglycosidique dont la particularité est la présence d'une insaturation dans le cycle I. Cette insaturation fait en sorte que la position C6' est allylique, lui conférant son statut unique que nous avons voulu exploiter. L'azoturation des amines primaires²⁵ de la sisomicine puis un traitement avec l'anhydride acétique nous a permis d'obtenir le composé 5.24 (Schéma 5.5). L'oxydation allylique de cet azoture, par un traitement avec le dioxyde de sélénium,²⁶ a permis d'obtenir l'aldéhyde α,β -insaturé 5.26, probablement via l'intermédiaire 5.27. Cette séquence réactionnelle nous a permis de transformer un azoture allylique en aldéhyde α,β -insaturé en une étape et constitue, à notre connaissance, le premier exemple d'une telle transformation. Puisqu'aucun produit oxydé au carbone C3' n'a été observé, des études sont en cours pour déterminer l'origine de cette sélectivité. Cet aldéhyde (5.26) est d'une versatilité qui correspond à nos besoins car il permet de fonctionnaliser la position C6' (au moyen d'une addition de Grignard, par exemple), et qu'il permet également d'accéder à des d'analogues de la sisomicine fonctionnalisée à la position N6' par aminations réductrices.

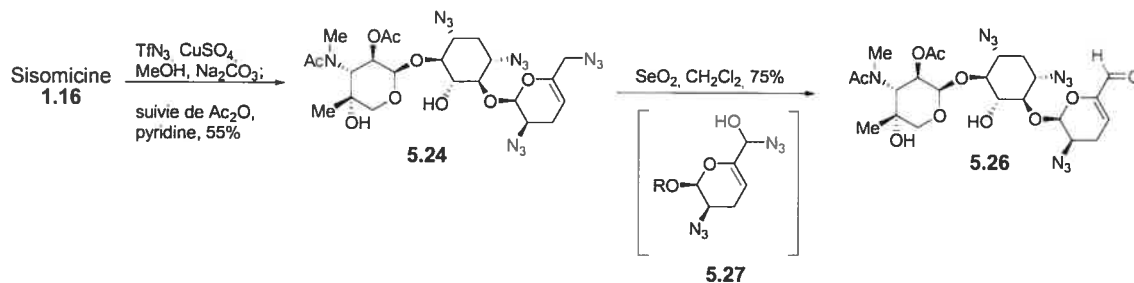


Schéma 5.5. Préparation du composé 5.26.

L'oxydation des positions allyliques par le dioxyde de sélénium est bien documentée.²⁶ Le mécanisme de cette réaction est connu depuis 1972²⁷ et il a été révisité plus récemment.²⁸ La formation d'un acide allylsélénioïque par une réaction de type ène est suivie d'un réarrangement sigmatropique [2,3] pour former un ester de sélénium allylique. L'hydrolyse de cet ester permet d'obtenir l'alcool allylique (Schéma 5.6). Pour les systèmes acycliques, la stéréochimie de la double liaison obtenue est majoritairement E, car le réarrangement sigmatropique [2,3] évolue via un état de transition de type enveloppe (Schéma 5.6).

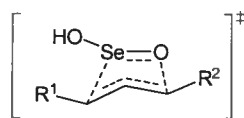
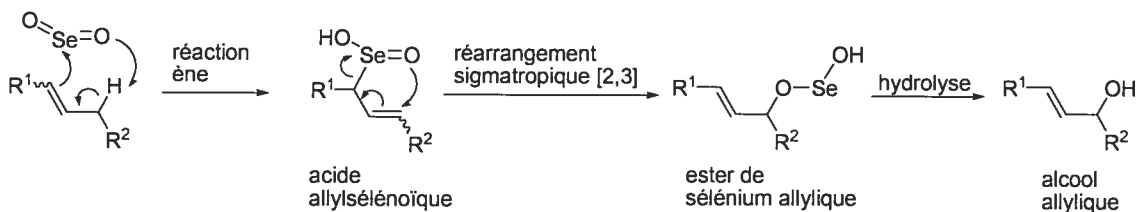


Schéma 5.6. Mécanisme de l'oxydation allylique par le dioxyde de sélénium.

Pour entreprendre la fonctionnalisation de la position C6' de la sisomicine, l'aldéhyde **5.26** a été traité avec le bromure de magnésium de méthyle pour fournir les alcools diastéréomériques **5.28-5.29** inséparables dans un ratio de 1:1 (Schéma 5.7). Une méthylation, puis un traitement avec l'azoture de sodium a produit les diastéréoisomères **5.30-5.31**. Ce mélange a été traité avec le méthanolate de sodium dans le méthanol à reflux, puis la réduction des azotures en amines avec la triméthylphosphine a fourni un mélange 1:1 des deux épimères en C6' de la verdamicine (**5.22-5.23**).

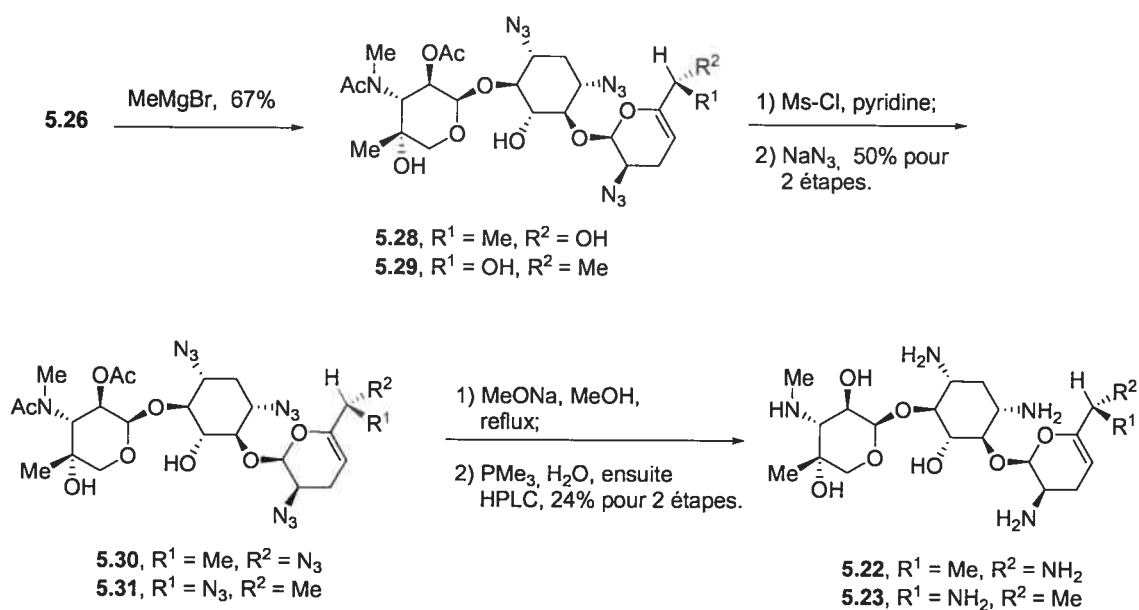


Schéma 5.7. Préparation du mélange 1:1 des deux épimères en C6' de la verdamicine (**5.22-5.23**).

5.2.2. Diastéréosélectivité de la fonctionnalisation de la sisomicine à la position C6'.

Pour des raisons qui ont été expliquées ci-haut, nous désirions obtenir séparément les deux diastéréoisomères de la verdamicine **5.22** et **5.23**. Puisque les alcools diastéromériques **5.28-5.29** se sont avérés inséparables, nous avons d'abord voulu confirmer le ratio du mélange qui était initialement basé sur l'analyse des esters de Mosher correspondantes.²⁹ Le mélange des alcools **5.28-5.29** a été *O*-désacétylé, puis *O*-benzylé pour obtenir **5.32-5.33**, puis traité avec l'ozone pour obtenir les produits dicarbonylés **5.34-5.35**. Une méthanolyse a donné le pseudosisaccharide **5.36** et un mélange 1:1 des lactates **5.37-5.38**. Ce ratio a été déterminé par une analyse en chromatographie gazeuse en utilisant les références énantiopures **5.37** et **5.38**, préparées individuellement.³⁰ L'augmentation des aires sous les pics en dopant les échantillons avec le (*R*)-lactate (**5.37**) ou le (*S*)-lactate (**5.38**) a confirmé les configurations absolues des alcools 6'-(*R*) (**5.28**) et 6'-(*S*) (**5.29**) dans le mélange.

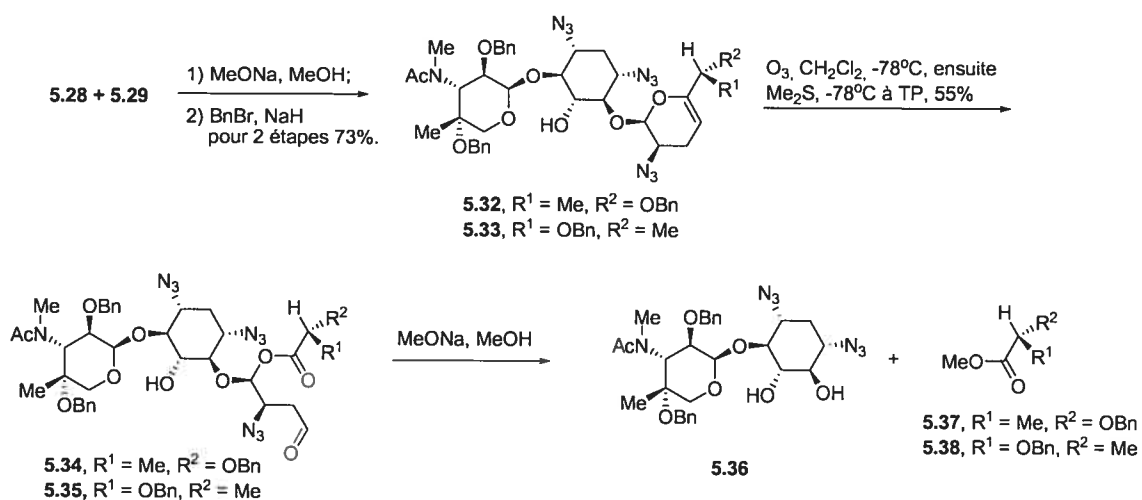
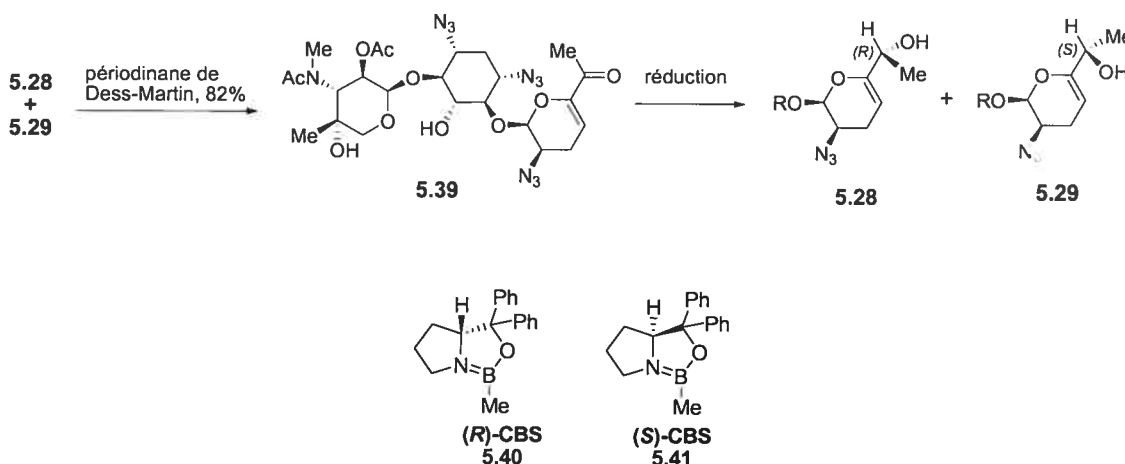


Schéma 5.8. Dégradation chimique pour déterminer le ratio diastéromérique du mélange **5.28-5.29**.

L'oxydation du mélange d'alcools allyliques **5.28-5.29** avec le périodinate de Dess-Martin³¹ a permis d'obtenir le composé **5.39** (Schéma 5.9). Nous avons ensuite évalué les ratios obtenus pour les alcools diastéréomériques **5.28-5.29** lors de la réduction de la cétone α,β -insaturée **5.39** avec différents agents réducteurs. Les meilleurs résultats ont été obtenus par l'utilisation des composés **5.40** ou **5.41** avec le borane comme agent réducteur, selon une méthodologie développée par Corey *et al.*³² Ceci a permis d'obtenir l'alcool désiré **5.28** ou **5.29** avec un excellent ratio diastéréomérique dans les deux cas (Schéma 5.9). Les ratios ont été déterminés en utilisant la dégradation chimique suivie de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse décrites au paragraphe précédent.



Agent réducteurs	Ratio 5.28 : 5.29	Rendement
2 éq. BH ₃ + 2 éq. (<i>R</i>)-CBS (5.40)	<1:15 ^a	73%
2 éq. BH ₃ + 2 éq. (<i>S</i>)-CBS (5.41)	>15:1 ^a	69%

^a Déterminé par GC-FID.

Schéma 5.9. Diastéréosélectivité de la réduction du composé **5.39** avec différents agents réducteurs.

Notre prochain objectif était de préparer les verdamicines C2 (**5.22**) et C2a (**5.23**) individuellement. L'alcool **5.28** a été mésylé, puis un traitement avec l'azoture de sodium a produit le 6'-(*S*)-azoture **5.31** (Schéma 5.10). Un traitement avec le méthanolate de sodium dans le méthanol à reflux, puis la réduction des azotures en amines selon les conditions de Staudinger³³ a fourni la verdamicine C2a (**5.23**) qui possède la configuration 6'-(*S*)-NH₂. La verdamicine C2 (**5.22**), qui possède la configuration 6'-(*R*)-NH₂ a été obtenue par la même approche en commençant avec l'alcool épimérique **5.29** via l'azoture **5.30**.

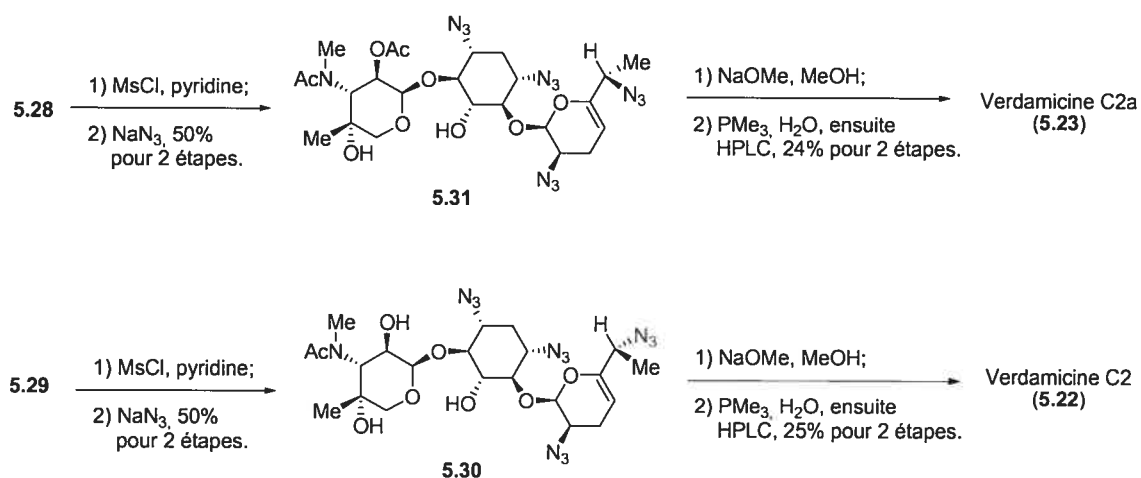


Schéma 5.10. Préparation individuelle des verdamicines C2 (**5.22**) et C2a (**5.23**).

Tel que mentionné ci-haut, nous désirions également préparer des analogues de la sisomicine avec des groupements plus volumineux qu'un méthyle à la position C6'. L'addition du bromure de magnésium d'éthyle ou d'isopropyle sur l'aldéhyde **5.26** a donné un mélange diastéréomérique des alcools **5.42** ou **5.43** (Schéma 5.11). Une méthylation puis un traitement avec l'azoture de sodium a produit les composés **5.44** et **5.45**. Les déprotections usuelles nous ont permis d'obtenir un mélange d'épimères des C6'-éthyle- (**5.46**) et C6'-isopropyle- (**5.47**) sisomicines.

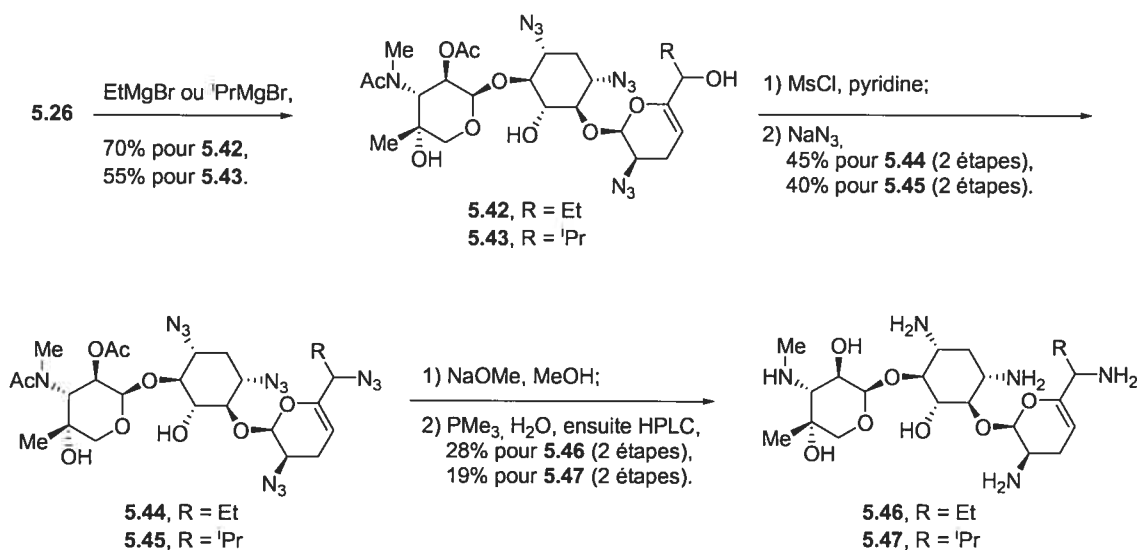


Schéma 5.11. Préparation des C6'-éthyle- (**5.46**) et C6'-isopropyle- (**5.47**) sisomicines.

5.2.3. Fonctionnalisation de la position N6' de la sisomicine.

Des aminations réductrices de l'aldéhyde **5.26** avec la méthylamine et la diméthylamine ont permis d'obtenir les composés **5.48** et **5.49**, qui ont été traités avec le méthoxyde de sodium dans le méthanol à reflux, suivi de la réduction des azotures en amines avec la triméthylphosphine pour fournir l'antibiotique G-52 (**5.18**) et l'analogue de la sisomicine di-fonctionnalisé à la position N6' **5.50** (Schéma 5.12). Nous sommes conscients qu'une protection adéquate des groupements amines de la sisomicine, suivi de la libération de l'amine 6'-NH₂ puis d'aminations réductrices de cette amine avec différents aldéhydes, serait également une voie synthétique envisageable. Cependant, la plus grande disponibilité commerciale des amines versus les aldéhydes avantage notre méthode 'inverse', surtout considérant l'intérêt de nos collaborateurs industriels à produire une grande variété d'analogues de la sisomicine fonctionnalisée à la position N6'.

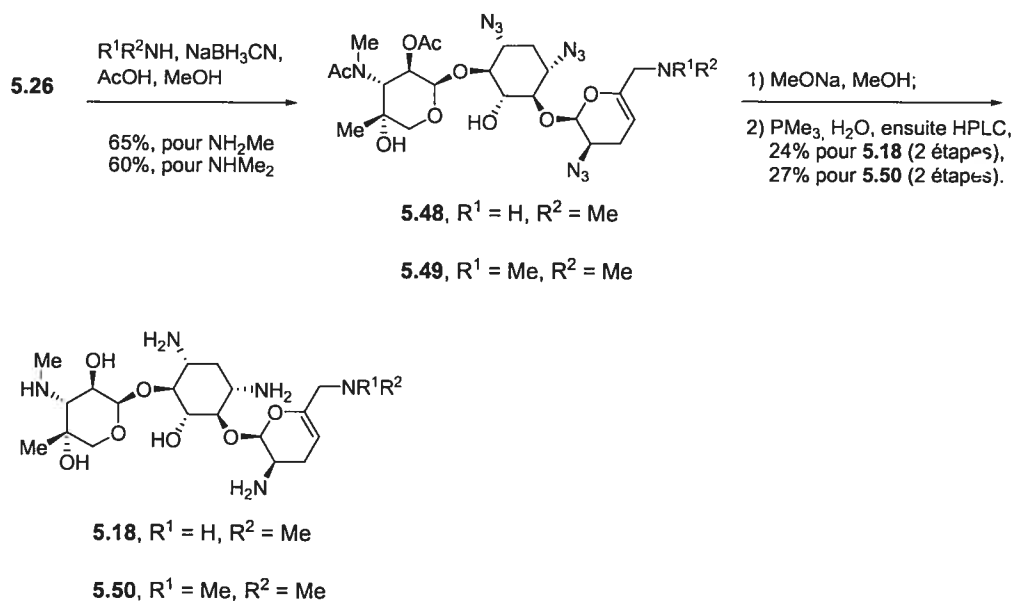
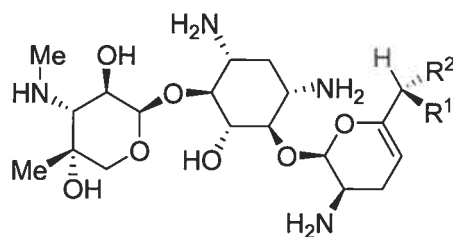


Schéma 5.12. Préparation des composés **5.18** et **5.50**.

5.3. Activités antibactériennes des analogues de la sisomicine fonctionnalisée à la position C6' ou N6'.

Les activités antibactériennes ont été déterminées par la compagnie Achaogen que je remercie. Celles du mélange 1:1 des diastéréoisomères **5.22-5.23**²⁰ soutiennent que l'introduction d'un méthyle à la position C6' de la sisomicine (**5.22-5.23**) est plus bénéfique que la mono- ou di-fonctionnalisation (**5.18** et **5.50** respectivement) de la position N6' (Tableau XVIII). Les activités de l'antibiotique G-52 (**5.18**) étaient déjà connues³⁴ et concordent avec celles que nous avons obtenues pour les souches de bactéries qui n'expriment pas d'AAC. Toutefois, nous n'avons pas observé d'activité antibiotique (MIC > 64) pour l'antibiotique G-52 (**5.18**) contre une souche de *E. coli* possédant un gène codant pour une AAC(6') contrairement à Davies *et al.*¹⁴ et Marquez *et al.*³⁴ On remarque que, pour une souche de *E. coli* possédant un gène codant pour une AAC(6'), la di-fonctionnalisation de la position N6' de la sisomicine (**5.50**) provoque une amélioration de l'activité antibactérienne supérieure à celle provoquée par la mono-fonctionnalisation (**5.18**) Cependant, la di-fonctionnalisation de la position N6' de la sisomicine provoque une baisse d'activité contre les souches bactériennes qui ne possèdent pas le gène codant pour une AAC(6').

La fonctionnalisation de la position C6' de la sisomicine est l'option la plus prometteuse, car le mélange 1:1 des composés **5.22-5.23** est aussi actif que la sisomicine contre les souches non-résistantes, en plus d'être plus actif que la sisomicine contre une souche de *E. coli* possédant un gène codant pour une AAC(6'). Il sera intéressant de pouvoir mesurer l'activité antibactérienne des composés **5.22** et **5.23** séparément afin de déterminer si un des deux est plus actif et/ou moins toxique. Nous attendons avec impatience les résultats de ces tests biologiques qui ont présentement lieu à la compagnie Achaogen ainsi que les activités antibactériennes, aussi en cours chez Achaogen, des composés **5.46** et **5.47**, qui possèdent des groupements plus volumineux qu'un méthyle à position C6'.



Sisomicine (**1.16**), $R^1 = H$, $R^2 = NH_2$

Antibiotique G-52 (**5.18**), $R^1 = H$, $R^2 = NHMe$

Verdamicine C2 (**5.22**), $R^1 = Me$, $R^2 = NH_2$

Verdamicine C2a (**5.23**), $R^1 = NH_2$, $R^2 = Me$

Composé **5.50**, $R^1 = H$, $R^2 = NMe_2$

	CIM ($\mu\text{g/mL}$) <i>E. coli</i> ^a	CIM ($\mu\text{g/mL}$) <i>E. coli</i> (AAC6')-I ^b	CIM ($\mu\text{g/mL}$) <i>S. aureus</i> ^c
1.16	0.5	32	0.5
5.18	1	> 64	0.5
5.22-5.23 (1:1)	0.5	16	0.25
5.50	8	8	16

^aATCC25922, ^bphénotype AAC(6')-I, ^cATCC 29213.

Tableau XVIII. Activités antibactériennes des composés **5.18**, **5.22-5.23** et **5.50**.

5.4. Conclusion pour le Chapitre 5.

Une voie synthétique qui permet la fonctionnalisation de la position C6' et/ou N6' de la sisomicine a été développée au cours de laquelle une nouvelle séquence réactionnelle a permis de transformer un azoture allylique en aldéhyde α,β -insaturé en une étape. Les activités antibactériennes des composés **5.18**, **5.22-5.23** et **5.50** préparés par cette voie synthétique ont souligné que la fonctionnalisation de la position C6' de la sisomicine est plus souhaitable que la fonctionnalisation de la position N6'. L'introduction de groupements plus volumineux qu'un méthyle à la position C6' de la sisomicine en utilisant cette voie synthétique permettra d'explorer l'effet de la fonctionnalisation de cette position sur l'activité antibactérienne, surtout contre des souches bactériennes qui expriment différentes AAC(6'). Les verdamicines C2 et C2a préparées permettront de déterminer leurs néphrotoxicité respectives.

5.5 Références pour le Chapitre 5.

- 1) Kawaguchi, H.; Naito, T.; Nakagawa, S.; Fujisawa, K. BB-K 8, a New Semisynthetic Aminoglycoside Antibiotic. *J. Antibiot.* **1972**, *25*, 695-708.
- 2) Kondo, S.; Iinuma, K.; Yamamoto, H.; Ikeda, Y.; Maeda, K.; Umezawa, H. Syntheses of S-4-Amino-2-hydroxybutyryl Derivatives of 3',4'-Dideoxykanamycin B and their Antibacterial Activities. *J. Antibiot.* **1973**, *26*, 705-707.
- 3) Weinstein, M. J.; Daniels, P. J. L.; Wagman, G. H.; Testa, R.; Mallams, A. K.; Wright, J. J.; Nagabhushan, T. L. Pseudotrisaccharides and Their Use as Bactericides. German Patent DE 2437160, 186 pp. **1975**, CAN 85:33363.
- 4) Wright, J. J.; Daniels, P. J. L. Diaminocyclitol Derivatives. German Patent DE 2502296, 86 pp. **1975**, CAN 84:44610.
- 5) *Antimicrobial Agents: Antibacterials and Antifungals*. Bryskier, A. ASM Press, Washington D. C. **2005**.
- 6) Boxler, D. L.; Brambilla, R.; Davies, D. H.; Mallams, A. K.; McCombie, S. W.; Morton, J. B.; Reichert, P.; Vernay, H. F. Semisynthetic aminoglycoside antibacterials. Part 9. Synthesis of Novel 1- and 3-Substituted and 1- and 3-Epi-Substituted Derivatives of Sisomicin and Gentamicin from the 1- and 3-Oxo Derivatives. *J. Chem. Soc. Perkin Transactions 1* **1981**, *8*, 2168-2185.
- 7) Lee, S. H.; Cheong, C. S. Selective Reactions of Reactive Amino Groups in Polyamino Compounds by Metal-Chelated or -Mediated Methods. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 4801-4815.
- 8) Nagabhushan, T. L.; Cooper, A. B.; Turner, W. N.; Tsai, H.; McCombie, S.; Mallams, A. K.; Rane, D.; Wright, J. J.; Reichert, P. Interaction of Vicinal and

- Nonvicinal Amino-Hydroxy Group Pairs in Aminoglycoside-Aminocyclitol Antibiotics with Transition Metal Cations. Selective N protection. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 5253-5254.
- 9) Hanessian, S.; Patil, G. Aminoglycoside Antibiotics - a Method for Selective N-Acylation Based on the Temporary Protection of Amino Alcohol Functions as Copper Chelates. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *12*, 1035-1038.
- 10) Corey, E. J.; Achiwa, K. Oxidation of Primary Amines to Ketones. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 1429-1432.
- 11) (a) Kirst, H. A.; Truedell, B. A.; Toth, J. E. Control of Site-Specific Substitution of Aminoglycosides by Transition Metal Cations. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 295-298; (b) Umezawa, H.; Umezawa, S.; Tsuchiya, T.; Takagi, Y.; Jikihara, T. Selectively Protected N-Acylated Derivative of an Aminoglycosidic Antibiotic. Division of Can. Appl. No. 339,531, 126 pp. **1982**, CAN 98:198653.
- 12) Moon, M. S.; Jun, S. J.; Lee, S. H.; Cheong, C. S.; Kim, K. S.; Lee, B. S. A Semi-Synthesis of Isepamicin by Fragmentation Method. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 607-609.
- 13) Nam, G.; Kim, S. H.; Kim, J.; Shin, J.; Jang, E. An Efficient and Selective 1-N-Monoethylation of Sisomicin: Process Development of Netilmicin. *Org. Proc. Res. Dev.* **2002**, *6*, 78-81.
- 14) Davies, D. H.; Mallams, A. K.; Counelis, M.; Loebenberg, D.; Moss, E. L., Jr.; Waitz, J. A. Semisynthetic Aminoglycoside Antibacterials. 6. Synthesis of Sisomicin, Antibiotic G-52, and Novel 6'-Substituted Analogs of Sisomicin from Aminoglycoside 66-40C. *J. Med. Chem.* **1978**, *21*, 189-193.

- 15) Weinstein, M. J.; Wagman, G. H.; Marquez, J. A. Antibiotic G-52. German patent DE 2334923, 1974, CAN 80:131672.
- 16) Rosen, B. P.; Mobashery, S. *Resolving the Antibiotic Paradox: Progress in Understanding Drug Resistance and Development of New Antibiotics*. Kluwer Academic / Plenum Publisher, New York, 1998.
- 17) Umezawa H; Nishimura Y; Tsuchiya T; Umezawa S. Syntheses of 6'-N-Methyl-Kanamycin and 3',4'-Dideoxy-6'-N-methylkanamycin B Active Against Resistant Strains Having 6'-N-Acetylating Enzymes. *J. Antibiot.* 1972, 25, 743-745.
- 18) Weinstein, M. J.; Wagman, G. H.; Testa, R.; Marquez, J. A. Antibiotics from *Micromonospora grisea* and *M. rhodorangea*. German patent DE 2239964, 1973, CAN 79:51820.
- 19) Weinstein, M. J.; Wagman, G. H.; Marquez J. A.; Testa, R. T.; Waitz, J. A. Verdamicin, a New Broad Spectrum Aminoglycoside Antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1975, 7, 246-249.
- 20) Yu, P. K.; Comparison of in Vitro Antibacterial Activities of Gentamicin and Verdamicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1974, 6, 526-528.
- 21) Daniels, P. J. L.; Marquez, J. A. Isolating Gentamicin C2a. U.S. patent 3984395, 1976, CAN 86:15205.
- 22) Wagman, G. H.; Weinstein, M. J. Antibiotics from *Micromonospora*. *Ann. Rev. Microbiol.* 1980, 34, 537-557.
- 23) Kase, H.; Shimura, G.; Iida, T.; Nakayama, K. Sagamicin and the Related Aminoglycosides: Fermentation and Biosynthesis. Part II. Biotransformation of

Sisomicin and Verdamicin by *Micromonospora sagamiensis*. *Agr. and Biol. Chem.* **1982**, *46*, 515-522.

- 24) Sandoval, R. M.; Reilly, J. P.; Running, W.; Campos, S. B.; Santos, J. R.; Phillips, C. L.; Molitoris, B. A. A Non-Nephrotoxic Gentamicin Congener that Retains Antimicrobial Efficacy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2006**, *17*, 2697-2705.
- 25) (a) Nyffeler, P. T.; Liang, C-H.; Koeller, K. M.; Wong, C-H. The Chemistry of Amine-Azide Interconversion: Catalytic Diazotransfer and Regioselective Azide Reduction. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10773-10778; (b) Alper, P. B.; Hung, S.-C.; Wong, C.-H. Metal Catalyzed Diazo Transfer for the Synthesis of Azides from Amines. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6029-6032; (c) Vasella, A.; Witzig, C.; Chiara, J.-L.; Martin-Lomas, M. Convenient Synthesis of 2-Azido-2-deoxy-Aldoses by Diazo Transfer. *Helv. Chim. Acta* **1991**, *74*, 2073-2077; (d) Zaloom, J.; Roberts, D. C. Preparation of Azido Derivatives from Amino Acids and Peptides by Diazo Transfer. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 5173-5176; (e) Cavender, C. J.; Shiner, V. J. Trifluoromethanesulfonyl Azide. Its Reaction with Alkyl Amines to Form Alkyl Azides. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3567-3569; (f) Fischer, W.; Anselme, J.-P. The Reaction of Amine Anions with p-Toluenesulfonyl Azide. A Novel Azide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 5284-5285.
- 26) Pour un article de revue voir: (a) Bulman, P. C.; McCarthy, T. J. Oxidation Adjacent to C=C Bonds. *Comp. Org. Synth.* **1991**, *7*, 83-117; pour le premier exemple d'une telle transformation voir: Guillemonat, A. Oxidation of Ethylenic Hydrocarbons with Selenium Dioxide. *Annali di Chimica Applicata* **1939**, *11*, 143-211.
- 27) Sharpless, K. B.; Lauer R. F. Selenium Dioxide Oxidation of Olefins. Evidence for the Intermediacy of Allylseleninic Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 7154-7155.

- 28) Singleton, D. A.; Hang, C. Isotope Effects and the Mechanism of Allylic Hydroxylation of Alkenes with Selenium Dioxide *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 7554-7560.
- 29) Dale, J. A.; Mosher, H. S. Nuclear Magnetic Resonance Enantiomer Reagents. Configurational Correlations via Nuclear Magnetic Resonance Chemical Shifts of Diastereomeric Mandelate, O-Methylmandelate, and α -Methoxy- α -Trifluoromethylphenylacetate (MTPA) Esters. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 512-519.
- 30) Dubost, C.; Leroy, B.; Marko, I. E.; Tinant, B.; Declercq, J.; Bryans, J. Stereoselective Synthesis of Functionalized Triol Units by SnCl_4 Promoted Allylation of α -benzyloxyaldehydes: Crucial Role of the Stoichiometry of the Lewis Acid. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 7693-7704.
- 31)(a) Dess, D. B.; Martin, J. C. Readily Accessible 12-I-5 Oxidant for the Conversion of Primary and Secondary Alcohols to Aldehydes and Ketones. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4155-4156; (b) Meyer, S. D.; Schreiber, S. L.; Acceleration of the Dess-Martin Oxidation by Water. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7549-7552.
- 32)(a) Corey, E. J.; Helal, C. J. Reduction of Carbonyl Compounds with Chiral Oxazaborolidine Catalysts: A New Paradigm for Enantioselective Catalysis and a Powerful New Synthetic Method. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1986-2012; (b) Corey, E. J.; Bakshi, R. K.; Shibata, S.; Chen, C. P.; Singh, V. K. A Stable and Easily Prepared Catalyst for the Enantioselective Reduction of Ketones. Applications to Multistep Syntheses. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 7925-7926.
- 33) Staudinger, H.; Meyer, J. New Organic Compounds of Phosphorus. III. Phosphinemethylene Derivatives and Phosphinimines. *Helv. Chem. Acta* **1919**, *2*,

635-646. Gololobov, Y. G.; Kasukhin, L. F. Recent Advances in the Staudinger Reaction. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 1353-1406.

34) Marquez, J. A.; Wagman, G. H.; Testa, R. T.; Waitz, J. A.; Weinstein, M. J.; A New Broad Spectrum Aminoglycoside Antibiotic, G-52, Produced by *Micromonospora zionensis*. *J. Antibiot.* **1976**, *29*, 483-487.

Chapitre 6
Partie expérimentale

6.1 Notes générales

Instrumentation

Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés pour la raie D du sodium (589 nm) à l'aide d'un polarimètre Perkin-Elmer 241 à 25 °C. Les spectres infrarouges (IR) ont été enregistrés avec un spectrophotomètre FTIR Pergamon 1000. Les échantillons étaient soit mélangés à du KBr et moulés en forme de pastille pour les solides ou déposés sur une pastille de NaCl. Seules les bandes intenses et/ou significatives sont listées.

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été pris en solution avec des appareils Bruker 300 et 400 MHz pour les protons (^1H) et 75 et 100 MHz pour les carbones (^{13}C). Les déplacements chimiques sont exprimés en parties par million (ppm) selon l'échelle δ et référés au solvant utilisé (7.27 ppm pour le CDCl_3 , 4.80 ppm pour le D_2O , 3.30 ppm pour CD_3OD et 2.50 pour le DSMO). Les valeurs de constantes de couplage J sont exprimées en Hertz (Hz). Les symbolismes employés pour décrire la multiplicité des signaux sont les suivants :

s : Singulet

t : Triplet

d : Doublet

q : Quadruplet

dd : Doublet dédoublé

m : Multiplet

Les spectres de masse à haute résolution ont été enregistrés en mode positif avec un spectromètre LC-MSD-Tof d'Agilent Technologies par la technique d'ionisation par électrospray.

Les spectres de masse à basse résolution ont été enregistrés en mode positif avec un spectromètre Surveyor MSQ de Thermo Finnigan en utilisant la technique d'ionisation par électrospray.

Chromatographie

La plupart des produits ont été purifiés par chromatographie éclair avec du gel de silice Kieselgel 60 (Merck no 9385, 200-400 mesh). Les solvants utilisés sont préalablement distillés. Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur des plaques de verre commerciales enduites de gel de silice (0.25 mm d'épaisseur, Merck, Kieselgel 60F₂₅₄).

Lumière ultraviolette: Les produits possédant des chromophores absorbants dans l'ultraviolet (254 nm) sont facilement détectés en chromatographie sur couche mince.

Molybdate d'ammonium et sulfate de cérium aqueux: Les plaques de CCM sont immergées dans une solution de molybdate d'ammonium, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, (25 g) et sulfate de cérium, CeSO_4 (10 g) dans une solution d'acide sulfurique concentré-eau (1:9, 1 L) et ensuite chauffées; la plupart des composés forment une tache bleue.

Détection des groupements aminés: Les fonctions amines sont révélées par l'action de la ninhydrine (2 g) dans du *n*-butanol (600 mL) et de l'acide acétique (18 mL). Les plaques de CCM sont chauffées et vaporisées pour donner des taches rougeâtres pour la plupart des composés aminés.

Détection des carbonyles: Les aldéhydes et les cétones sont révélés en formant leur dérivé dinitro-2,4-phénylhydrazone. Les plaques de CCM sont immergées dans une solution à 0.5% de dinitro-2,4-phénylhydrazine dans du HCl 2N puis chauffées pour donner des taches oranges.

Détection des oléfines: Les plaques de CCM sont immergées dans une solution au KMnO_4 (3 g) dans de l'eau (300 mL) et K_2CO_3 (20 g) puis chauffées.

Purification des solvants

L'acétate d'éthyle, le dichlorométhane et les hexanes sont distillés avant usage. Les autres solvants de qualité spectroscopique commercialement disponible ont été utilisés sans autre purification. Pour les réactions qui requièrent des conditions anhydres, les solvants sont séchés selon les méthodes spécifiques décrites dans la littérature. Le tableau suivant montre les méthodes de séchage utilisées dans la partie expérimentale de ce texte.

Solvant	Agent desséchant
Benzène	CaH ₂
CH ₂ Cl ₂	CaH ₂ ou SDS ^{a,b}
Et ₂ O	Na/ benzophénone ou SDS ^{a,b}
THF	Na/ benzophénone ou SDS ^{a,b}
Toluène	CaH ₂ ou SDS ^{a,c}

^a. SDS (Solvent Dispensing System)

^b. Séchage par filtration sur colonne d'alumine neutre sous atmosphère d'argon

^c. Séchage par filtration sur colonne d'alumine et l'oxyde de cuivre (II) sous atmosphère d'argon

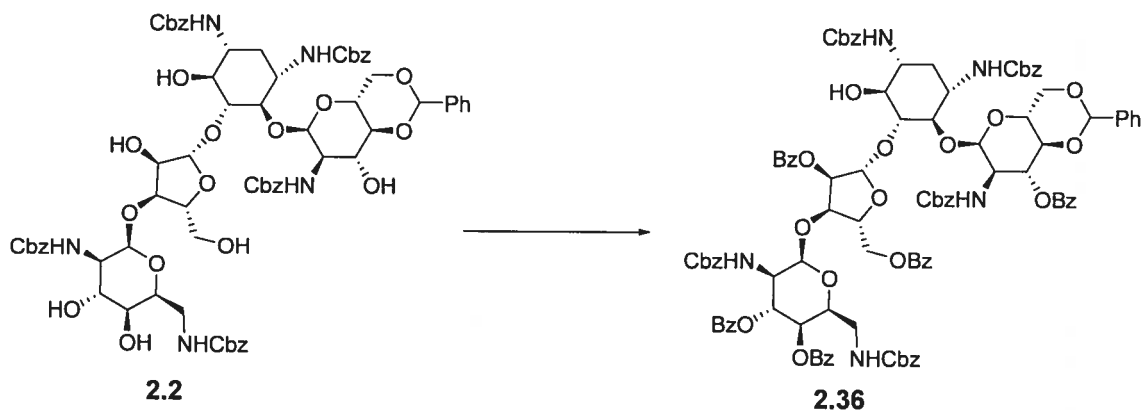
Généralités

Les réactions effectuées en conditions anhydres sont effectuées sous atmosphère d'argon en utilisant de la verrerie, des seringues de verre et des aiguilles préalablement séchées à l'étuve.

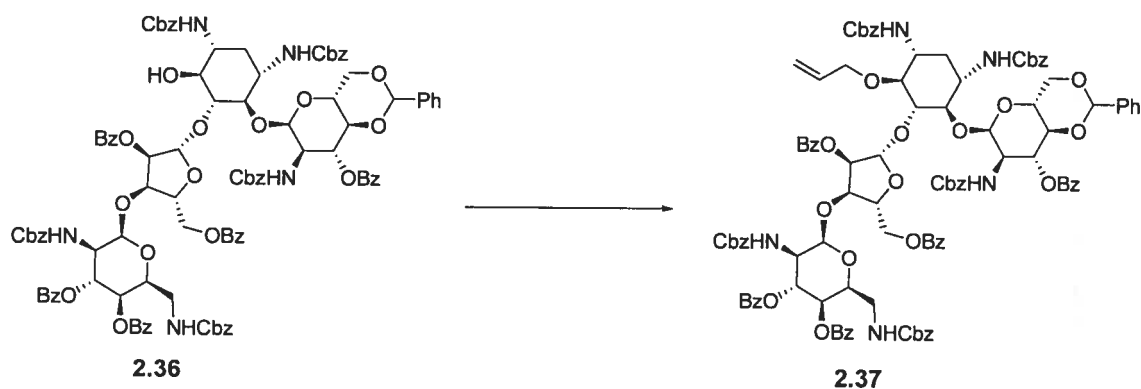
La pureté des aminoglycosides semi-synthétiques a été vérifiée par HPLC. Les conditions chromatographiques et les temps de rétention pour chaque composé sont présentés à l'annexe A.

Certains spectres RMN ¹H sont présentés à titre d'exemple à l'annexe B.

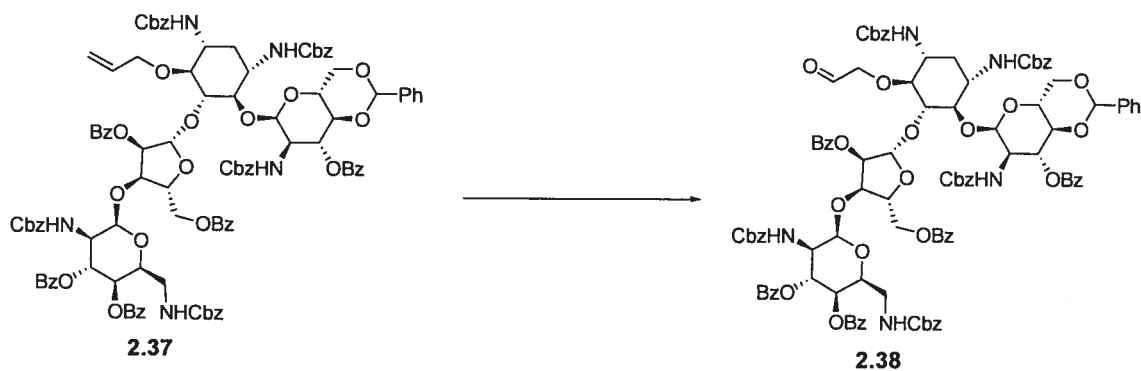
6.2 Procédures expérimentales pour le Chapitre 2.



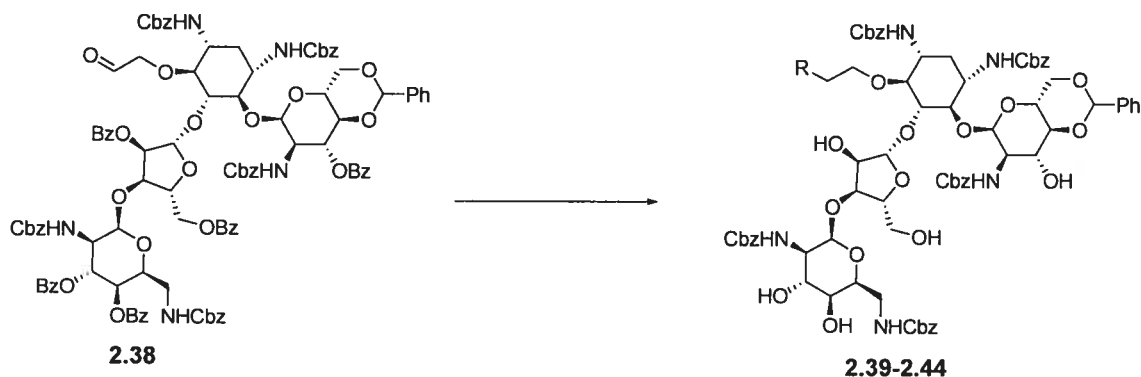
4-*O*-[3-*O*-Benzoyl-4,6-*O*-benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(3,4-di-*O*-benzoyl-2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2,5-di-*O*-benzoyl- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.36). Du chlorure de benzoyle (0.42 mL, 3.6 mmol) a été ajouté à une solution de **2.2**¹ (1.0 g, 0.73 mmol) dans la pyridine (30 mL). Après 16 h, de l'eau (1 mL) a été ajoutée et les solvants ont été évaporés sous pression réduite. Le résidu a été dissout dans AcOEt et la phase organique a été lavée avec une solution de HCl 0.5 M et avec une solution saturée de NaHCO₃. La phase organique a ensuite été séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (AcOEt:hexane 1:1) pour donner le composé **2.36** (1.0 g, 75%). [α]_D +18.7° (c 0.6, CHCl₃); ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.21-7.83 (m, 10H), 7.76-6.89 (m, 45H), 6.05-3.02 (m, 41H), 2.32 (m, 1H), 1.42 (m, 1H); *m/z* calculée pour C₁₀₅H₉₉N₅O₂₉ [M+H]⁺: 1894.65040, SM trouvée: 1894.7, SMHR trouvée: 1894.65062. La régiosélectivité de cette acylation a été confirmée ultérieurement (voir Schéma 2.9 et 2.10).



4-O-[[3-O-Benzoyl-4,6-O-benzylidène-2-benzoyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(3,4-di-O-benzoyl-2,6-dibenzoyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2,5-di-O-benzoyl- β -D-ribofuranosyl}]-6-O-allyl-1,3-di-N-benzoyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.37). À une solution de **2.36** (1.0 g, 0.53 mmol) et d'iodure d'allyle (0.29 mL, 3.17 mmol) dans THF anhydre (10 mL) à 0 °C a été ajoutée une solution de KHMDS 0.5 M dans du toluène (1.6 mL, 0.79 mmol). Cette solution a été amenée à TP et 12 h plus tard, une solution 2.0 M de NH_4Cl a été ajoutée, puis la phase organique a été séparée et lavée avec une solution de thiosulfate de sodium 1 M. La phase organique a ensuite été séchée sur Na_2SO_4 puis évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH_2Cl_2 a été purifié par chromatographie éclair (AcOEt:hexane 2:3) pour donner le composé **2.37** (0.43 g, 43 %); $[\alpha]_D +15.2^\circ$ (c 0.5, CHCl_3); ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 8.22-7.86 (m, 10H), 7.78-6.93 (m, 45H), 6.28-3.00 (m, 46H), 2.34 (m, 1H), 1.39 (m, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 169.4, 168.3, 167.9, 167.7, 167.3, 163.1, 162.7, 162.4, 161.9, 161.6, 140.4, 118.2, 133.7-126.1 (66C), 111.2, 102.1, 101.4, 87.1, 84.3, 82.6, 82.0, 81.3, 80.7, 78.2, 76.3, 75.8, 74.7, 74.2, 72.3, 71.8, 71.4, 71.0, 70.7, 70.3, 70.1, 68.2, 63.8, 55.4, 51.3, 51.9, 49.7, 43.1, 36.5, 34.2; m/z calculée pour $\text{C}_{108}\text{H}_{103}\text{N}_5\text{O}_{29}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1934.68170, SM trouvée: 1934.6, SMHR trouvée: 1934.67887.

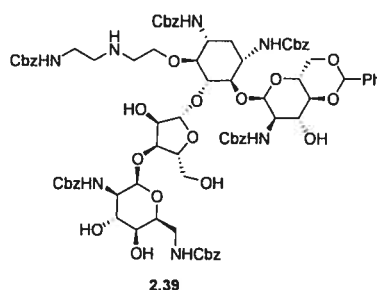


4-*O*-[3-*O*-Benzoyl-4,6-*O*-benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucoypyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(3,4-di-*O*-benzoyl-2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2,5-di-*O*-benzoyl- β -D-ribofuranosyl}]-6-*O*-2-éthanal-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.38). Le composé **2.37** (0.41 g, 0.21 mmol) a été dissout dans CH₂Cl₂ (10 mL) et la solution a été refroidie à -78 °C. De l'ozone a été bullé dans le ballon jusqu'à ce que la solution devienne bleue pâle et 1 h plus tard de l'argon a été bullé dans le ballon pour enlever l'excès d'ozone. Par la suite, Me₂S (0.15 mL, 2.1 mmol) a été ajouté et la solution a été réchauffée à TP. 2 h plus tard, le solvant a été évaporé sous pression réduite et le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (AcOEt:hexane 2:3) pour donner l'aldéhyde **2.38** (0.32 g, 80%) qui a été utilisé rapidement. R_f 0.4 (1:1 AcOEt:hexane); *m/z* calculée pour C₉₉H₁₀₇N₅O₂₈Si [M+H]⁺: 1842.7, SM trouvée: 1842.9.

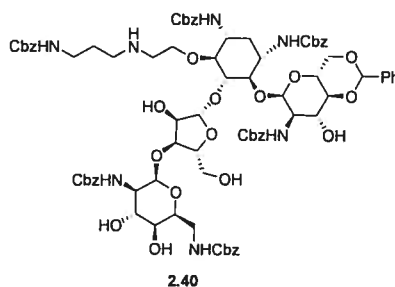


Procédure générale pour les aminations réductrices suivies du traitement avec le méthanolate de sodium (2.39-2.44) :

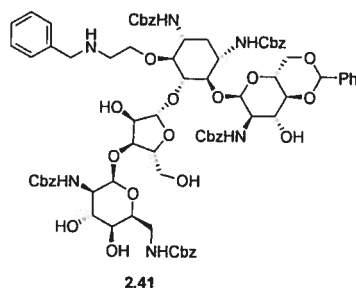
L'aldéhyde **2.38** (0.103 g, 0.052 mmol) ainsi que l'amine appropriée (0.154 mmol) ont été dissouts dans du MeOH (3 mL). Par la suite, AcOH (0.1 mL) suivi d'une solution 1.0 M de NaBH₃CN dans THF (0.154 mL, 0.154 mmol) ont été ajoutés. Le lendemain matin, une CCM a indiqué que l'aldéhyde était complètement consommé. Une solution fraîchement préparée de MeONa dans MeOH a été ajoutée tranquillement jusqu'à ce que le pH atteigne 10.5. La solution a été agitée jusqu'à ce qu'un spectre de masse indique que la réaction était terminée (généralement 24 à 36 h). À ce moment, la solution a été refroidie à -78 °C et de la glace sèche a été ajoutée jusqu'à ce que le pH soit neutre et le solvant a été évaporé. Le résidu a été dissout dans AcOEt et la phase organique a été lavée avec une solution de HCl 0.5 M et avec une solution saturée de NaHCO₃. La phase organique a ensuite été séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair pour donner les composés **2.39-2.44**.



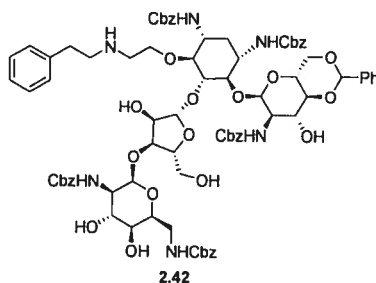
4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl]]-2-*N*-(2-benzyloxycarbonylaminoéthyl)-aminoéthyl]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.39). (39%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 5% MeOH dans CH₂Cl₂; R_f 0.3 (10% MeOH dans CH₂Cl₂); [α]_D +16.3° (c 1.0, MeOH); *m/z* calculée pour C₈₂H₉₅N₇O₂₆ [M+H]⁺: 1594.6, SM trouvée: 1594.9.



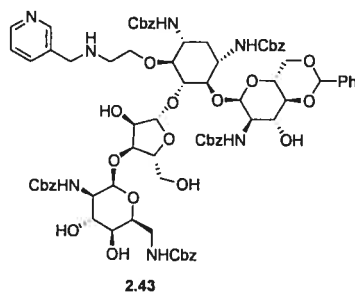
4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl]]-2-*N*-(3-benzyloxycarbonylaminopropyl)-aminoéthyl]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.40). (33%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 5% MeOH dans CH₂Cl₂; R_f 0.3 (10% MeOH dans CH₂Cl₂); [α]_D +12.5° (c 1.0, MeOH); *m/z* calculée pour C₈₃H₉₇N₇O₂₆ [M+H]⁺: 1608.6, SM trouvée: 1608.8.



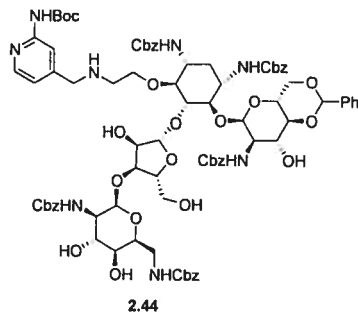
4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-gluco-pyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-ido-pyranosyl)- β -D-ribofuranosyl]-{2-*N*-(benzyl)-aminoéthyl}-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.41). (40%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 5% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +17.2° (c 1.1, MeOH); R_f 0.4 (10% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₇₉H₉₀N₆O₂₄ [M+H]⁺: 1507.6, SM trouvée: 1507.8.



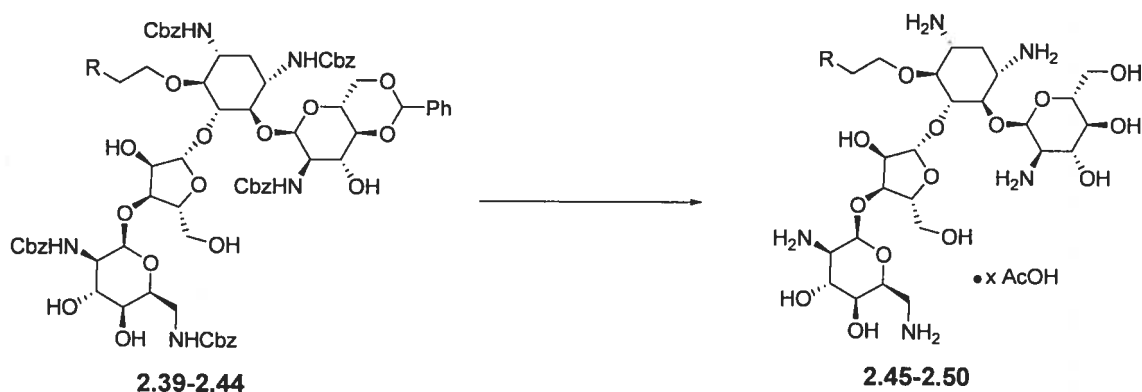
4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-gluco-pyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-ido-pyranosyl)- β -D-ribofuranosyl]-{2-*N*-(2-phényléthyl)-aminoéthyl}-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.42). (36%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 5% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +13.1° (c 1.0, MeOH); R_f 0.4 (10% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₈₀H₉₂N₆O₂₄ [M+H]⁺: 1521.6, SM trouvée: 1521.9.



4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl]}-2-*N*-(3-méthylpyridyl)-aminoéthyl}-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.43). (32%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 5% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +14.7° (c 1.0, MeOH); R_f 0.3 (10% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₇₈H₈₉N₇O₂₄ [M+H]⁺: 1508.6, SM trouvée: 1508.7.

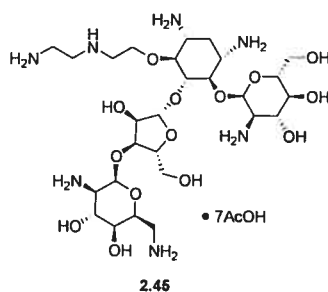


4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl]}-2-*N*-(4-méthyl-2-tert-butylpyridyl)-aminoéthyl}-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.44). (38%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 5% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +11.3° (c 0.9, MeOH); R_f 0.3 (10% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₈₃H₉₈N₈O₂₆ [M+H]⁺: 1623.7, SM trouvée: 1624.0.



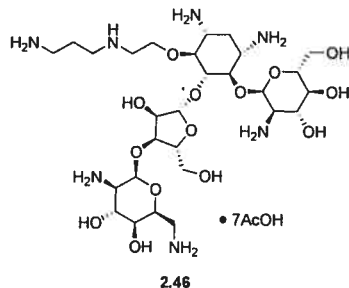
Procédure générale pour les déprotections finales (2.45-2.50):

Le substrat de départ **2.39-2.44** a été dissout dans AcOH:H₂O (4:1, 5 mL) puis cette solution a été chauffée à 60 °C jusqu'à ce qu'un spectre de masse indique que la réaction est terminée (généralement 2 à 6 h). La solution a été refroidie à TP et une quantité catalytique (environ 20 mol %) d'hydroxyde de palladium 20% sur charbon a été ajoutée. Le mélange a été laissé sous agitation pendant 3 h sous 1 atm de H₂, puis un spectre de masse a indiqué que la réaction était terminée. Le mélange a été filtré sur un lit de célite et le filtrat a été évaporé sous pression réduite. Le résidu a été lavé avec CH₂Cl₂ (1 mL, 2 fois) puis dissout dans un minimum de H₂O et lyophilisé pour donner des solides blancs **2.45-2.50**.

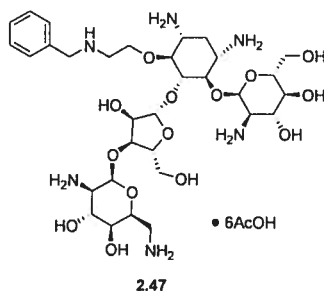


4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-amino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl}]-6-O-{2-N-(2-aminoéthyl)-aminoéthyl}-2-désoxystreptamine (2.45). (70%); $[\alpha]_D +11.6^\circ$ (c 0.5, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 5.77 (m, 1H), 5.48 (m, 1H), 5.22 (m, 1H), 4.33-4.05 (m, 6H), 3.90-3.55 (m, 12H), 3.42-3.14 (m, 6H), 3.06-2.58 (m, 6H), 2.34 (m, 1H), 1.87 (s, 21H), 1.66 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 182.0, 110.1, 96.8, 96.5, 86.2, 81.6, 81.2, 75.3,

73.9, 73.4, 71.0, 70.4, 69.8, 68.4, 67.9, 61.3, 60.8, 60.5, 54.7, 51.7, 50.8, 50.1, 41.7, 39.8, 31.7, 32.8, 28.6, 28.3, 23.6; m/z calculée pour $C_{27}H_{55}N_7O_{14}$ $[M+H]^+$: 702.38852, SM trouvée: 702.5, SMHR trouvée: 702.38753.

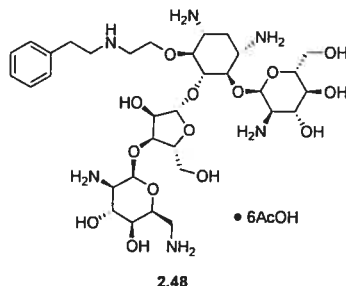


4-O-[{2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5-O-{3-O-(2,6-amino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl}]-6-O-{2-N-(3-aminopropyl)-aminoéthyl}-2-désoxystreptamine (2.46). (65%); $[\alpha]_D +8.4^\circ$ (c 0.5, H_2O); 1H NMR (400 MHz, D_2O), δ (ppm): 5.74 (m, 1H), 5.47 (m, 1H), 5.23 (m, 1H), 4.57 (m, 1H), 4.20-3.98 (m, 5H), 3.94-3.52 (m, 12H), 3.46-2.72 (m, 14H), 2.24 (m, 1H), 1.88 (s, 21H), 1.57 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O), δ (ppm): 182.0, 109.6, 97.8, 96.5, 86.3, 82.4, 79.6, 74.8, 74.3, 71.5, 71.0, 70.1, 68.9, 68.4, 67.2, 61.4, 54.6, 52.9, 51.1, 50.5, 49.6, 49.0, 45.6, 43.9, 41.4, 37.3, 31.3, 27.6, 24.8, 23.7; m/z calculée pour $C_{28}H_{57}N_7O_{14}$ $[M+H]^+$: 716.40417, SM trouvée: 716.8, SMHR trouvée: 716.40566.

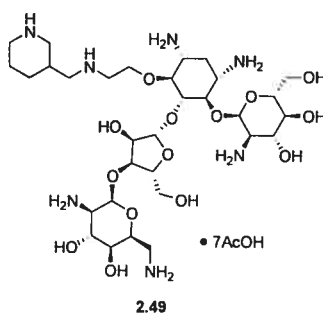


4-O-[{2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5-O-{3-O-(2,6-amino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl}]-6-O-{2-N-benzylaminoéthyl}-2-désoxystreptamine (2.47). (70%); $[\alpha]_D +7.8^\circ$ (c 0.5, H_2O); 1H NMR (400 MHz, D_2O), δ (ppm): 7.39-7.27 (m, 5H), 5.69 (m, 1H), 5.33 (m, 1H), 5.11 (m, 1H), 4.51 (m, 1H), 4.18-4.00 (m, 5H), 3.92-3.45 (m, 14H), 3.38-3.12 (m, 8H), 2.24 (m, 1H), 1.87 (s, 18H), 1.61 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O), δ (ppm): 180.9, 132.7, 130.9 (2C), 130.2 (2C),

129.2, 108.5, 96.7, 95.3, 86.1, 81.7, 78.4, 75.7, 74.8, 73.6, 71.2, 70.3, 69.8, 68.7, 68.2, 66.0, 61.4, 60.6, 54.3, 51.5, 51.0, 50.3, 48.8, 47.3, 41.6, 40.5, 29.6, 23.8; m/z calculée pour $C_{32}H_{56}N_6O_{14}$ $[M+H]^+$: 749.39328, SM trouvée: 749.7, SMHR trouvée: 749.39427.

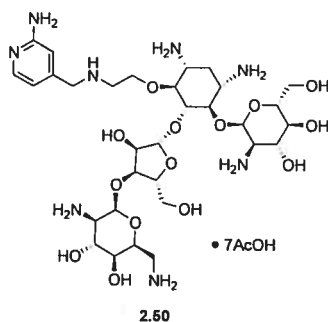


4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-[[3-O-(2,6-amino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl]]-6-O-[[2-N-(2-phényléthyl)-aminoéthyl]-2-désoxystreptamine (2.48). (60%); $[\alpha]_D +12.1^\circ$ (c 0.5, H_2O); 1H NMR (400 MHz, D_2O), δ (ppm): 7.27-7.19 (m, 5H), 5.69 (m, 1H), 5.31 (m, 1H), 5.14 (m, 1H), 4.48 (m, 1H), 4.18-4.02 (m, 5H), 3.95-3.54 (m, 12H), 3.38-3.12 (m, 10H), 2.74 (m, 2H), 2.21 (m, 1H), 1.89 (s, 18H), 1.62 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O), δ (ppm): 181.3, 137.1, 130.6 (2C), 129.7 (2C), 127.6, 109.3, 97.4, 96.0, 85.4, 81.3, 81.0, 77.9, 74.4, 74.0, 73.6, 73.3, 70.8, 69.6, 69.0, 67.7, 67.2, 65.7, 60.8, 59.7, 54.4, 51.4, 49.2, 48.8, 47.4, 46.7, 40.8, 29.2, 23.1; m/z calculée pour $C_{33}H_{58}N_6O_{14}$ $[M+H]^+$: 763.40893, SM trouvée: 763.7, SMHR trouvée: 763.40673.

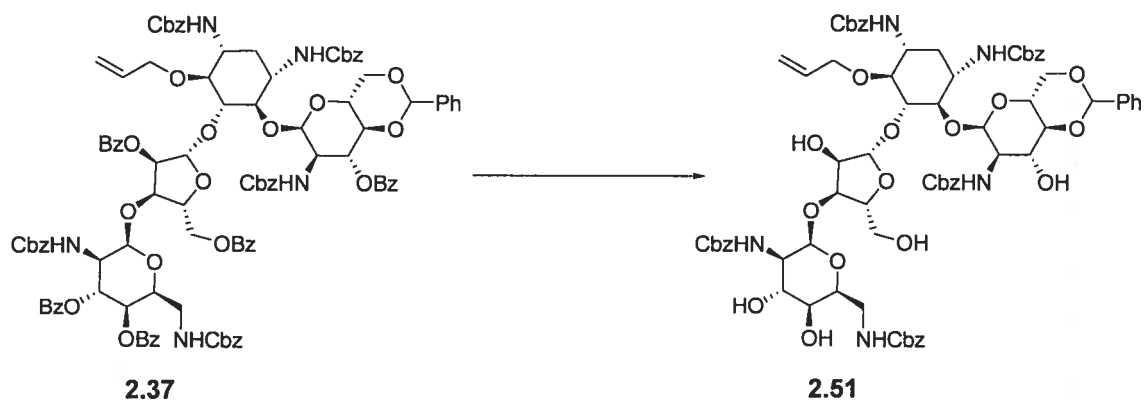


4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-[[3-O-(2,6-amino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl]]-6-O-[[2-N-(3-méthylpiperidyl)-aminoéthyl]-2-désoxystreptamine (2.49). (60%); $[\alpha]_D +8.7^\circ$ (c 0.5, H_2O); 1H NMR (400 MHz, D_2O), δ (ppm): 5.68 (m, 1H), 5.31 (m, 1H), 5.23 (m, 1H), 4.50 (m, 1H), 4.23-3.32 (m, 19H), 3.26-2.73 (m, 13H), 2.18 (m, 1H), 1.79 (s, 21H), 1.67-1.41 (m, 5H); ^{13}C NMR (101

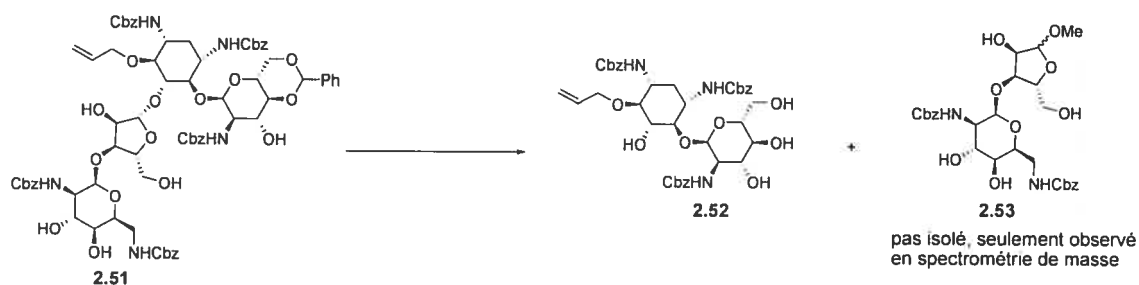
MHz, D₂O), δ (ppm): 180.1, 108.7, 96.5, 95.3, 85.6, 81.7, 81.1, 77.6, 74.5, 73.2, 70.9, 69.7, 69.2, 68.2, 67.6, 60.8, 60.0, 55.3, 51.8, 50.6, 50.2, 49.3, 48.9, 46.4, 44.7, 44.0, 40.9, 30.6, 28.5, 23.1, 22.4, 21.6, 18.7; m/z calculée pour C₃₁H₆₁N₇O₁₄ [M+H]⁺: 756.43547, SM trouvée: 756.8, SMHR trouvée: 756.43274.



4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-amino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl}]-6-O-{2-N-(4-méthyl-2-aminopyridyl)-aminoéthyl}-2-désoxystreptamine (2.50). (55%); $[\alpha]_D +9.4^\circ$ (c 0.5, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 7.92 (s, 1H), 7.84 (d, 5Hz, 1H), 6.83 (d, 5Hz, 1H), 5.71 (m, 1H), 5.32 (m, 1H), 5.17 (m, 1H), 4.47 (m, 1H), 4.16-3.95 (m, 5H), 3.85-3.52 (m, 12H), 3.13-2.79 (m, 10H), 2.21 (m, 1H), 1.83 (s, 21H), 1.57 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 181.3, 157.6, 143.9, 142.8, 117.0, 114.5, 108.9, 97.6, 95.8, 84.7, 80.6, 80.3, 77.0, 73.9, 73.2, 72.5, 70.1, 69.1, 68.4, 68.0, 67.3, 66.4, 65.8, 60.7, 59.8, 53.6, 50.5, 48.7, 47.4, 46.2, 40.6, 28.7, 23.6; m/z calculée pour C₃₁H₅₆N₈O₁₄ [M+H]⁺: 765.39942, SM trouvée: 765.7, SMHR trouvée: 765.39628.



4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl]-6-*O*-allyl-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.51). Le composé **2.37** (198 mg, 0.104 mmol) a été dissout dans THF (2 mL) et MeOH (5 mL) a été ajouté. Une solution fraîchement préparée de MeONa dans MeOH a été ajoutée tranquillement jusqu'à ce que le pH atteigne 10.5. 36 h plus tard, un spectre de masse a indiqué que la réaction était terminée. La solution a été refroidie à -78 °C et de la glace sèche a été ajoutée jusqu'à ce que le pH soit neutre et le solvant a été évaporé. Le résidu a été dissout dans AcOEt et la phase organique a été lavée avec une solution de HCl 0.5 M et avec une solution saturée de NaHCO₃. La phase organique a ensuite été séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (tranquillement de 1% à 2.5% de MeOH dans CH₂Cl₂) pour donner le composé **2.51** (41 mg, 28% dû à la séparation difficile); [α]_D: +23.5 (*c* 1.0, CHCl₃); R_f 0.5 (CHCl₃:AcOEt:MeOH, 20:5:3); ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.65-7.03 (m, 30H), 5.68-3.04 (m, 41H), 2.26 (m, 1H), 1.58 (m, 1H), *m/z* calculée pour C₇₃H₈₃N₅O₂₄ [M+H]⁺: 1414.5, SM trouvée: 1414.7.



4-*O*-(2-Benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosy)-6-*O*-allyl-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.52). Le composé **2.51** (40 mg, 0.028 mmol) a été dissout dans du MeOH (1 mL) et du TMS-Cl (0.13 mL, 1.0 mmol) a été ajouté pour produire une solution HCl 1.0 M dans MeOH. Le lendemain matin, le précipité blanc a été filtré et lavé avec du méthanol pour donner le composé **2.52** (16 mg, 74%). m/z calculée pour $C_{39}H_{47}N_3O_{13}$ $[M+H]^+$: 766.31871, SM trouvée: 766.5, SMHR trouvée: 766.31639. Ce produit **2.52** a dû être *O*-acétylé pour être caractérisé par RMN, car sinon il est insoluble dans la plupart des solvants organiques usuels. Un spectre de masse du filtrat a révélé que le pic correspondant à la masse du produit **2.53** est le pic majoritaire. m/z calculée pour $C_{28}H_{36}N_2O_{12}$ $[M+H]^+$: 593.2, SM trouvée: 593.4 (Ce même pic est aussi le pic majoritaire lors de l'analyse en spectrométrie de masse du filtrat de la réaction de méthanolyse de la penta-*N*-Cbz-paromomycine). Puisque cette réaction de fragmentation chimique avait pour objectif de nous permettre de déterminer la position du groupement allyle, nous n'avons pas caractérisé davantage les composés présents dans le filtrat car il nous a semblé qu'ils étaient dépourvus d'un tel groupement. Il semble que cette réaction fournit un mélange des anomères α et β des formes ribofuranose et ribopyranose du composé **2.53**, tout comme la réaction de méthanolyse de la paromomycine.³



4-*O*-(3,4,6-Tri-*O*-acétyl-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl)-5-*O*-acétyl-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-6-*O*-propyl-2-désoxystreptamine (2.54). Le substrat de départ **2.52** (16 mg, 0.021 mmol) a été dissout dans de la pyridine (1 mL) et Ac_2O a été ajouté (0.50 mL, 11 mmol). 18 h plus tard, les solvants ont été évaporés et le résidu a été dissout dans AcOEt . La phase organique a été lavée avec une solution de HCl 0.5 M, puis avec une solution saturée de NaHCO_3 et séchée sur Na_2SO_4 avant d'être évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH_2Cl_2 a été purifié par chromatographie éclair (AcOEt :hexane, 1:1) pour donner le composé **2.54** (17 mg, 87%); $[\alpha]_{\text{D}} +27.4^\circ$ (c 1.0, CHCl_3), ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.36-7.25 (m, 15H), 5.84-5.62 (m, 1H), 5.48 (s, 1H), 5.35-4.73 (m, 10H), 4.27-3.90 (m, 6H), 3.87-3.42 (m, 4H), 2.36 (m, 1H), 2.00 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.92 (s, 3H), 1.84 (s, 3H), 1.68-1.51 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 171.1, 171.0, 170.8, 169.5, 156.9, 155.6, 136.6, 136.4, 136.1, 133.8, 128.7, 128.2, 128.0, 127.9, 127.7, 127.6, 127.5, 116.6, 98.8, 81.6, 80.2, 76.1, 73.6, 71.4, 68.7, 68.2, 66.9, 66.7, 66.5, 62.4, 53.4, 50.4, 49.7, 34.2, 21.0, 20.6, 20.3, 20.6; m/z calculée pour $\text{C}_{47}\text{H}_{55}\text{N}_3\text{O}_{17}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 934.36097, SM trouvée: 934.5, SMHR trouvée: 934.35874.



4-*O*-[3,4,6-Tri-*O*-acétyl-2-amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-acétyl-6-*O*-propyl-2-déoxystreptamine (2.55). Le composé **2.54** (17 mg, 18 mmol) a été dissout dans AcOH:H₂O (4:1, 2 mL) et une quantité catalytique (environ 20 mol %) d'hydroxyde de palladium 20% sur charbon a été ajoutée. Le mélange a été laissé sous agitation pendant 3 h sous 1 atm de H₂, puis un spectre de masse a indiqué que la réaction était terminée. Le mélange a été filtré sur un lit de célite et concentré sous pression réduite pour donner le composé **2.55**. (8.5 mg, 65%); [α]_D +16.8° (c 0.5, D₂O), ¹H NMR (300 MHz, D₂O), δ (ppm): 5.64 (d, J = 2.6, 1H), 5.33 (t, J = 10.4, 1H), 5.02 (m, 1H), 4.23 (m, 1H), 4.15 (m, 1H), 3.82 (qt, J = 5, 1H), 3.71 (d, J = 8, 1H), 3.59 (dd, J = 4, 10, 1H), 3.51 (m, 1H), 3.43 (m, 1H), 3.34 (m, 2H), 2.48 (m, 1H), 2.16 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.92 (s, 9H), 1.88 (m, 1H), 1.43 (m, 2H), 0.94 (m, 3H). ; *m/z* calculée pour C₂₃H₃₇N₃O₁₁ [M+H]⁺: 532.25063, SM trouvée: 532.3, SMHR trouvée: 532.24917.

Le spectre RMN COSY du composé **2.55** qui a été utilisé pour confirmer la position du groupement propyle est disponible à la page suivante (Figure 6.1).

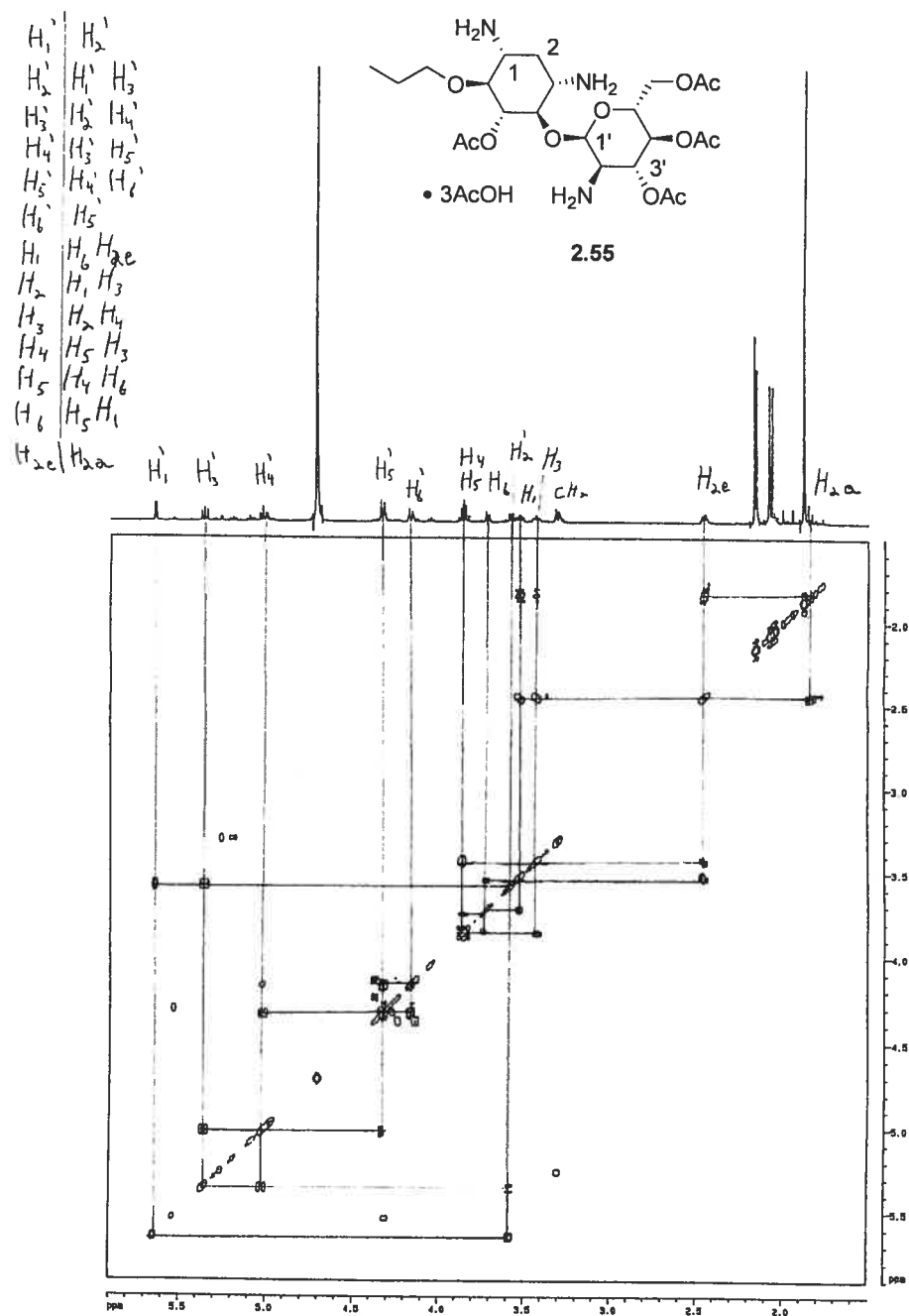
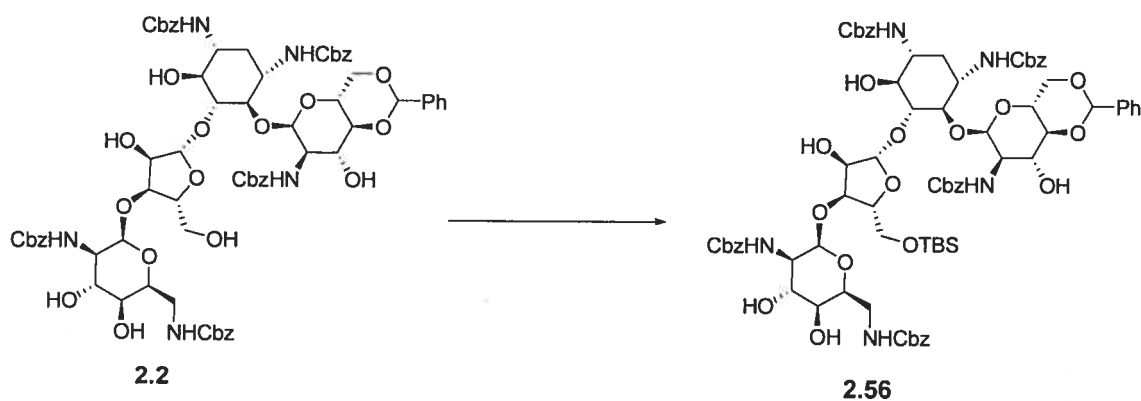
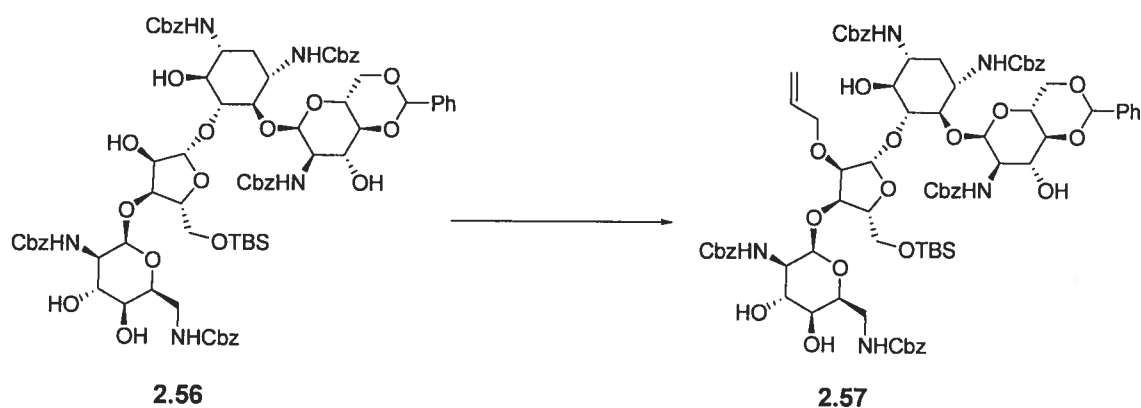


Figure 6.1. Spectre RMN COSY du composé 2.55 pour déterminer la position du groupement propyle.



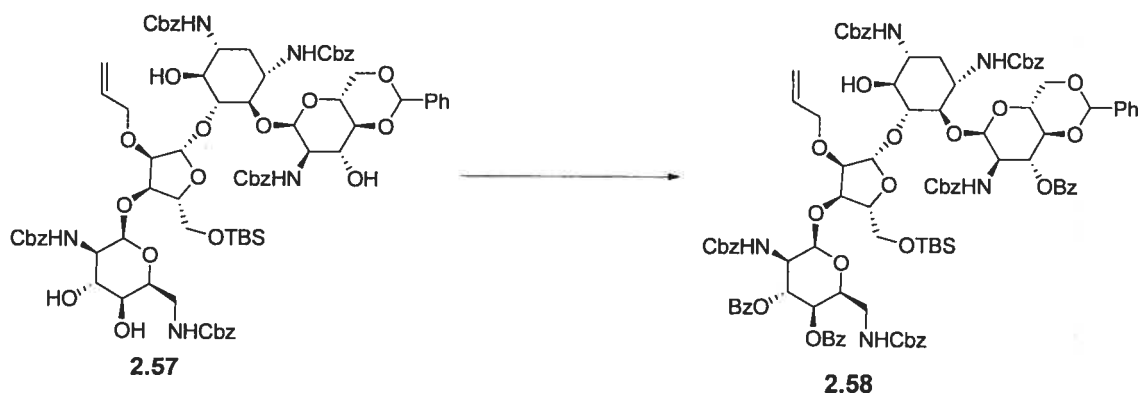
4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(-2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl- β -D-ribofuranosyl]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.56). Le composé **2.2**¹ (6.11 g, 4.41 mmol) préalablement séché par deux codistillations avec du toluène a été dissout dans CH₂Cl₂ (400 mL) et la 2,4,6-collidine (1.15 mL, 8.74 mmol) suivi de TBDMSOTf (0.50 mL, 2.18 mmol) ont été additionnés à 0°C. Le mélange a été laissé sous agitation pendant 2 h et une autre portion de TBDMSOTf (500 μ L, 2.18 mmol) a été ajoutée de nouveau. Par la suite, de l'eau a été ajoutée (5 mL) et la moitié du CH₂Cl₂ a été évaporée sous pression réduite. La phase organique a été lavée avec une solution de HCl 0.5 M, puis avec une solution saturée de NaHCO₃ et séchée sur Na₂SO₄ avant d'être évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (2% de MeOH dans CH₂Cl₂) pour donner le composé **2.56** (4.86 g, 75%); [α]_D: +41.8 (*c* 0.93, CHCl₃); R_f 0.6 (CHCl₃:AcOEt:MeOH, 20:5:3); ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.60-7.10 (m, 28H), 6.40 (s large, 2H), 5.60-3.00 (m, 40H), 2.20 (m, 1H), 1.30 (m, 1H), 0.83 (s, 9H), 0.01 (s, 6H); ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 158.5, 156.4, 138.0, 137.0, 136.9, 136.8, 136.5, 129.6, 129.5, 129.4, 129.2, 129.1, 129.0, 128.8, 128.7, 128.4, 128.3, 128.2, 128.1, 127.0, 98.5, 82.2, 78.1, 70.3, 70.2, 68.0, 67.8, 67.6, 67.4, 67.2, 26.6, 18.9; *m/z* calculée pour C₇₆H₉₃N₅O₂₄Si [M+H]⁺: 1488.60580, SM trouvée: 1488.9, SMHR trouvée: 1488.60258.

Le spectre RMN ¹H du composé **2.56** est disponible à la Figure B1 de l'Annexe B.



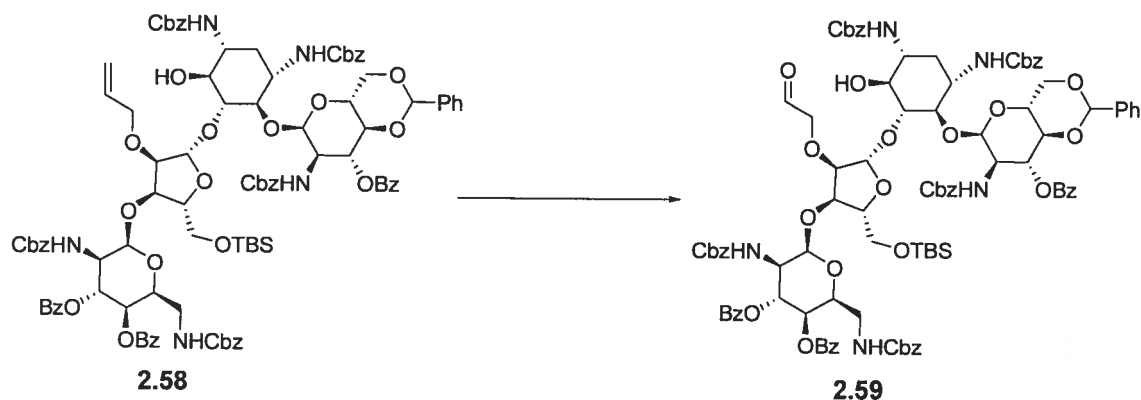
4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(-2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-*O*-allyl-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl- β -D-ribofuranosyl]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.57). À une solution du composé **2.56** (2.10 g, 1.41 mmol) et d'iodure d'allyle (620 μ L, 6.72 mmol) dans du THF anhydre (70 mL) a été ajoutée une solution de KHMDS 0.5 M dans du toluène (3.10 mL, 1.55 mmol). 18 h plus tard, KHMDS (850 μ L, 0.420 mmol) on été ajoutés et 6 h plus tard, une solution saturée de NH₄Cl a été ajoutée, puis le THF a été évaporé sous pression réduite. La phase aqueuse a été extraite avec AcOEt et cette phase organique a été lavée avec une solution de thiosulfate de sodium 1 M, puis séchée sur Na₂SO₄ avant d'être évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (1.5% MeOH dans CH₂Cl₂) pour donner le composé **2.57** (1.47 g, 68%); R_f 0.7 (CHCl₃:AcOEt:MeOH, 20:5:3); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.60-7.10 (m, 30H), 6.25 (s, large, 1H), 5.92 (m, 2H), 5.53-5.25 (m, 2H), 5.17-4.76 (m, 13H), 4.36-3.00 (m, 23H), 2.20 (m, 1H), 1.30 (m, 1H), 0.83 (s, 9H), 0.01 (s, 6H); *m/z* calculée pour C₇₉H₉₇N₅O₂₄Si [M+H]⁺: 1528.63710, SM trouvée: 1528.8, SMHR trouvée: 1528.63473.

Le spectre RMN ¹H du composé **2.57** est disponible à la Figure B2 de l'Annexe B.

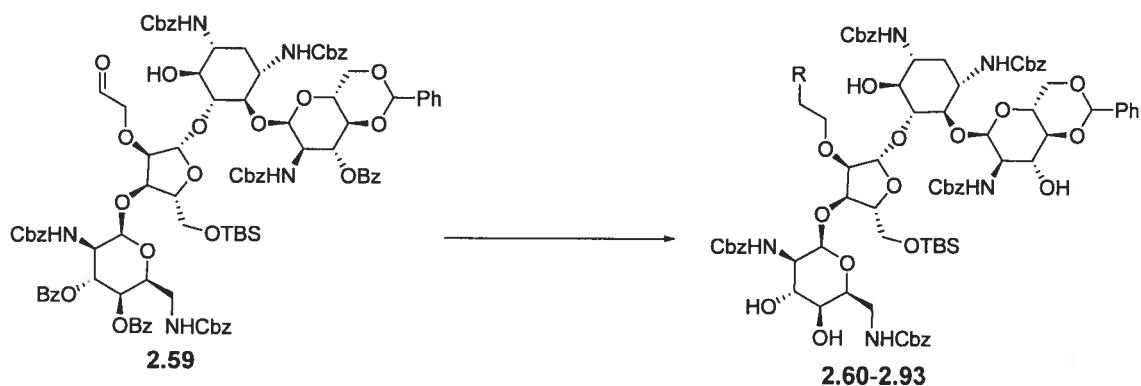


4-*O*-[3-*O*-Benzoyl-4,6-*O*-benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(3,4-di-*O*-benzoyl-2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-*O*-allyl-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl- β -D-ribofuranosyl]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.58). Le chlorure de benzoyle (1.14 mL, 9.81 mmol) a été ajouté à une solution du composé **2.57** (5.30 g, 3.46 mmol) dans de la pyridine (100 mL). 16 h plus tard, de l'eau (5 mL) a été ajoutée et les solvants ont été évaporés sous pression réduite. Le résidu a été dissout dans AcOEt et la phase organique a été lavée avec une solution de HCl 0.5 M et avec une solution saturée de NaHCO₃, puis séchée sur Na₂SO₄ et évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (AcOEt:hexane 2:3) pour fournir le composé **2.58** (5.65 g, quant.). R_f 0.6 (1:1 AcOEt:hexane); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.25-7.81 (m, 10H), 7.73-7.10 (m, 37H), 6.30-3.00 (m, 44H), 2.42 (m, 1H), 1.81-1.46 (m, 1H), 0.83 (m, 9H), 0.01 (m, 6H); *m/z* calculée pour C₁₀₀H₁₀₉N₅O₂₇Si [M+H]⁺: 1840.71574, SM trouvée: 1840.9, SMHR trouvée: 1840.72060.

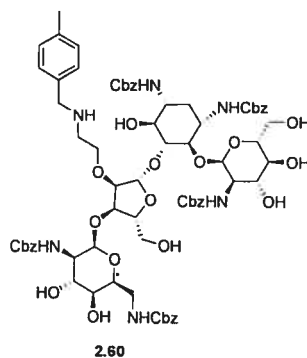
Le spectre RMN ¹H du composé **2.58** est disponible à la Figure B3 de l'Annexe B.



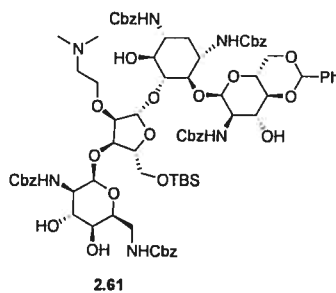
4-*O*-[3-*O*-Benzoyl-4,6-*O*-benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(3,4-di-*O*-benzoyl-2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-(2-éthanal)- β -D-ribofuranosyl]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.59). Le composé **2.58** (2.01 g, 1.09 mmol) a été dissout dans CH₂Cl₂ (60 mL) et refroidi à -78 °C. De l'ozone a été bullé dans le ballon jusqu'à ce que la solution devienne bleue pâle et 1 h plus tard de l'argon a été bullé dans le ballon pour enlever l'excès d'ozone. Par la suite, Me₂S (800 μ L, 13.8 mmol) a été ajouté et la solution a été réchauffée à TP. 2 h plus tard, le solvant a été évaporé sous pression réduite et le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (AcOEt:hexane 2:3) pour donner l'aldéhyde **2.59** (1.63 g, 80%) qui a été utilisé rapidement. R_f 0.4 (1:1 AcOEt:hexane); *m/z* calculée pour C₉₉H₁₀₇N₅O₂₈Si [M+H]⁺: 1842.7, SM trouvée 1842.9.



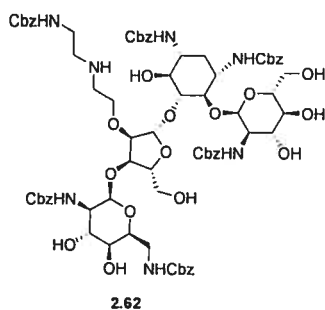
Procédure générale pour les aminations réductrices suivies du traitement avec le méthanolate de sodium (2.60-2.93) : L'aldéhyde **2.59** (80 mg, 0.043 mmol) ainsi que l'amine appropriée (0.13 mmol) ont été dissouts dans MeOH (3 mL). Par la suite, AcOH (0.1 mL) suivi d'une solution 0.1 M de NaBH₃CN dans THF (60 μL, 0.060 mmol) ont été ajoutés. Le lendemain matin, une CCM a indiquée que l'aldéhyde était complètement consommé. Une solution fraîchement préparée de MeONa dans MeOH a été ajoutée tranquillement jusqu'à ce que le pH atteigne 10.5. La solution a été agitée jusqu'à ce qu'un spectre de masse indique que la réaction était terminée (généralement 24 à 36h). La solution a été refroidie à -78 °C et de la glace sèche a été ajoutée jusqu'à ce que le pH soit neutre. Le résidu a été dissout dans AcOEt et la phase organique a été lavée avec une solution de HCl 0.5 M et avec une solution saturée de NaHCO₃. La phase organique a été séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair pour donner les composés **2.60-2.93**.



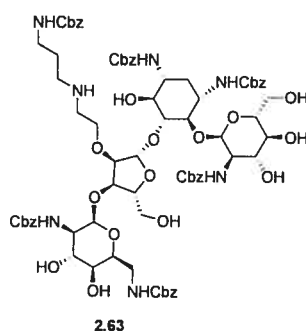
4-*O*-[2-Benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-*O*-{2-*N*-(4-méthylphénylméthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.60). Purifié seulement après un traitement avec AcOH:H₂O (4:1) pour hydrolyser le TBS et le benzylidène. (64%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +11.3° (c 0.8, MeOH); R_f 0.2 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₇₃H₈₈N₆O₂₄ [M+H]⁺: 1433.6, SM trouvée: 1433.4.



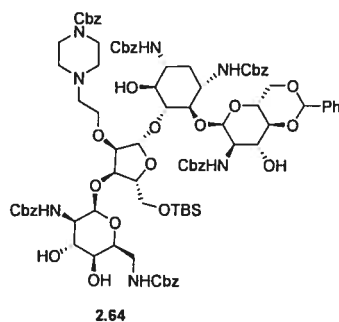
4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-{2,2-*N*-diméthylaminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.61). (91%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +10.9° (c 0.8, MeOH); R_f 0.2 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₈₀H₁₀₂N₆O₂₄Si [M+H]⁺: 1559.7, SM trouvée: 1560.5.



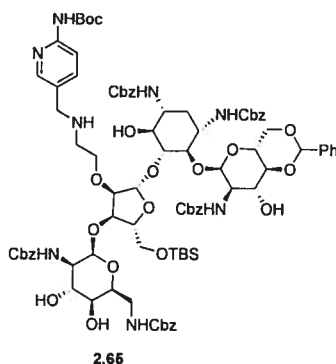
4-O-[{2-Benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5-O-{3-O-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-{2-N-(2-benzyloxycarbonylaminoéthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di-N-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.62). Purifié seulement après un traitement avec AcOH:H₂O (4:1) pour hydrolyser le TBS et le benzylidène. (67%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 5 à 7% MeOH dans CH₂Cl₂; R_f 0.1 (10% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₇₅H₉₁N₇O₂₆ [M+H]⁺: 1506.6, SM trouvée: 1506.5.



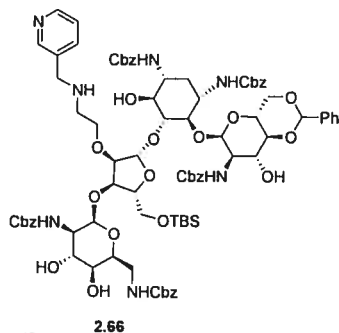
4-O-[{2-Benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5-O-{3-O-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-{2-N-(3-benzyloxycarbonylaminopropyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di-N-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.63). Purifié seulement après un traitement avec AcOH:H₂O (4:1) pour hydrolyser le TBS et le benzylidène. (71%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 5 à 7% MeOH dans CH₂Cl₂; R_f 0.1 (10% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₇₆H₉₃N₇O₂₆ [M+H]⁺: 1520.6, SM trouvée: 1520.7.



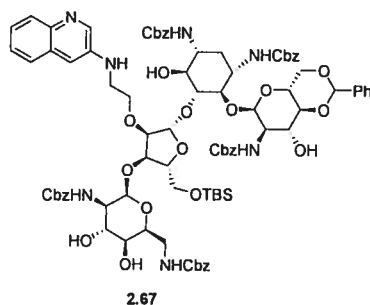
4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-{2-(4-benzyloxycarbonylpiperazyl)-éthyl}- β -D-ribofuranosyl]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.64). (89%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +17.6° (c 0.4, MeOH); R_f 0.3 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₉₀H₁₁₁N₇O₂₆Si [M+H]⁺: 1734.7, SM trouvée: 1735.1.



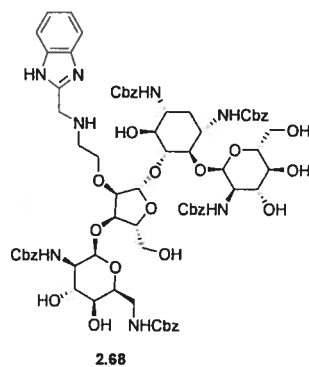
4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-{2-*N*-(5-méthyl-2-*tert*-buyloxycarbonylaminopyridyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.65). (87%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +17.2° (c 1.3, MeOH); R_f 0.1 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₈₉H₁₁₂N₈O₂₆Si [M+H]⁺: 1737.8, SM trouvée: 1738.2.



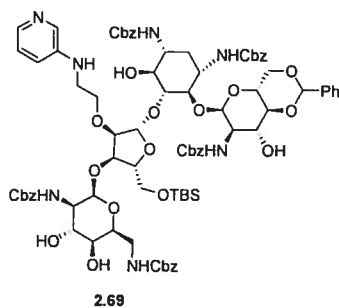
4-O-[[4,6-O-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-O-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-O-{2-*N*-(3-méthylpyridyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.66). (87%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +16.6° (c 1.1, MeOH); R_f 0.2 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₈₅H₁₀₄N₆O₂₄Si [M+H]⁺: 1621.7, SM trouvée: 1622.1.



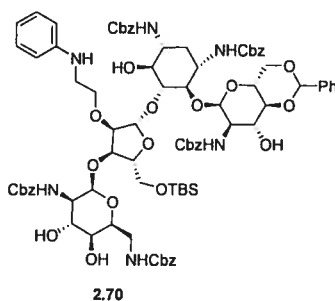
4-O-[[4,6-O-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-O-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-O-{2-*N*-(3-quinolyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.67). (79%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +15.6° (c 1.2, MeOH); R_f 0.2 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₈₇H₁₀₃N₇O₂₄Si [M+H]⁺: 1658.7, SM trouvée: 1657.7.



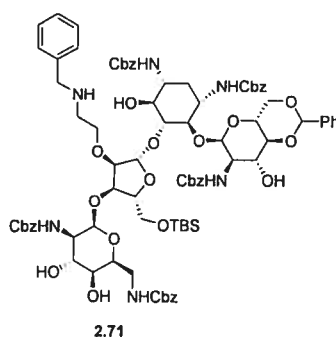
4-O-[[2-Benzoyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-dibenzoyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-{2-N-(1-méthylbenzimidazolyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di-N-benzoyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.68). Purifié seulement après un traitement avec AcOH:H₂O (4:1) pour hydrolyser le TBS et le benzylidène. (67%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 6 à 8% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +7.3° (c 1.6, MeOH); R_f 0.2 (10% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₇₃H₈₆N₈O₂₄ [M+H]⁺: 1459.6, SM trouvée: 1459.7.



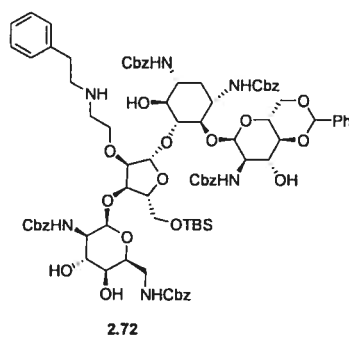
4-O-[[4,6-O-Benzylidène-2-benzoyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-dibenzoyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-O-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-O-{2-N-(3-pyridyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di-N-benzoyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.69). (85%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +8.9° (c 1.4, MeOH); R_f 0.2 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₈₃H₁₀₁N₇O₂₄Si [M+Na]⁺: 1630.7, SM trouvée: 1630.8.



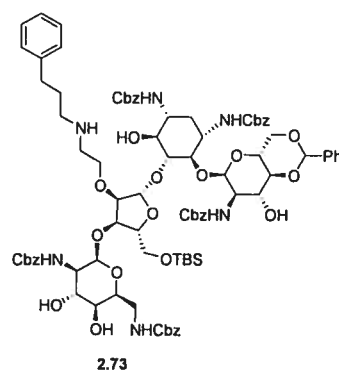
4-O-[[4,6-O-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy-α-D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy-α-L-idopyranosyl)-5-O-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-O-{2-N-(phényl)-aminoéthyl}-β-D-ribofuranosyl}]-1,3-di-N-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.70). (82%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +21.3° (c 1.2, MeOH); R_f 0.2 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₈₄H₁₀₂N₆O₂₄Si [M+H]⁺: 1607.7, SM trouvée: 1608.9.



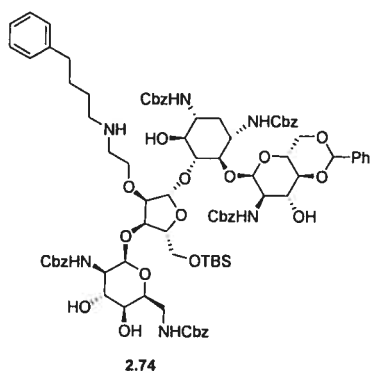
4-O-[[4,6-O-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy-α-D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy-α-L-idopyranosyl)-5-O-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-O-{2-N-(benzyl)-aminoéthyl}-β-D-ribofuranosyl}]-1,3-di-N-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.71). (78%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +6.3° (c 0.7, MeOH); R_f 0.15 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₈₅H₁₀₄N₆O₂₄Si [M+H]⁺: 1621.7, SM trouvée: 1621.8.



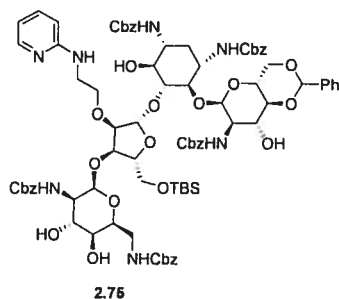
4-O-[[4,6-O-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-O-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-O-{2-N-(2-phényléthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di-N-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.72). (82%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; $[\alpha]_D +10.9^\circ$ (c 1.0, MeOH); R_f 0.2 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₈₆H₁₀₆N₆O₂₄Si [M+H]⁺: 1635.7, SM trouvée: 1636.0.



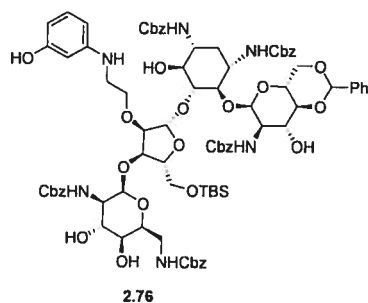
4-O-[[4,6-O-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-O-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-O-{2-N-(3-phénylpropyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di-N-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.73). (90%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; $[\alpha]_D +14.7^\circ$ (c 1.0, MeOH); R_f 0.2 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₈₇H₁₀₈N₆O₂₄Si [M+Na]⁺: 1671.7, SM trouvée: 1671.9.



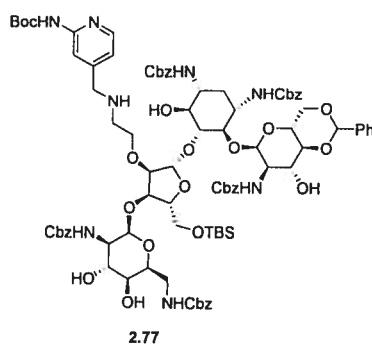
4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-{2-*N*-(4-phénylpropyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl]}-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.74). (86%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +12.8° (c 0.9, MeOH); R_f 0.2 (5% MeOH dans CH₂Cl₂). *m/z* calculée pour C₈₈H₁₁₀N₆O₂₄Si [M+Na]⁺: 1685.7, SM trouvée: 1686.1.



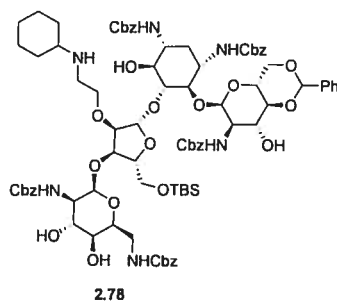
4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-{2-*N*-(2-pyridyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl]}-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.75). (85%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +10.4° (c 0.8, MeOH); R_f 0.2 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₈₃H₁₀₁N₇O₂₄Si [M+H]⁺: 1608.7, SM trouvée: 1608.8.



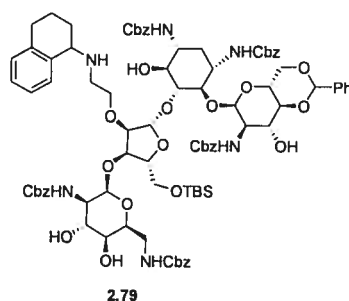
4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-{2-*N*-(3-hydroxyphényl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.76). (78%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; $[\alpha]_D +17.3^\circ$ (c 1.2, MeOH); R_f 0.1 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); m/z calculée pour C₈₄H₁₀₂N₆O₂₅Si $[M+H]^+$: 1623.7, SM trouvée: 1623.8.



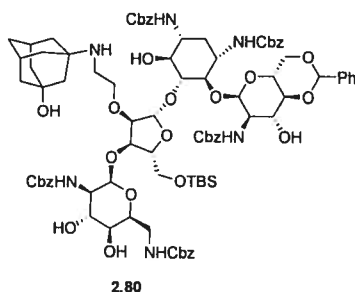
4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-{2-*N*-(4-méthyl-2-*tert*-butyloxycarbonylaminopyridyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.77). (81%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; $[\alpha]_D +13.8^\circ$ (c 1.0, MeOH); R_f 0.1 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); m/z calculée pour C₈₉H₁₁₂N₈O₂₆Si $[M+H]^+$: 1737.7, SM trouvée: 1737.9.



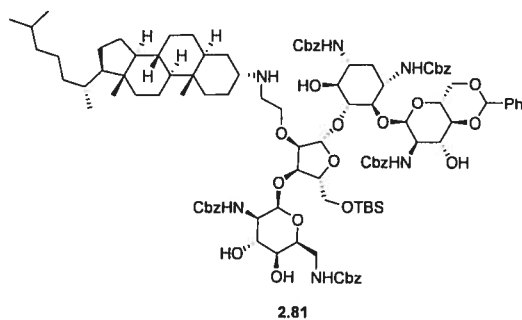
4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-{2-*N*-(cyclohexyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.78). (80%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +5.7° (c 0.8, MeOH); R_f 0.1 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₈₄H₁₀₈N₆O₂₄Si [M+H]⁺: 1613.7, SM trouvée: 1614.9.



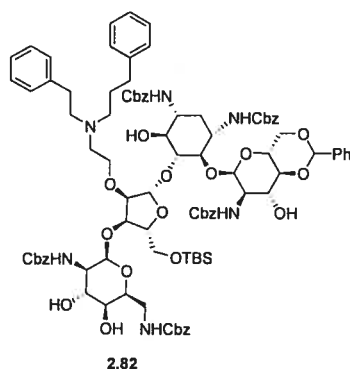
4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-{2-*N*-(1-(1,2,3,4-tétrahydronaphtyl))-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.79). (80%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +15.6° (c 1.0, MeOH); R_f 0.2 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₈₈H₁₀₈N₆O₂₄Si [M+H]⁺: 1661.7, SM trouvée: 1661.6.



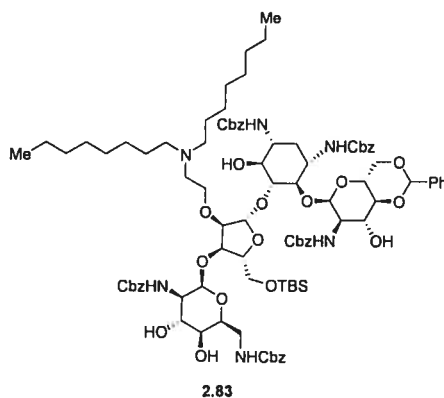
4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-{2-*N*-(3-hydroxyadamantyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.80). (91%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +14.3° (c 1.0, MeOH); R_f 0.1 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₈₈H₁₁₂N₆O₂₅Si [M+H]⁺: 1681.8, SM trouvée: 1681.6.



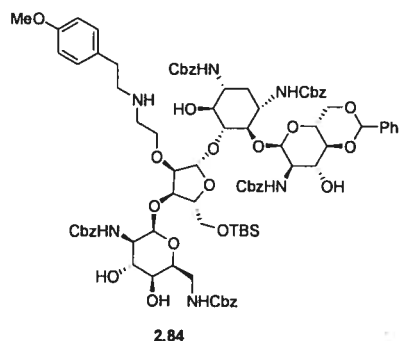
4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-{2-*N*-((3*R*)-3-amino-3-déoxydihydrocholesterol)-éthyl}- β -D-ribofuranosyl]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.81). (87%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 4% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +12.2° (c 1.0, MeOH); R_f 0.3 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₁₀₅H₁₄₄N₆O₂₄Si [M+H]⁺: 1902.0, SM trouvée: 1902.2.



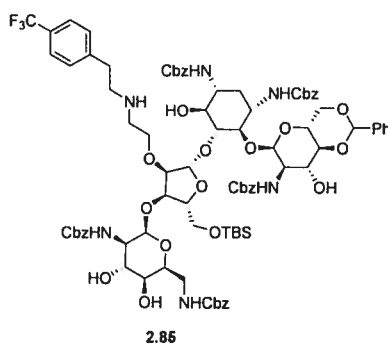
4-O-[[4,6-O-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-O-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-O-{2-N-(2-phényléthyl)-2-N-(3-phénylpropyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di-N-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.82). (88%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +15.2⁰ (c 1.0, MeOH); R_f 0.3 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₉₅H₁₁₈N₆O₂₄Si [M+H]⁺: 1753.8, SM trouvée: 1754.1.



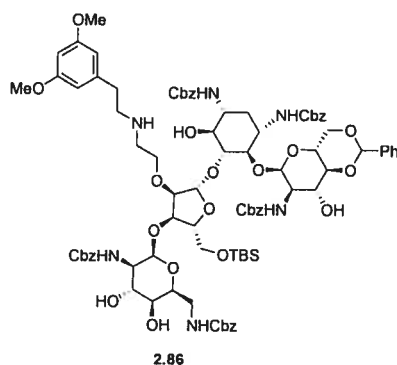
4-O-[[4,6-O-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-O-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-O-{2,2-N-dioctylaminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di-N-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.83). (85%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +21.7⁰ (c 1.1, MeOH); R_f 0.4 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₉₄H₁₃₀N₆O₂₄Si [M+H]⁺: 1755.9, SM trouvée: 1756.3.



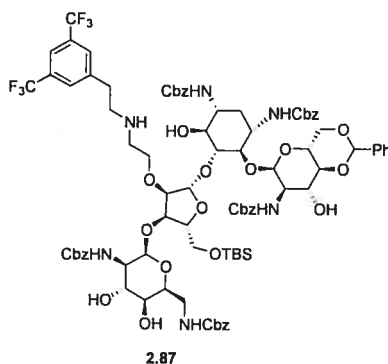
4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-{2-*N*-(2-(4-méthoxy)-phényléthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.84). (83%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; $[\alpha]_D +8.4^\circ$ (c 0.8, MeOH); R_f 0.2 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); m/z calculée pour C₈₇H₁₀₈N₆O₂₅Si [M+H]⁺: 1665.7, SM trouvée: 1665.6.



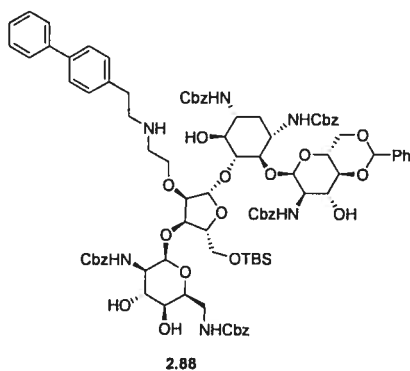
4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-{2-*N*-(2-(4-trifluorométhyl)-phényléthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.85). (94%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; $[\alpha]_D +13.8^\circ$ (c 0.8, MeOH); R_f 0.2 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); m/z calculée pour C₈₇H₁₀₅F₃N₆O₂₄Si [M+H]⁺: 1703.7, SM trouvée: 1703.5.



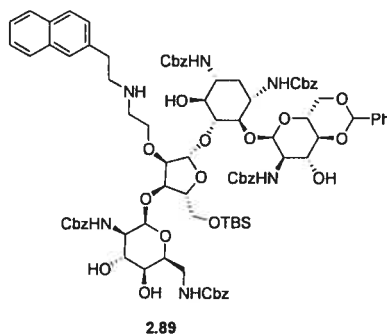
4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-{2-*N*-(2-(3,5-diméthoxy)-phényléthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.86). (84%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +14.9° (c 1.0, MeOH); R_f 0.15 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₈₈H₁₁₀N₆O₂₆Si [M+H]⁺: 1695.7, SM trouvée: 1695.9.



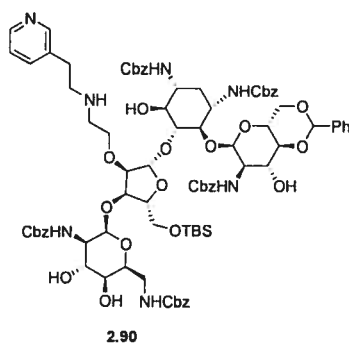
4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-{2-*N*-(2-(3,5-trifluorométhyl)-phényléthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.87). (85%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +14.6° (c 1.1, MeOH); R_f 0.2 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₈₈H₁₀₄F₆N₆O₂₄Si [M+H]⁺: 1771.7, SM trouvée: 1771.5.



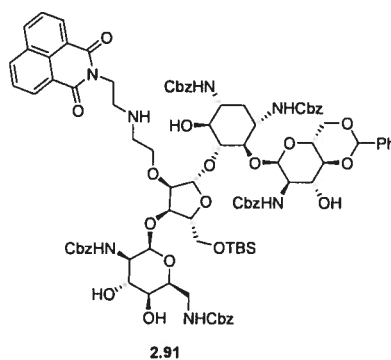
4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-{2-*N*-(2-(4-phényl)-phényléthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.88). (81%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +11.7° (c 0.8, MeOH); R_f 0.15 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₉₂H₁₁₀N₆O₂₄Si [M+H]⁺: 1711.7, SM trouvée: 1711.7.



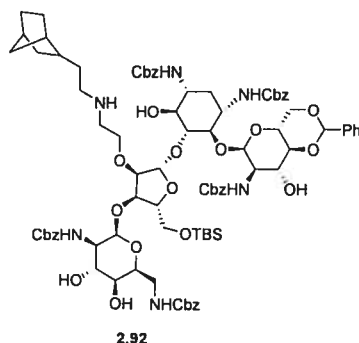
4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-{2-*N*-(2-(2-naphtyl)-éthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.89). (87%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +12.7° (c 0.9, MeOH); R_f 0.2 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₉₀H₁₀₈N₆O₂₄Si [M+H]⁺: 1684.7, SM trouvée: 1685.8.



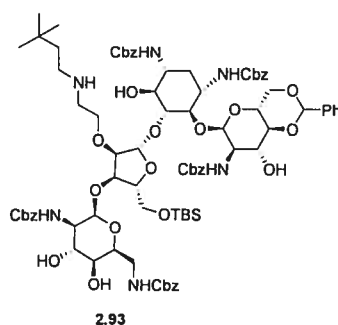
4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucofuranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-{2-*N*-(2-(3-pyridyl)-éthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.90). (78%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; $[\alpha]_D +10.3^\circ$ (c 1.1, MeOH); R_f 0.15 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); m/z calculée pour C₈₅H₁₀₆N₇O₂₄Si [M+H]⁺: 1636.7, SM trouvée: 1636.8.



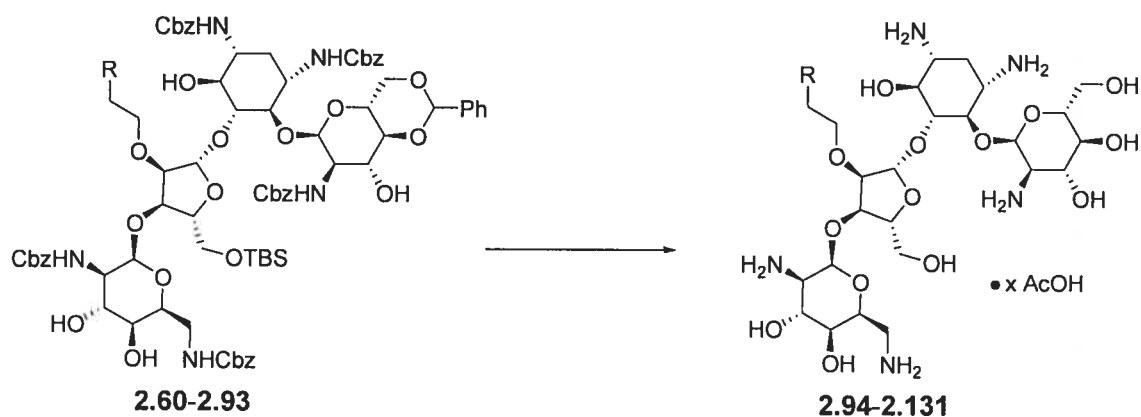
4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucofuranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-{2-éthyl(1,8-naphthalimidyl)- β -D-ribofuranosyl]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.91). (75%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; $[\alpha]_D +11.8^\circ$ (c 0.8, MeOH); R_f 0.1 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); m/z calculée pour C₉₂H₁₀₇N₇O₂₆Si [M+H]⁺: 1754.7, SM trouvée: 1755.7.



4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-{2-*N*-(2-(2-norbornyl)éthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.92). (73%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +13.7° (c 1.0, MeOH); R_f 0.2 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₈₇H₁₁₂N₆O₂₄Si [M+H]⁺: 1653.8, SM trouvée: 1653.7.

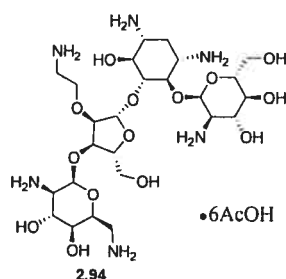


4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-{2-*N*-(3,3-diméthylbutyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.93). (72%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +16.9° (c 1.2, MeOH); R_f 0.1 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₈₄H₁₁₀N₆O₂₄Si [M+H]⁺: 1615.7, SM trouvée: 1615.8.

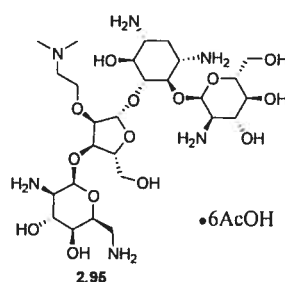


Procédure générale pour les déprotections (2.94-2.131):

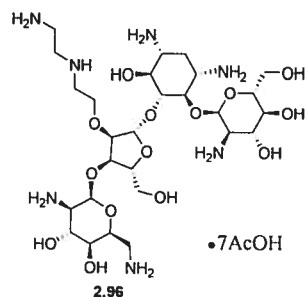
Le substrat de départ **2.60-2.93** a été dissout dans AcOH:H₂O (4:1, 5 mL) puis cette solution a été chauffée à 60 °C jusqu'à ce qu'un spectre de masse indique que le substrat de départ était complètement converti au produit avec le TBS et le benzylidène hydrolysés (généralement 2 à 5 h). La solution a été refroidie à TP et une quantité catalytique (environ 20 mol%) d'hydroxyde de palladium 20% sur charbon a été ajoutée. Le mélange a été laissé sous agitation pendant 3 à 6 h sous 1 atm de H₂, puis un spectre de masse a indiqué que la réaction était terminée. Le mélange a été filtré sur un lit de célite, concentré sous pression réduite et le filtrat a été évaporé sous pression réduite. Le résidu a été lavé avec un minimum de CH₂Cl₂ (1 mL, 2 fois) puis dissout dans un minimum de H₂O et lyophilisé pour donner les composés **2.94-2.131**.



4-O-[{2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5-O-{3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-(2-aminoéthyl)- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.94). (78%); $[\alpha]_D +10.6^\circ$ (c 0.7, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 5.78 (m, 1H), 5.46 (m, 1H), 5.26 (m, 1H), 4.30-4.00 (m, 6H), 3.95-3.50 (m, 14H), 3.45-3.00 (m, 6H), 2.35 (m, 1H), 1.91 (s, 18H), 1.71 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 181.7, 110.2, 97.3, 95.7, 86.2, 82.3, 77.8, 76.0, 74.7, 73.9, 72.6, 70.8, 69.4, 69.3, 68.2, 67.6, 61.4, 60.5, 58.8, 54.9, 52.6, 52.1, 49.3, 48.1, 42.3, 27.6, 23.4; *m/z* calculée pour C₂₅H₅₀N₆O₁₄ [M+H]⁺: 659.34633, SM trouvée: 659.4, SMHR trouvée: 659.34410.

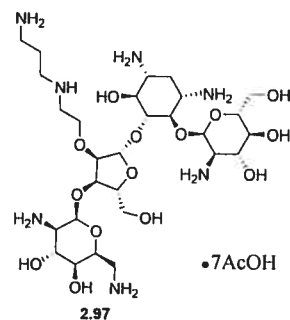


4-O-[{2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5-O-{3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-{2,2-N-diméthylaminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.95). (80%); $[\alpha]_D +7.3^\circ$ (c 0.6, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 5.76 (m, 1H), 5.46 (m, 1H), 5.26 (m, 1H), 4.62 (m, 1H), 4.41-4.04 (m, 5H), 3.90-3.50 (m, 14H), 3.45-3.20 (m, 6H), 2.9 (s, 6H) 2.33 (m, 1H), 1.88 (s, 18H), 1.70 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 182.0, 108.8, 96.7, 95.6, 85.8, 81.4, 81.2, 78.9, 74.3, 74.2, 73.9, 71.2, 69.9, 69.8, 68.5, 68.0, 64.9, 60.9, 59.9, 57.5, 54.7, 51.7, 50.9, 49.6, 43.6 (2C), 41.1, 30.2, 23.9; *m/z* calculée pour C₂₇H₅₄N₆O₁₄ [M+H]⁺: 687.37763, SM trouvée: 687.4, SMHR trouvée: 687.37907.



4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-{2-N-(2-aminoéthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.96). (75%); $[\alpha]_D +8.8^\circ$ (c 0.6, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 5.75 (m, 1H), 5.44 (m, 1H), 5.20 (m, 1H), 4.30-4.00 (m, 6H), 3.85-3.50 (m, 12H), 3.40-3.15 (m, 6H), 3.00-2.55 (m, 6H) 2.31 (m, 1H), 1.91 (s, 21H), 1.63 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 181.9, 109.8, 96.7, 96.3, 86.2, 81.5, 81.0, 75.3, 73.8, 73.3, 70.9, 70.4, 69.7, 68.4, 67.9, 61.2, 60.6, 60.4, 54.7, 51.6, 50.7, 49.9, 41.4, 39.4, 31.9, 32.7, 28.5, 28.1, 23.7; *m/z* calculée pour C₂₇H₅₅N₇O₁₄ [M+H]⁺: 702.38852, SM trouvée: 702.4, SMHR trouvée: 702.38698.

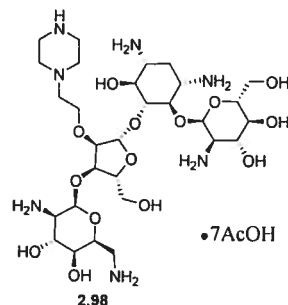
Le spectre RMN ¹H du composé **2.96** est disponible à la Figure B4 de l'Annexe B.



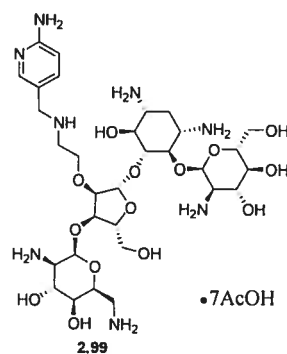
4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-{2-N-(3-aminopropyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.97). (80%); $[\alpha]_D +5.7^\circ$ (c 0.4, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 5.72 (m, 1H), 5.44 (m, 1H), 5.21 (m, 1H), 4.59 (m, 1H), 4.20-4.00 (m, 5H), 3.95-3.50 (m, 12H), 3.45-2.7 (m, 14H), 2.26 (m, 1H), 1.87 (s, 21H), 1.59 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 182.2, 108.9, 96.8, 96.0, 86.0, 81.8, 79.8, 74.5, 74.3, 71.3, 71.2, 70.1, 68.6, 68.2, 67.5, 61.0, 54.8, 51.8, 51.1, 50.3, 49.8, 48.8, 45.5, 43.7, 41.1,

37.3, 31.1, 27.4, 24.5, 24.0; m/z calculée pour $C_{28}H_{57}N_7O_{14}$ $[M+H]^+$: 716.40417, SM trouvée: 716.4, SMHR trouvée: 716.40380.

Le spectre RMN 1H du composé **2.97** est disponible à la Figure B5 de l'Annexe B.

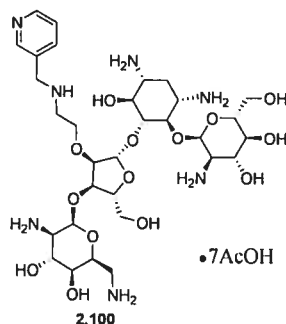


4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-(2-piperazyl-éthyl)- β -D-ribofuranosyl]-2-déoxystreptamine (2.98). (85%); $[\alpha]_D +14.5^\circ$ (c 0.7, H_2O); 1H NMR (400 MHz, D_2O), δ (ppm): 5.70 (m, 1H), 5.35 (m, 1H), 5.12 (m, 1H), 4.49 (m, 1H), 4.30-4.00 (m, 5H), 3.95-3.40 (m, 14H), 3.45-3.05 (m, 10H), 2.68 (m, 4H), 2.26 (m, 1H), 1.87 (s, 21H), 1.62 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O), δ (ppm): 181.6, 108.9, 96.6, 95.9, 87.5, 81.6, 78.5, 74.6, 74.5, 73.7, 71.2, 70.0, 69.8, 68.5, 68.1, 68.0, 61.0, 60.6, 57.2, 54.7, 51.8, 51.1, 50.8, 50.2 (2C), 49.7, 43.6 (2C), 41.1, 31.1, 23.6; m/z calculée pour $C_{29}H_{58}N_7O_{14}$ $[M+H]^+$: 728.40417, SM trouvée: 728.3, SMHR trouvée: 728.40202.

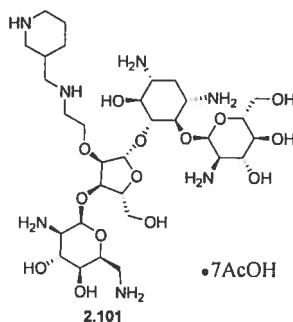


4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-{2-N-(5-méthyl-2-aminopyridyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl]-2-déoxystreptamine (2.99). (75%); $[\alpha]_D +5.6^\circ$ (c 0.3, H_2O); 1H NMR (400 MHz, D_2O), δ (ppm): 7.91 (m, 1H), 7.45 (m, 1H), 6.65 (m, 1H), 5.67 (m, 1H), 5.32 (m, 1H), 5.10 (m, 1H), 4.51 (m, 1H), 4.15-4.00 (m, 5H), 3.76-3.50 (m, 12H), 3.41-3.16

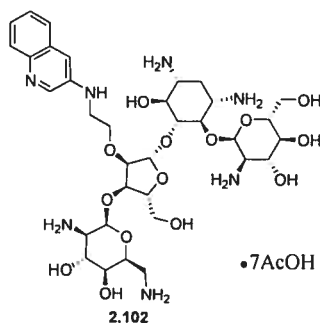
(m, 10H), 2.32 (m, 1H), 1.81 (s, 21H), 1.65-1.50 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O), δ (ppm): 180.8, 157.6, 116.31, 142.7, 136.2, 112.3, 108.5, 96.2, 95.1, 85.2, 82.1, 81.1, 80.8, 77.5, 74.0, 73.8, 73.0, 70.7, 69.4, 69.2, 67.9, 67.6, 65.5, 60.5, 59.5, 54.1, 51.1, 50.3, 49.0, 46.6, 40.6, 28.8, 23.2; m/z calculée pour $\text{C}_{31}\text{H}_{56}\text{N}_8\text{O}_{14}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 765.39942, SM trouvée: 765.6, SMHR trouvée: 765.39871.



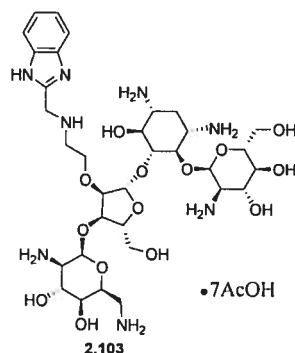
4-*O*-[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-*O*-{2-*N*-(3-méthylpyridyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl]}-2-désoxystreptamine (2.100). (80%); $[\alpha]_{\text{D}} +5.4^\circ$ (c 0.6, H_2O); ^1H NMR (400 MHz, D_2O), δ (ppm): 8.40-8.32 (m, 2H), 7.70-7.30 (m, 2H), 5.71 (m, 1H), 5.38 (m, 1H), 5.16 (m, 1H), 4.55 (m, 1H), 4.20-4.00 (m, 7H), 3.95-3.50 (m, 12H), 3.45-3.15 (m, 8H), 2.32 (m, 1H), 1.81 (s, 21H), 1.60 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O), δ (ppm): 181.4, 150.5, 140.0, 132.8, 129.8, 125.5, 109.0, 96.6, 95.7, 85.7, 81.4, 78.5, 74.3, 73.7, 71.1, 70.3, 69.9, 69.3, 68.5, 68.1, 67.5, 66.3, 61.0, 60.1, 54.6, 51.6, 50.8, 49.6, 46.6, 43.5, 41.1, 29.7, 23.5; m/z calculée pour $\text{C}_{31}\text{H}_{55}\text{N}_7\text{O}_{14}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 750.38852, SM trouvée: 750.4, SMHR trouvée: 750.38473.



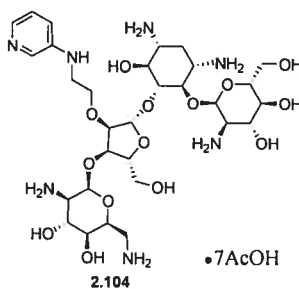
4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-{2-N-(3-méthylpiperidyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.101). (75%); $[\alpha]_D +12.4^\circ$ (c 1.1, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 5.67 (m, 1H), 5.32 (m, 1H), 5.25 (m, 1H), 4.48 (m, 1H), 4.20-4.00 (m, 5H), 3.95-3.30 (m, 14H), 3.30-2.75 (m, 13H), 2.21 (m, 1H), 1.81 (s, 21H), 1.72 (m, 1H), 1.63-1.45 (m, 4H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 180.3, 108.5, 96.2, 95.2, 85.0, 81.1, 80.8, 77.2, 74.1, 72.9, 70.7, 69.4, 69.1, 67.9, 67.5, 60.5, 60.1, 54.1, 51.1, 50.3, 50.2, 49.1, 48.9, 46.1, 44.2, 44.1, 40.6, 30.3, 28.6, 22.7, 22.1, 21.4, 18.2; *m/z* calculée pour C₃₁H₆₁N₇O₁₄ [M+H]⁺: 756.43547, SM trouvée: 756.7, SMHR trouvée: 756.43313.



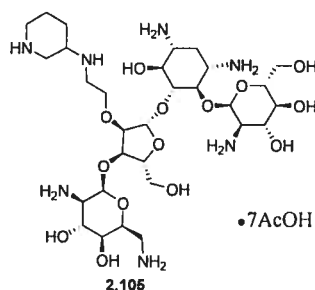
4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-{2-N-(3-quinolyl)-éthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.102). (80%); $[\alpha]_D +7.5^\circ$ (c 0.2, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 8.42 (m, 1H), 7.85 (m, 2H), 7.41 (m, 3H), 5.72 (m, 1H), 5.38 (m, 1H), 5.17 (m, 1H), 4.55 (m, 1H), 4.20-4.00 (m, 5H), 3.95-3.50 (m, 12H), 3.45-3.15 (m, 8H), 2.32 (m, 1H), 1.81 (s, 21H), 1.65-1.40 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 181.8, 143.4, 140.5, 138.4, 130.2, 129.6, 127.3, 126.9, 122.5, 114.6, 109.1, 96.5, 95.6, 85.1, 81.8, 78.5, 75.6, 74.4, 72.8, 70.1, 69.9, 69.6, 68.3, 67.5, 60.9, 60.4, 54.5, 52.6, 51.5, 50.4, 49.5, 41.0, 29.2, 28.0, 23.8; *m/z* calculée pour C₃₄H₅₅N₇O₁₄ [M+H]⁺: 786.38852, SM trouvée: 786.5, SMHR trouvée: 786.38421.



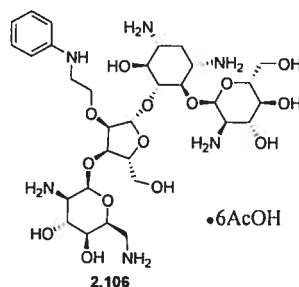
4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-{2-N-(1-méthylbenzimidazolyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.103). (75%); $[\alpha]_D +8.6^\circ$ (c 0.6, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 7.80-7.40 (m, 4H), 5.81 (m, 1H), 5.44 (m, 1H), 5.24 (m, 1H), 4.35-4.10 (m, 6H), 3.95-3.50 (m, 14H), 3.45-3.15 (m, 8H), 2.42 (m, 1H), 1.91 (s, 21H), 1.61 (m, 1H); *m/z* calculée pour C₃₃H₅₆N₈O₁₄ [M+H]⁺: 789.39942, SM trouvée: 789.5, SMHR trouvée: 789.39932.



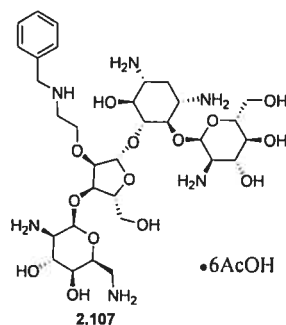
4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-{2-N-(3-méthylpyridyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.104). (75%); $[\alpha]_D +6.8^\circ$ (c 0.4, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 8.00-7.70 (m, 2H), 7.60-7.40 (m, 2H), 5.70 (m, 1H), 5.33 (m, 1H), 5.11 (m, 1H), 4.50 (m, 1H), 4.20-4.00 (m, 5H), 3.85-3.50 (m, 14H), 3.40-3.15 (m, 6H), 2.37 (m, 1H), 1.79 (s, 21H), 1.70 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 181.4, 132.3, 131.6, 129.5, 128.7, 126.8, 108.8, 96.2, 95.3, 85.3, 81.6, 81.0, 78.0, 74.1, 73.1, 71.5, 70.7, 69.6, 69.3, 68.0, 67.7, 60.7, 60.3, 54.2, 51.5, 51.1, 50.3, 49.2, 43.0, 40.7, 29.2, 23.5; *m/z* calculée pour C₃₀H₅₃N₇O₁₄ [M+H]⁺: 736.37287, SM trouvée: 736.5, SMHR trouvée: 736.37359;



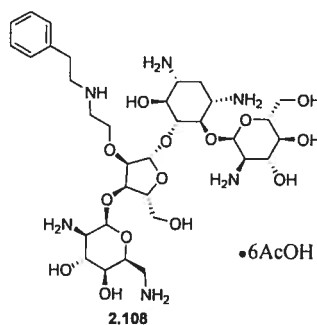
4-*O*-[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-*O*-{2-*N*-(3-piperidyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.105). (70%); $[\alpha]_D +7.8^\circ$ (c 1.0, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 5.66 (m, 1H), 5.30 (m, 1H), 5.11 (m, 1H), 4.46 (m, 1H), 4.20-4.00 (m, 5H), 3.95-3.50 (m, 14H), 3.40-2.95 (m, 11H), 2.37 (m, 1H), 2.1-1.9 (m, 4H) 1.79 (s, 21H), 1.70 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 181.0, 108.9, 96.6, 95.7, 90.9, 85.5, 81.5, 77.7, 74.5, 74.3, 73.3, 71.1, 69.9, 69.5, 68.4, 68.3, 68.0, 61.0, 54.5, 52.4, 51.5, 50.6, 49.4, 44.7, 44.2, 41.0, 40.1, 34.5, 28.9, 23.3 20.9, 20.2; *m/z* calculée pour C₃₀H₅₉N₇O₁₄ [M+H]⁺: 741.41982, SM trouvée: 742.7, SMHR trouvée: 742.41783.



4-*O*-[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-*O*-{2-*N*-(phényl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.106). (80%); $[\alpha]_D +6.7^\circ$ (c 0.5, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 7.22-6.91 (m, 5H), 5.65 (m, 1H), 5.25 (m, 1H), 5.16 (m, 1H), 4.41 (m, 1H), 4.25-4.05 (m, 5H), 3.91-3.55 (m, 12H), 3.44-3.20 (m, 8H), 2.33 (m, 1H), 1.80 (s, 18H), 1.72 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 180.9, 144.7, 129.1 (2C), 119.6, 116.3 (2C), 109.5, 95.7, 94.8, 84.1, 80.7, 78.1, 74.5, 74.6, 73.2, 72.8, 72.2, 69.8, 69.5, 68.7, 68.6, 67.2, 66.8, 59.8, 59.5, 53.5, 50.4, 49.5, 48.4, 40.0, 28.8, 22.8; *m/z* calculée pour C₃₁H₅₄N₆O₁₄ [M+H]⁺: 735.37763, SM trouvée: 735.5; SMHR trouvée: 735.37748.

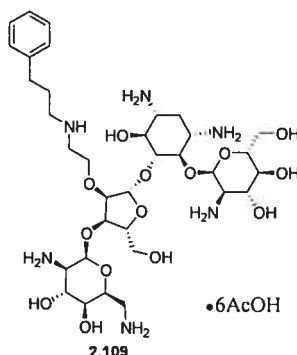


4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-[[3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-[[2-N-(benzyl)-aminoéthyl]- β -D-ribofuranosyl]]]-2-désoxystreptamine (2.107). (85%); $[\alpha]_D +8.5^\circ$ (c 0.4, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 7.33 (m, 5H), 5.67 (m, 1H), 5.32 (m, 1H), 5.08 (m, 1H), 4.48 (m, 1H), 4.16-4.01 (m, 5H), 3.89-3.48 (m, 14H), 3.36-3.16 (m, 8H), 2.31 (m, 1H), 1.91 (s, 18H), 1.65 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 181.5, 131.2, 130.7 (2C), 130.1 (2C), 129.6, 108.9, 96.6, 95.6, 85.6, 81.6, 78.1, 74.5, 74.3, 73.5, 71.2, 69.9, 69.6, 68.4, 68.0, 66.2, 60.9, 60.1, 54.6, 51.8, 51.6, 50.7, 49.5, 47.1, 41.1, 40.1, 29.5, 23.6; *m/z* calculée pour C₃₂H₅₆N₆O₁₄ [M+H]⁺: 749.39328, SM trouvée: 749.6, SMHR trouvée: 749.39319.

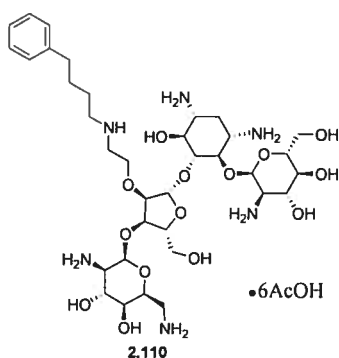


4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-[[3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-[[2-N-(2-phényléthyl)-aminoéthyl]- β -D-ribofuranosyl]]]-2-désoxystreptamine (2.108). (80%); $[\alpha]_D +8.3^\circ$ (c 0.5, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 7.22 (m, 5H), 5.68 (m, 1H), 5.32 (m, 1H), 5.11 (m, 1H), 4.52 (m, 1H), 4.15-4.05 (m, 5H), 3.90-3.54 (m, 12H), 3.35-3.17 (m, 10H), 2.71 (m, 2H), 2.29 (m, 1H), 1.93 (s, 18H), 1.67 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 180.9, 136.6, 129.4 (2C), 129.1 (2C), 127.8, 108.5, 96.2, 95.1, 85.2, 80.9, 80.8, 77.6, 74.0, 73.7, 73.5, 73.0, 70.7, 69.8, 69.4, 68.0, 67.6, 65.7, 60.5, 59.5, 54.1, 51.1, 49.0, 48.7, 47.2, 46.7, 40.6, 29.0,

23.2; m/z calculée pour $C_{33}H_{58}N_6O_{14}$ $[M+H]^+$: 763.40893, SM trouvée: 763.4, SMHR trouvée: 763.40657;

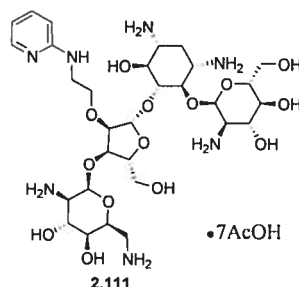


4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-{2-N-(3-phénylpropyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.109). (90%); $[\alpha]_D +11.4^\circ$ (c 0.4, H_2O); 1H NMR (400 MHz, D_2O), δ (ppm): 7.27 (m, 5H), 5.74 (m, 1H), 5.36 (m, 1H), 5.27 (m, 1H), 4.29 (m, 1H), 4.21-4.07 (m, 5H), 3.90-3.14 (m, 22H), 2.70-2.61 (m, 2H), 2.32 (m, 1H) 2.21 (m, 2H), 1.89 (s, 18H), 1.61 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O), δ (ppm): 182.3, 132.8, 129.5 (2C), 129.3 (2C), 126.9, 110.5, 97.6, 97.0, 85.6, 82.0, 81.8, 76.0, 74.5, 74.2, 74.0, 71.3, 71.1, 70.2, 69.1, 68.4, 61.7, 61.1, 55.2, 52.0, 51.2, 50.1, 41.3, 39.7, 33.2, 32.6, 30.7, 29.7, 28.7, 24.1; m/z calculée pour $[M+H]^+$: $C_{34}H_{60}N_6O_{14}$ 777.42458, SM trouvée: 777.6, SMHR trouvée: 777.42090.

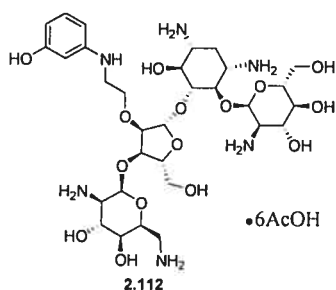


4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-{2-N-(4-phénylbutyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.110). (90%); $[\alpha]_D +9.6^\circ$ (c 0.5, H_2O); 1H NMR (400 MHz, D_2O), δ (ppm): 7.22 (m, 5H), 5.55 (m, 1H), 5.27 (m, 1H), 5.14 (m, 1H), 4.45 (m, 1H), 4.25-

4.08 (m, 5H), 3.81-2.94 (m, 22H), 2.61 (m, 2H), 2.31-2.15 (m, 3H), 1.79 (s, 18H), 1.4-1.65 (m, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O), δ (ppm): 181.8, 143.2, 128.9 (4C), 126.3, 110.1, 96.9, 96.3, 85.2, 81.5, 81.1, 75.4, 73.9, 73.7, 73.6, 70.7, 70.3, 69.7, 68.4, 67.8, 61.2, 60.6, 60.4, 54.7, 51.4, 50.7, 49.6, 40.8, 39.4, 34.9, 31.8, 32.7, 28.3, 28.1, 23.6; m/z calculée pour $\text{C}_{35}\text{H}_{62}\text{N}_6\text{O}_{14}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 791.44023, SM trouvée: 791.7, SMHR trouvée: 791.44394.

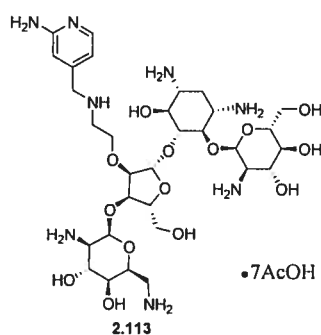


4-*O*-[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-*O*-{2-*N*-(2-pyridyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl]}-2-désoxystreptamine (2.111). (80%); $[\alpha]_{\text{D}} +9.7^\circ$ (c 0.5, H_2O); ^1H NMR (400 MHz, D_2O), δ (ppm): 7.78 (m, 1H), 7.31 (m, 1H), 6.94 (m, 1H), 6.79 (m, 1H), 5.72 (m, 1H), 5.34 (m, 1H), 5.10 (m, 1H), 4.51 (m, 1H), 4.21-4.06 (m, 5H), 3.90-3.46 (m, 14H), 3.39-3.22 (m, 6H), 2.37 (m, 1H), 1.81 (s, 21H), 1.68 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O), δ (ppm): 180.9, 154.1, 144.2, 136.3, 129.6, 113.5, 109.1, 96.5, 95.5, 85.6, 81.7, 81.3, 77.6, 74.6, 74.1, 73.3, 71.1, 69.9, 69.5, 68.4, 68.3, 68.1, 61.0, 60.4, 54.5, 51.6, 50.6, 49.5, 42.4, 41.1, 29.1, 23.3; m/z calculée pour $\text{C}_{30}\text{H}_{53}\text{N}_7\text{O}_{14}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 736.37287, SM trouvée: 736.5, SMHR trouvée: 736.37085.

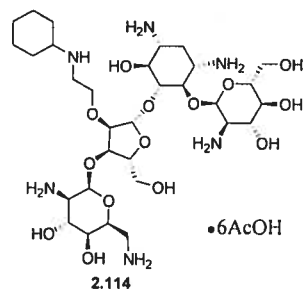


4-*O*-[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-*O*-{2-*N*-(3-hydroxyphényl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl]}-

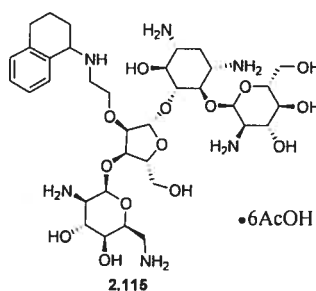
2-déoxystreptamine (2.112). (85%); $[\alpha]_D +7.3^\circ$ (c 0.3, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 6.95 (m, 1H), 6.15-6.05 (m, 3H), 5.67 (m, 1H), 5.24 (m, 1H), 5.13 (m, 1H), 4.41 (m, 1H), 4.28-4.07 (m, 5H), 3.90-3.55 (m, 12H), 3.46-3.11 (m, 8H), 2.34 (m, 1H), 1.79 (s, 18H), 1.67 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 181.7, 156.5, 149.2, 130.8, 129.1, 109.0, 107.5, 105.3, 96.3, 95.6, 85.6, 81.0, 79.1, 73.8, 73.5, 73.2, 70.6, 69.5, 69.2, 68.7, 68.0, 67.9, 67.6, 60.5, 60.3, 54.3, 51.2, 50.4, 49.3, 49.2, 40.6, 29.3, 23.5; *m/z* calculée pour C₃₁H₅₄N₆O₁₅ [M+H]⁺: 751.37254, SM trouvée: 751.6, SMHR trouvée: 751.36768.



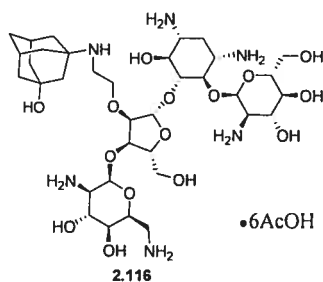
4-O-[[2-Amino-2-déoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-{2-N-(4-méthyl-2-aminopyridyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-déoxystreptamine (2.113). (70%); $[\alpha]_D +10.6^\circ$ (c 0.6, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 7.82 (s, 1H), 7.66 (d, 5Hz, 1H), 6.76 (d, 5Hz, 1H), 5.69 (m, 1H), 5.32 (m, 1H), 5.12 (m, 1H), 4.50 (m, 1H), 4.14-4.04 (m, 5H), 3.85-3.50 (m, 12H), 3.13-3.17 (m, 10H), 2.31 (m, 1H), 1.91 (s, 21H), 1.65 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 180.1, 156.7, 143.5, 142.1, 116.2, 113.0, 108.5, 96.2, 95.1, 85.1, 81.0, 80.9, 77.2, 74.1, 73.8, 72.9, 70.7, 69.4, 69.1, 68.0, 67.5, 66.8, 66.0, 60.5, 59.5, 54.1, 51.1, 49.0, 47.9, 46.7, 40.6, 28.6, 22.6; *m/z* calculée pour C₃₁H₅₆N₈O₁₄ [M+H]⁺: 765.39942, SM trouvée: 765.7, *m/z* calculée pour C₃₁H₅₆N₈O₁₄ [M+Na]⁺: 787.38137, SMHR trouvée: 787.38206.



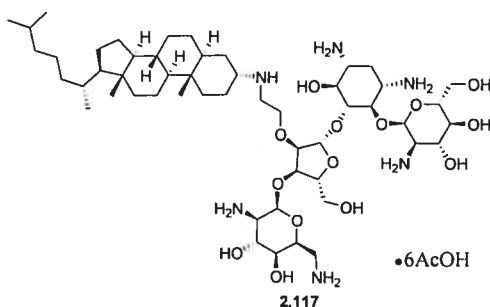
4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-{2-N-(cyclohexyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.114). (85%); $[\alpha]_D +4.9^\circ$ (c 0.3, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 5.68 (m, 1H), 5.26 (m, 1H), 5.17 (m, 1H), 4.42 (m, 1H), 4.28-4.07 (m, 5H), 3.88-3.59 (m, 12H), 3.47-3.19 (m, 8H), 2.70 (m, 1H), 2.34 (m, 1H), 2.1-0.8 (m, 39H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 182.2, 110.2, 98.5, 98.0, 85.2, 82.5, 82.0, 76.0, 75.3, 74.2, 74.0, 72.0, 71.8, 71.6, 70.4, 69.9, 68.8, 61.2, 55.5, 52.4, 52.2, 51.2, 50.4, 50.0, 41.4, 33.3, 31.1 (2C), 25.1, 24.6, 24.2, 24.1 (2C); *m/z* calculée pour C₃₁H₆₀N₆O₁₄ [M+H]⁺: 741.41458, SM trouvée: 741.5, SMHR trouvée: 741.42466.



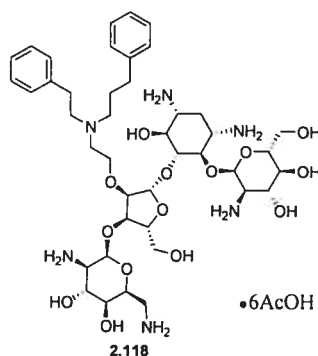
4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-{2-N-(1-(1,2,3,4-tétrahydronaphtyl))-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.115). (90%); $[\alpha]_D +12.6^\circ$ (c 0.8, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 7.22-7.09 (m, 4H), 5.66 (m, 1H), 5.25 (m, 1H), 5.17 (m, 1H), 4.42 (m, 1H), 4.29-4.06 (m, 5H), 3.88-3.55 (m, 12H), 3.44-3.19 (m, 8H), 2.75-2.70 (m, 3H), 2.33 (m, 1H), 2.00-1.84 (m, 4H), 1.78 (s, 18H), 1.70 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 182.1, 139.1, 132.0, 130.7, 129.8, 129.1, 127.3, 110.3, 98.1, 97.5, 85.4, 82.2, 82.0, 76.0, 74.9, 74.2, 74.1, 72.7, 71.6, 71.4, 70.3, 69.5, 68.6, 67.3, 61.2, 61.1, 55.4, 52.2, 51.2, 50.2, 49.8, 41.3, 32.9, 28.8, 28.1, 24.2, 18.6; *m/z* calculée pour C₃₅H₆₀N₆O₁₄ [M+H]⁺: 789.42458, SM trouvée: 789.5, SMHR trouvée: 789.42387.



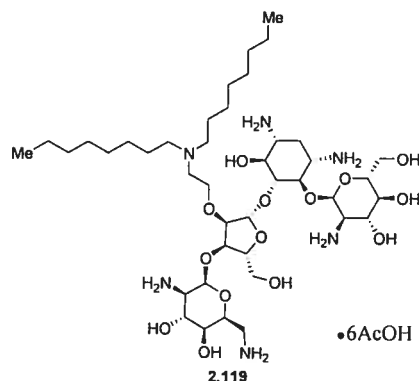
4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-{2-N-(3-hydroxyadamantyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl]-2-déoxystreptamine (2.116). (80%); $[\alpha]_D +7.8^\circ$ (c 0.5, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 5.66 (m, 1H), 5.26 (m, 1H), 5.17 (m, 1H), 4.42 (m, 1H), 4.31-4.04 (m, 5H), 3.88-3.57 (m, 12H), 3.46-3.18 (m, 8H), 2.34 (m, 1H), 2.22 (m, 3H), 1.79 (s, 18H), 1.70-1.66 (m, 4H), 1.57 (m, 6H), 1.44 (m, 3H); *m/z* calculée pour C₃₅H₆₄N₆O₁₅ [M+H]⁺: 809.45079, SM trouvée: 809.4, SMHR trouvée: 809.44818.



4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-{2-N-((3R)-3-amino-3-déoxydihydrocholesterol)-éthyl}- β -D-ribofuranosyl]-2-déoxystreptamine (2.117). (80%); $[\alpha]_D +7.4^\circ$ (c 0.4, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 5.66 (m, 1H), 5.26 (m, 1H), 5.18 (m, 1H), 4.41 (m, 1H), 4.28-4.10 (m, 5H), 3.88-3.54 (m, 12H), 3.47-3.20 (m, 8H), 2.31 (m, 1H), 2.01-0.65 (m, 66H); *m/z* calculée pour C₅₂H₉₆N₆O₁₄ [M+H]⁺: 1029.70628, SM trouvée: 1029.7, SMHR trouvée: 1029.70511.

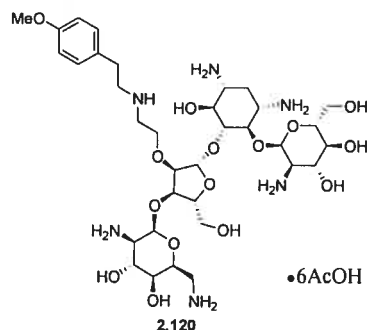


4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-{2-N-(2-phényléthyl)-2-N-(3-phénylpropyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.118). (90%); $[\alpha]_D +11.6^\circ$ (c 0.8, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 7.31-7.23 (m, 10H), 5.74 (m, 1H), 5.36 (m, 1H), 5.27 (m, 1H), 4.29 (m, 1H), 4.21-4.07 (m, 5H), 3.90-3.14 (m, 24H), 2.78-2.69 (m, 4H), 2.35-2.23 (m, 3H), 1.89 (s, 18H), 1.61 (m, 1H); *m/z* calculée pour C₄₂H₇₀N₆O₁₄ [M+H]⁺: 883.50283, SM trouvée: 883.8, SMHR trouvée: 883.49692.

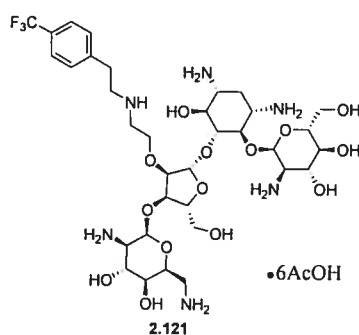


4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-{2,2-N-dioctylaminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.119). (80%); $[\alpha]_D +8.3^\circ$ (c 0.5, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 5.69 (m, 1H), 5.33 (m, 1H), 5.13 (m, 1H), 4.50 (m, 1H), 4.20-4.00 (m, 5H), 3.90-3.52 (m, 12H), 3.41-3.02 (m, 8H), 2.72 (m, 4H), 2.33 (m, 1H), 1.84 (s, 18H), 1.62 (m, 1H), 1.53 (m, 4H), 1.29 (m, 20H) 0.88 (m, 6H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 182.1, 110.3, 98.3, 97.6, 85.4, 82.9, 82.2, 76.3, 75.8, 74.1, 72.1, 71.9, 71.6, 70.7, 69.9, 68.5, 67.8, 62.1, 61.7, 60.8, 56.5, 54.6, 51.5, 50.8 (2C), 50.5, 41.6, 33.7 (2C), 32.4

(2C), 30.8 (2C), 29.7 (2C), 29.1, 28.6 (2C), 24.2, 21.3 (2C), 16.4 (2C); m/z calculée pour $C_{41}H_{82}N_6O_{14}$ $[M+H]^+$: 883.59673, SM trouvée: 883.9, SMHR trouvée: 883.59434.

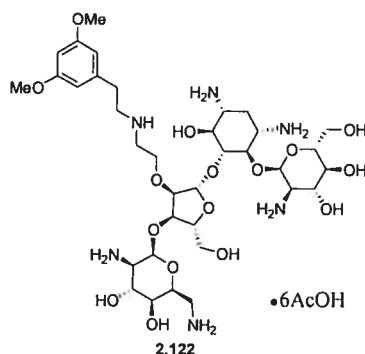


4-O-[(2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl)]-5-O-{3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-{2-N-(2-(4-méthoxy)-phényléthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl]}-2-désoxystreptamine (2.120). (90%); $[\alpha]_D +5.4^\circ$ (c 0.2, H_2O); 1H NMR (400 MHz, D_2O), δ (ppm): 7.13 (s, 2H), 6.85 (m, 2H), 5.66 (m, 1H), 5.26 (m, 1H), 5.17 (m, 1H), 4.42 (m, 1H), 4.28-4.08 (m, 5H), 3.88-3.56 (m, 15H), 3.46-3.20 (m, 10H), 2.81 (m, 2H), 2.34 (m, 1H), 1.79 (s, 18H), 1.72 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O), δ (ppm): 182.2, 158.7, 130.9 (2C), 115.2 (2C), 110.5, 97.5, 96.8, 85.5, 82.0, 81.8, 75.9, 74.4, 74.1, 72.5, 71.2, 70.9, 70.2, 69.0, 68.3, 66.3, 61.1, 61.0, 56.1, 55.9, 55.2, 52.0, 51.2, 50.3, 41.5, 32.6, 32.1, 24.1; m/z calculée pour $[M+H]^+$: $C_{34}H_{60}N_6O_{15}$ 793.41949, SM trouvée: 793.7, SMHR trouvée: 793.41776.

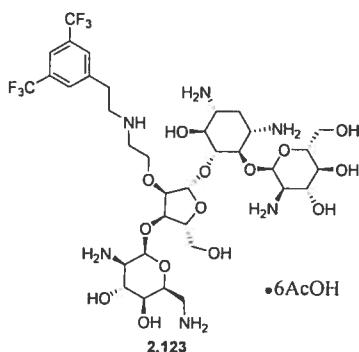


4-O-[(2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl)]-5-O-{3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-{2-N-(2-(4-trifluorométhyl)-phényléthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl]}-2-désoxystreptamine (2.121). (85%); $[\alpha]_D +6.5^\circ$ (c 0.2, H_2O); 1H NMR (400 MHz, D_2O), δ (ppm): 7.57 (s, 2H), 7.35 (m, 2H), 5.66 (m, 1H), 5.25 (m, 1H), 5.16 (m, 1H), 4.41 (m, 1H), 4.29-4.06 (m, 5H), 3.87-3.56 (m, 12H), 3.47-3.15 (m, 10H),

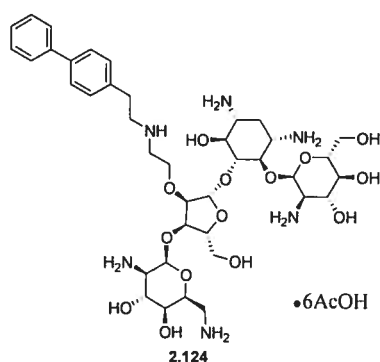
2,94 (m, 2H), 2.33 (m, 1H), 1.79 (s, 18H), 1.68 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O), δ (ppm): 182.2, 141.7, 130.1, 126.5, 110.2, 98.4, 97.8, 85.2, 82.4, 82.0, 76.0, 75.2, 74.1, 74.0, 72.4, 71.9, 71.5, 70.3, 69.8, 68.7, 67.2, 61.2, 55.5, 59.8, 52.3, 51.2, 50.3, 41.3, 41.0, 36.7, 33.4 24.1; m/z calculée pour $[\text{M}+\text{H}]^+$: $\text{C}_{34}\text{H}_{57}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_{14}$ 831.39631, SM trouvée: 831.5, SMHR trouvée: 831.39758.



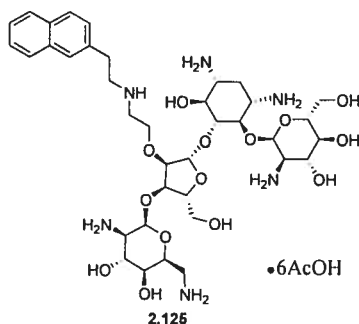
4-*O*-[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-*O*-{2-*N*-(2-(3,5-diméthoxy)-phényléthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl]}-2-désoxystreptamine (2.122). (90%); $[\alpha]_{\text{D}} +11.4^\circ$ (c 0.7, H_2O); ^1H NMR (400 MHz, D_2O), δ (ppm): 6.40 (m, 3H), 5.67 (m, 1H), 5.24 (m, 1H), 5.15 (m, 1H), 4.41 (m, 1H), 4.28-4.07 (m, 5H), 3.90-3.55 (m, 18H), 3.46-3.11 (m, 10H), 2,82 (m, 2H), 2.34 (m, 1H), 1.79 (s, 18H), 1.67 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O), δ (ppm): 181.0, 160.0 (2C), 138.9, 109.4, 106.8 (2C), 98.6, 96.1, 95.3, 84.3, 80.6, 80.2, 74.5, 73.0, 72.8, 71.9, 71.4, 69.9, 69.4, 68.9, 67.6, 67.0, 61.3, 59.8, 59.6, 55.0, 53.8, 50.6, 49.9, 48.7, 40.0, 32.4, 30.8, 22.8; m/z calculée pour $[\text{M}+\text{H}]^+$: $\text{C}_{35}\text{H}_{62}\text{N}_6\text{O}_{16}$ 823.43006, SM trouvée: 823.5, SMHR trouvée: 823.42847.



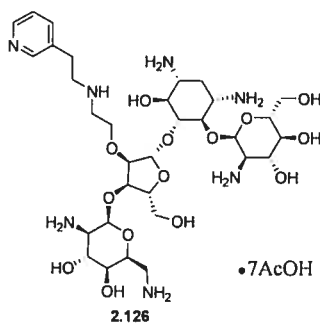
4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-{2-N-(2-(3,5-ditrifluorométhyl)-phényléthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.123). (90%); $[\alpha]_D +5.6^\circ$ (c 0.3, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 7.72 (m, 1H), 7.65 (m, 2H), 5.66 (m, 1H), 5.26 (m, 1H), 5.17 (m, 1H), 4.42 (m, 1H), 4.28-4.08 (m, 5H), 3.88-3.56 (m, 12H), 3.46-3.20 (m, 10H), 2.94 (m, 2H), 2.34 (m, 1H), 1.79 (s, 24H), 1.72 (m, 1H); *m/z* calculée pour C₃₅H₅₆F₆N₆O₁₄ [M+H]⁺: 899.38369, SM trouvée: 899.4, SMHR trouvée: 899.38216.



4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-{2-N-(2-(4-phényl)-phényléthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.124). (85%); $[\alpha]_D +10.8^\circ$ (c 0.6, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 7.57 (m, 2H), 7.42 (m, 2H), 7.31 (m, 5H), 5.69 (m, 1H), 5.32 (m, 1H), 5.12 (m, 1H), 4.5 (m, 1H), 4.14-4.04 (m, 5H), 3.85-3.50 (m, 12H), 3.30-3.17 (m, 10H), 2.78 (m, 2H), 2.31 (m, 1H), 1.91 (s, 18H), 1.65 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 181.2, 138.4, 136.1, 132.7 (2C), 130.9 (2C), 130.0 (2C), 128.4, 127.1 (2C), 126.3, 109.1, 97.6, 95.4, 87.1, 81.5, 80.6, 78.1, 74.8, 74.1, 73.9, 73.4, 71.2, 70.1, 69.4, 68.6, 67.9, 65.7, 60.7, 59.3, 54.7, 53.2, 50.8, 49.4, 48.0, 46.9, 41.5, 29.3, 23.8; *m/z* calculée pour C₃₉H₆₂N₆O₁₄ [M+H]⁺: 839.44023, SM trouvée: 839.5, SMHR trouvée: 839.43844.

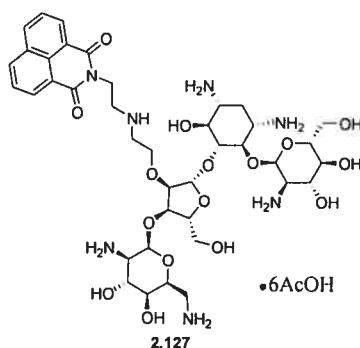


4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-{2-N-(2-(naphthyl)-éthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.125). (80%); $[\alpha]_D +9.2^\circ$ (c 0.5, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 7.82 (m, 3H), 7.66 (m, 1H), 7.47 m, (2H), 7.34 (m, 1H), 5.68 (m, 1H), 5.32 (m, 1H), 5.11 (m, 1H), 4.52 (m, 1H), 4.15-4.05 (m, 5H), 3.90-3.54 (m, 12H), 3.35-3.17 (m, 10H), 2.81 (m, 2H), 2.29 (m, 1H), 1.93 (s, 18H), 1.67 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 182.1, 136.6, 131.7, 130.9, 130.2, 129.7, 129.3, 128.7, 128.2, 127.8, 124.7, 109.6, 97.1, 96.3, 84.3, 81.7, 81.2, 78.2, 74.3, 74.0, 73.6, 73.2, 71.2, 70.4, 69.8, 68.5, 68.0, 66.2, 60.7, 60.1, 54.6, 51.7, 49.5, 49.1, 48.0, 46.9, 41.4, 31.3, 23.7; *m/z* calculée pour C₃₇H₆₀N₆O₁₄ [M+H]⁺: 813.42458, SM trouvée: 813.4, SMHR trouvée: 813.42068.

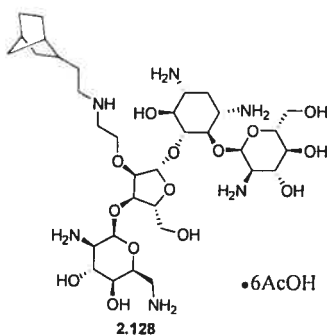


4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-{2-N-(2-(3-pyridyl)-éthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.126). (70%); $[\alpha]_D +7.6^\circ$ (c 0.4, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 8.41-8.42 (m, 2H), 7.92 (d, 4.4Hz, 1H), 7.52 (m, 1H), 5.69 (m, 1H), 5.33 (m, 1H), 5.13 (m, 1H), 4.50 (m, 1H), 4.20-4.00 (m, 7H), 3.90-3.52 (m, 12H), 3.41-3.02 (m, 10H), 2.33 (m, 1H), 1.99 (m, 1H), 1.84 (s, 21H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 179.7, 146.9, 141.8, 134.5, 130.1, 126.2, 109.0, 96.7, 95.6, 85.6, 81.3, 77.7, 74.6, 74.3, 73.4, 71.2, 70.4, 69.9, 69.5, 68.4, 68.0, 67.4, 66.2, 61.0, 60.0, 54.5, 51.6, 50.7,

49.5, 48.4, 47.9, 41.1, 29.4, 22.5; m/z calculée pour $C_{32}H_{57}N_7O_{14}$ $[M+H]^+$: 764.40417, SM trouvée: 764.7, SMHR trouvée: 764.40547.

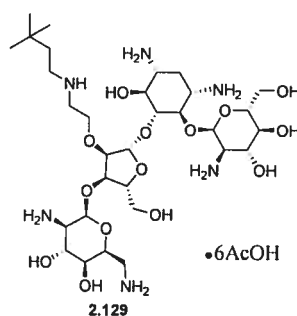


4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-[[3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-[[2-éthyl(1,8-naphthalimidyl)]- β -D-ribofuranosyl]]-2-désoxystreptamine (2.127). (75%); $[\alpha]_D +8.4^\circ$ (c 0.5, H_2O); 1H NMR (400 MHz, D_2O), δ (ppm): 8.61 (d, J 3.5 Hz, 2H), 8.22 (d, J 3.5 Hz, 2H), 7.77 (t, J 7 Hz, 2H), 5.66 (m, 1H), 5.30 (m, 1H), 5.11 (m, 1H), 4.46 (m, 1H), 4.20-4.00 (m, 5H), 3.95-3.50 (m, 12H), 3.40-2.95 (m, 12H), 2.37 (m, 1H), 1.79 (s, 18H), 1.70 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O), δ (ppm): 181.1, 165.4 (2C), 134.8 (2C), 129.7 (2C), 128.4 (2C), 126.4 (2C), 123.6 (2C), 110.7, 96.8, 96.1, 85.0, 82.3, 78.1, 76.1, 74.6, 73.2, 71.3, 70.8, 70.1, 69.7, 68.8, 68.1, 67.6, 61.8, 61.1, 56.7, 54.6, 52.8, 51.7, 51.4, 50.8, 49.5, 41.6, 28.9, 23.4; m/z calculée pour $C_{39}H_{61}N_7O_{16}$ $[M+H]^+$: 882.40965, SM trouvée: 882.5, SMHR trouvée: 882.40762.

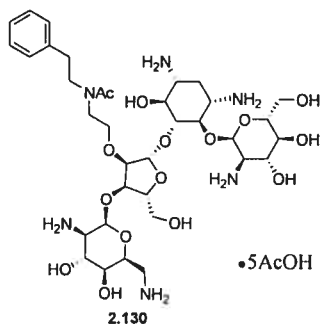


4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-[[3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-[[2-N-(2-(2-norbornyl)éthyl)-aminoéthyl]- β -D-ribofuranosyl]]-2-désoxystreptamine (2.128). (80%); $[\alpha]_D +8.5^\circ$ (c 0.6, H_2O); 1H

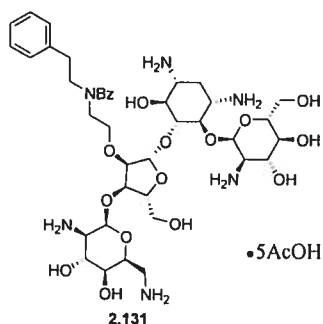
NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 5.66 (m, 1H), 5.26 (m, 1H), 5.18 (m, 1H), 4.41 (m, 1H), 4.28-4.10 (m, 5H), 3.88-3.54 (m, 12H), 3.47-3.20 (m, 8H), 2.82 (m, 2H), 2.36-1.02 (m, 43H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 180.9, 108.5, 96.2, 95.1, 85.2, 80.9, 80.8, 77.6, 74.0, 73.7, 73.5, 73.0, 70.7, 69.8, 69.4, 68.0, 67.6, 65.7, 60.5, 54.1, 51.1, 49.0, 48.7, 47.2, 46.7, 42.4, 40.6, 35.8, 35.1, 32.6, 30.1, 29.7, 29.0, 28.5, 27.9, 23.2; *m/z* calculée pour C₃₄H₆₄N₆O₁₄ [M+H]⁺: 781.45588, SM trouvée: 781.5, SMHR trouvée: 781.45282.



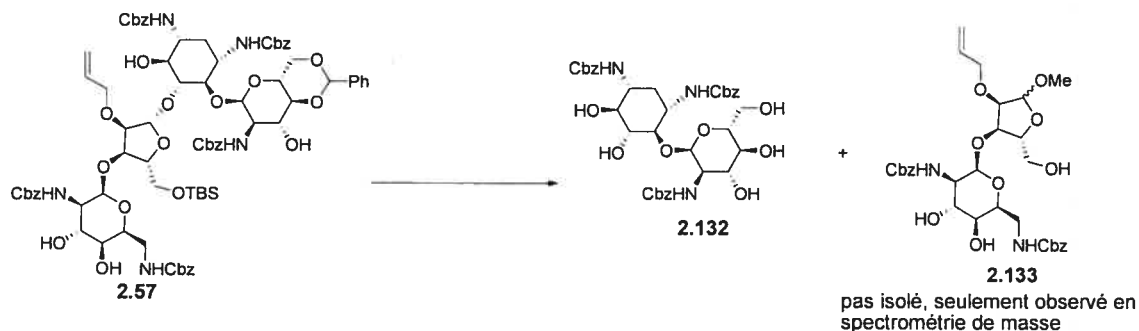
4-O-[(2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl)-5-O-{3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-{2-N-(3,3-diméthylbutyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.129). (80%); $[\alpha]_D +13.6^\circ$ (c 0.8, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 5.66 (m, 1H), 5.26 (m, 1H), 5.18 (m, 1H), 4.41 (m, 1H), 4.28-4.10 (m, 5H), 3.88-3.54 (m, 12H), 3.47-3.20 (m, 8H), 2.88 (m, 2H), 2.33 (m, 1H), 1.80 (s, 18H), 1.71 (m, 1H), 1.42 (m, 2H), 0.80 (m, 9H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 182.7, 109.6, 96.9, 94.3, 84.8, 81.3, 77.5, 75.2, 74.5, 73.7, 71.9, 70.8, 69.6, 69.2, 68.4, 67.8, 61.4, 60.3, 59.9, 54.8, 51.4, 50.5, 49.6, 47.5, 46.5, 40.2, 34.3 (3C), 31.6, 29.3, 26.1, 23.9; *m/z* calculée pour C₃₁H₆₂N₆O₁₄ [M+H]⁺: 743.44023, SM trouvée: 743.4, SMHR trouvée: 743.43885.



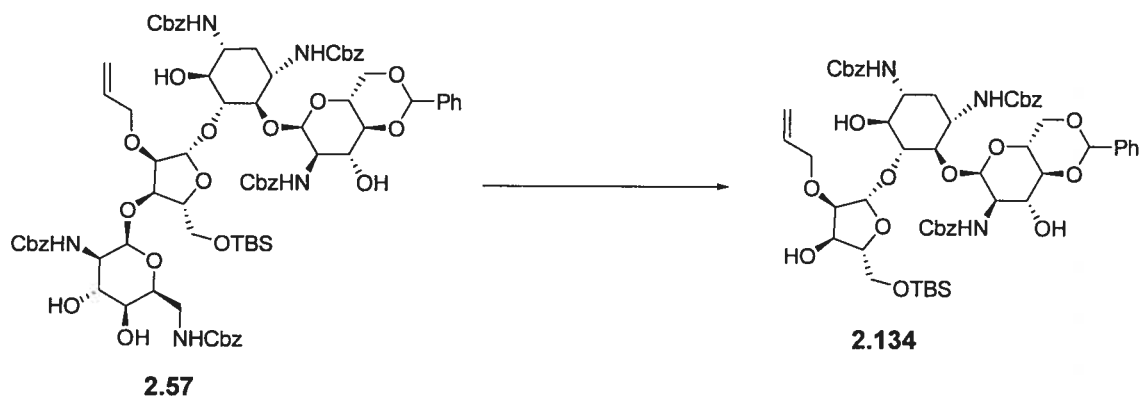
4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-{2-N-(2-phényléthyl)-2-N-acétylaminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl]-2-désoxystreptamine (2.130). Le composé **2.72** (100 mg, 0.061 mmol) a été dissout dans la pyridine (2 mL) et Ac₂O (0.5 mL) a été ajouté. 16 h plus tard, les solvants ont été évaporés sous pression réduite. Le résidu a été dissout dans MeOH (5 mL) et une solution fraîchement préparée de MeONa dans MeOH a été ajoutée tranquillement jusqu'à ce que le pH atteigne 10.5. Le lendemain matin, un spectre de masse a indiqué que la réaction était terminée. La solution a été refroidie à -78 °C et de la glace sèche a été ajoutée jusqu'à ce que le pH soit neutre. Le résidu a été dissout dans AcOEt et la phase organique a été lavée avec une solution de HCl 0.5 M et avec une solution saturée de NaHCO₃. La phase organique a été séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (3% MeOH dans CH₂Cl₂) pour donner le dérivé N-acétylé du composé **2.72** (80 mg, 78%, *m/z* calculée pour C₈₈H₁₀₈N₆O₂₅Si [M+H]⁺: 1677.7, SM trouvée: 1677.9). Ce composé N-acétylé a été traité selon la procédure générale décrite ci-haut pour fournir le composé **2.130**. (76%); [α]_D +9.4° (c 0.6, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 7.25 (m, 5H), 5.66 (m, 1H), 5.33 (m, 1H), 5.11 (m, 1H), 4.55 (m, 1H), 4.20-4.05 (m, 5H), 3.85-3.45 (m, 12H), 3.37-3.22 (m, 8H), 2.95 (m, 2H), 2.31 (m, 1H), 1.99-1.88 (s, 18H), 1.69 (m, 1H); *m/z* calculée pour C₃₅H₆₀N₆O₁₅ [M+H]⁺: 805.41949, SM trouvée: 805.6, SMHR trouvée: 805.41607.



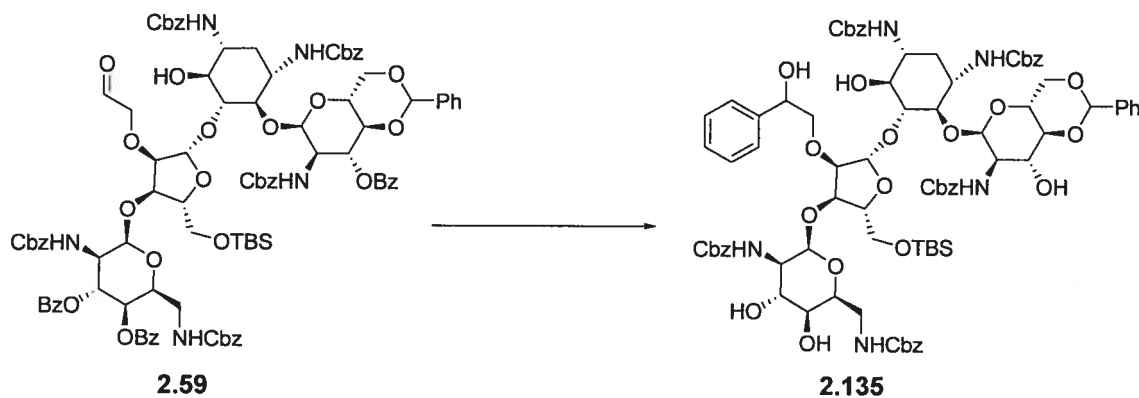
4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-{2-N-(2-phényléthyl)-2-N-benzoylaminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl]}-2-désoxystreptamine (2.131). Le composé **2.72** (100 mg, 0.061 mmol) a été dissout dans la pyridine (2 mL) et Bz-Cl (71 μ L, 0.61 mmol) a été ajouté. 16 h plus tard, MeOH (1 mL) a été ajouté et les solvants ont été évaporés sous pression réduite. Le résidu a été dissout dans MeOH (5 mL) et une solution fraîchement préparée de MeONa dans MeOH a été ajoutée tranquillement jusqu'à ce que le pH atteigne 10.5. Le lendemain matin, un spectre de masse a indiqué que la réaction était terminée. La solution a été refroidie à -78 °C et de la glace sèche a été ajoutée jusqu'à ce que le pH soit neutre. Le résidu a été dissout dans AcOEt et la phase organique a été lavée avec une solution de HCl 0.5 M et avec une solution saturée de NaHCO₃. La phase organique a été séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (3% MeOH dans CH₂Cl₂) pour donner le dérivé *N*-benzoylé du composé **2.72** (72 mg, 68%, *m/z* calculée pour C₉₃H₁₁₀N₆O₂₅Si [M+H]⁺: 1738.7, SM trouvée: 1739.0). Ce composé *N*-benzoylé a été traité selon la procédure générale décrite ci-haut pour fournir le composé **2.130**. (70%); [α]_D +8.7° (c 0.5, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 7.79 (m, 2H), 7.46-7.35 (m, 3H), 7.24 (m, 5H), 5.69 (m, 1H), 5.31 (m, 1H), 5.12 (m, 1H), 4.54 (m, 1H), 4.15-4.00 (m, 5H), 3.85-3.50 (m, 12H), 3.35-3.21 (m, 8H), 2.91 (m, 2H), 2.30 (m, 1H), 1.91 (s, 15H), 1.67 (m, 1H); *m/z* calculée pour C₃₅H₆₀N₆O₁₅ [M+H]⁺: 867.43514, SM trouvée: 867.8, SMHR trouvée: 867.43400.



4-O-(2-Benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl)-1,3-di-N-benzyloxycarbonyl-2-déoxystreptamine (2.132). Le composé **2.57** (0.10 g, 0.065 mmol) a été dissout dans MeOH (2 mL) et TMS-Cl (0.25 mL, 2.0 mmol) a été ajouté pour produire une solution HCl 1.0 M dans MeOH. Le lendemain matin, le précipité blanc a été filtré et lavé avec du méthanol pour donner le composé **2.132**² (35 mg, 74%). Un spectre de masse du filtrat a révélé que le pic correspondant à la masse du produit **2.133** est le pic majoritaire. m/z calculée pour $\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_{12}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 633.3, SM trouvée: 633.5. Puisque cette réaction de fragmentation chimique avait pour objectif de nous permettre de déterminer la position du groupement allyle et que nous avons obtenu des structures par diffraction des rayons X qui ont confirmé la présence de l'allyle à la position O2'' pour quelques dérivés de **2.57**, nous n'avons pas caractérisé davantage les composés présents dans le filtrat. Toutefois, il semble que cette réaction fournit un mélange complexe des anomères α et β des formes ribofuranose et ribopyranose du composé **2.133**.



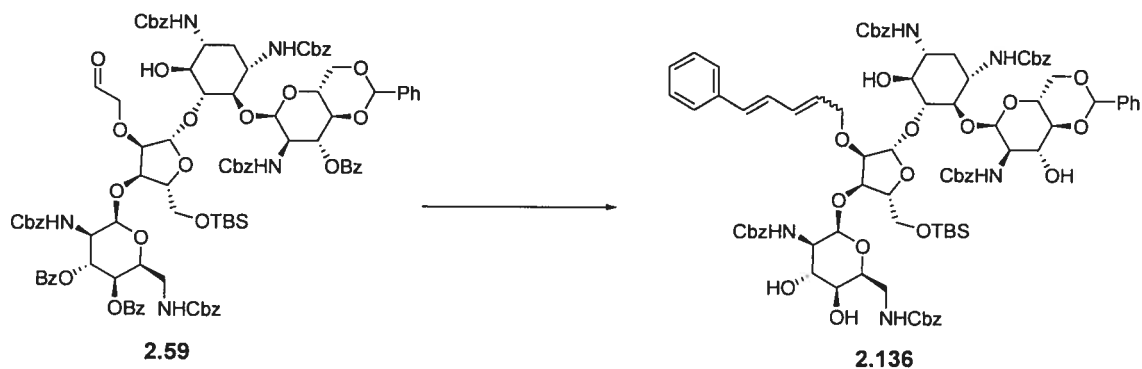
4-*O*-[4,6-*O*-Benzyldène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{2-*O*-allyl-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl- β -D-ribofuranosyl}-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.134). Pb(OAc)₄ (725 mg, 1.64 mmol) a été ajouté à une solution du composé **2.57** (1.00 g, 0.654 mmol) en solution dans la pyridine (20 mL). Le lendemain matin, de l'acide oxalique (295 mg, 3,27 mmol) a été ajouté et le solvant a été évaporé sous pression réduite. Le solide jaune a été repris avec AcOEt et les solides ont été filtrés. Le filtrat a été lavé avec de l'eau, séché sur Na₂SO₄, puis le solvant a été évaporé sous pression réduite pour fournir une huile jaune qui a été filtrée sur gel de silice (4% MeOH dans CH₂Cl₂). Le solide obtenu a été dissout dans THF (20 mL), et Et₃N (5 mL) a été ajouté. Après 36h, le solvant a été évaporé sous pression réduite et l'huile obtenue a été purifiée par chromatographie éclair (3% MeOH dans CH₂Cl₂) pour obtenir **2.134** (110 mg, 15%) sous forme de solide blanc. [α]_D +18.2° (c 1.0, CHCl₃); R_f 0.6 (CHCl₃:AcOEt:MeOH, 20:5:3); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.60-7.10 (m, 20H), 6.30-3.00 (m, 30H), 2.27 (m, 1H), 1.33 (m, 1H), 0.85 (s, 9H), 0.03 (s, 6H); *m/z* calculée pour C₅₇H₇₃N₃O₁₇Si [M+H]⁺: 1100.47875, SM trouvée: 1100.6, SMHR trouvée: 1100.47681.



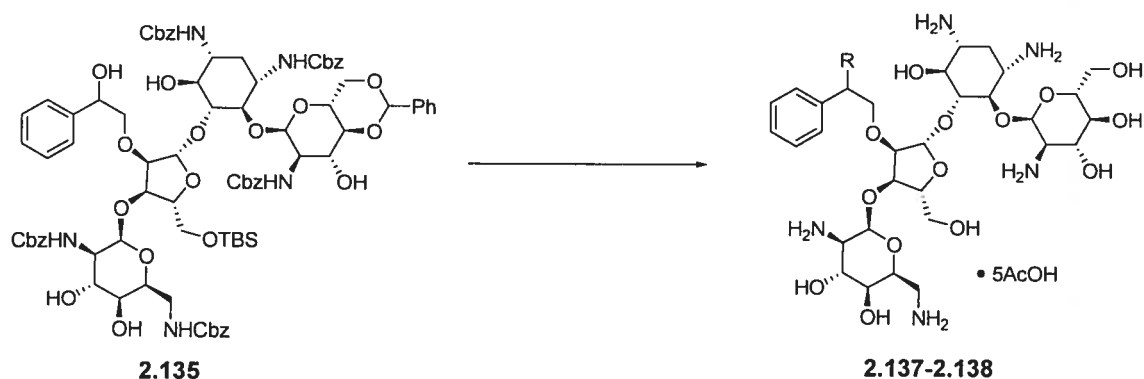
4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-(2-phényléthan-2-ol)- β -D-ribofuranosyl]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.135). Ph_2Zn (24 mg, 0.109 mmol) a été ajouté à une solution de **2.59** (100 mg, 0.055 mmol) dans THF (5 mL). 30 min. plus tard, quelques gouttes d'une solution saturée de NH_4Cl ont été ajoutées. Cette procédure a été réalisée sans affecter les esters de benzoate pour fournir le produit d'addition dans un excellent rendement (aucun sous-produit observé). Le résidu a été dissout dans MeOH (25 mL) et une solution fraîchement préparée de MeONa dans du MeOH a été ajoutée tranquillement jusqu'à ce que le pH atteigne 10.5. 36 h plus tard, un spectre de masse a indiqué que la réaction était terminée. La solution a été refroidie à -78°C et de la glace sèche a été ajoutée jusqu'à ce que le pH soit neutre. Le résidu a été dissout dans AcOEt et la phase organique a été lavée avec une solution de HCl 0.5 M et avec une solution saturée de NaHCO_3 . La phase organique a été séchée sur Na_2SO_4 puis évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH_2Cl_2 a été purifié par chromatographie éclair (2% MeOH dans CH_2Cl_2) pour donner le composé **2.135** (54 mg, 62%).

Procédure B: Alternativement, une solution de **2.59** (100 mg, 0.055 mmol) dans THF (5 mL) a été refroidie à -40°C et une solution 1.0 M de PhMgBr (81 μL , 0.081 mmol) dans THF (5 mL) a été ajoutée tranquillement. Après 1h, quelques gouttes d'une solution saturée de NH_4Cl ont été ajoutées. La phase organique a été séchée sur Na_2SO_4 , puis le solvant a été évaporé sous pression réduite. Le résidu a été dissout dans MeOH (25 mL)

et une solution fraîchement préparée de MeONa dans du MeOH a été ajoutée tranquillement jusqu'à ce que le pH atteigne 10.5. 36 h plus tard, un spectre de masse a indiqué que la réaction était terminée. La solution a été refroidie à -78 °C et de la glace sèche a été ajoutée jusqu'à ce que le pH soit neutre. Le résidu a été dissout dans AcOEt et la phase organique a été lavée avec une solution de HCl 0.5 M et avec une solution saturée de NaHCO₃. La phase organique a été séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (2% MeOH dans CH₂Cl₂) pour donner le composé **2.135** (51 mg, 60%); $[\alpha]_D +16.2^\circ$ (c 0.7, CHCl₃); R_f 0.6 (CHCl₃:AcOEt:MeOH, 20:5:3); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.60-7.10 (m, 35H), 5.65-3.12 (m, 45H), 2.21 (m, 1H), 1.35 (m, 1H), 0.91 (s, 9H), 0.03 (s, 6H); *m/z* calculée pour C₈₄H₁₀₁N₅O₂₅Si [M+Na]⁺: 1630.64526, SM trouvée: 1632.2, SMHR trouvée: 1630.64331.

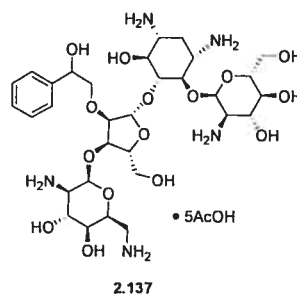


4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-(5-phénylpen-2,4-diényl)- β -D-ribofuranosyl]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.136). À une solution de bromure de triphénylphosphonium de cinnamyle (31 mg, 0.081 mmol) dans THF anhydre (1 mL) a été ajouté KHMDS 0.5 M dans du toluène (0.17 mL, 0.085 mmol) et la solution orange obtenue a été ajoutée à une solution de **2.59** (75 mg, 0.041 mmol) dans THF anhydre (3 mL) à -40 °C. 1 h plus tard, la solution a été réchauffée à 0 °C pour 2h et quelques gouttes d'une solution saturée de NH₄Cl ont été ajoutées. La phase organique a été lavée avec de l'eau, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée sous pression réduite. Le résidu a été dissout dans MeOH (5 mL) et une solution fraîchement préparée de MeONa dans du MeOH a été ajoutée tranquillement jusqu'à ce que le pH atteigne 10.5. 36 h plus tard, un spectre de masse a indiqué que la réaction était terminée. La solution a été refroidie à -78 °C et de la glace sèche a été ajoutée jusqu'à ce que le pH soit neutre. Le résidu a été dissout dans AcOEt et la phase organique a été lavée avec une solution de HCl 0.5 M et avec une solution saturée de NaHCO₃. La phase organique a été séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (2% MeOH dans CH₂Cl₂) pour donner le composé **2.136** (25 mg, 38%); [α]_D +21.8° (c 0.9, CHCl₃); R_f 0.7 (CHCl₃:AcOEt:MeOH, 20:5:3); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.60-7.10 (m, 35H), 6.57-3.00 (m, 47H), 2.25 (m, 1H), 1.41 (m, 1H), 0.91 (s, 9H), 0.02 (s, 6H); *m/z* calculée pour C₈₇H₁₀₃N₅O₂₄Si [M+Na]⁺: 1652.66600, SM trouvée: 1653.9, SMHR trouvée: 1652.66981.

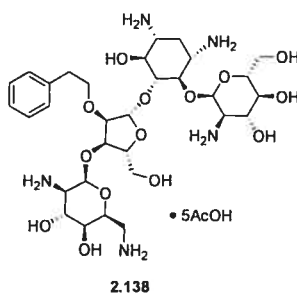


Procédure pour l'obtention des composés (2.137-2.138) :

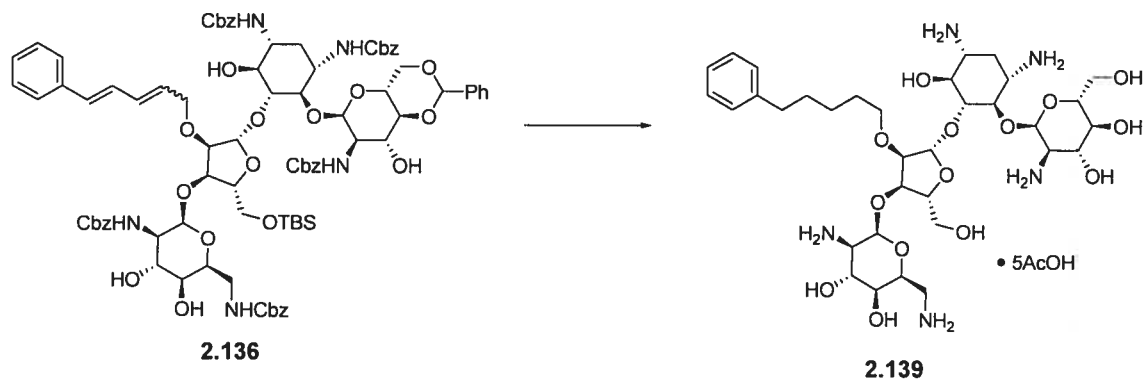
Le substrat de départ **2.135** (0.15 mg, 0.093 mmol) a été dissout dans AcOH:H₂O (4:1, 5 mL) puis cette solution a été chauffée à 60 °C. 5 h plus tard, un spectre de masse a indiqué que le substrat de départ a été complètement converti au produit avec le TBS et le benzylidène hydrolysés. Les solvants ont été évaporés et MeOH (2.25 mL), suivi de H₂O (0.75 mL) et d'une quantité catalytique (environ 20 mol %) d'hydroxyde de palladium 20% sur charbon ont été ajoutés. Le mélange a été laissé sous agitation pendant 6 h sous 1 atm de H₂, puis un spectre de masse a indiqué que le composé **2.137** était le seul produit. La moitié du mélange (1.5 mL) a été filtré sur un lit de célite et le filtrat a été évaporé sous pression réduite. Le résidu a été lavé avec un minimum de CH₂Cl₂ (1 mL, 2 fois) puis dissout dans un minimum de H₂O et lyophilisé pour donner le composé **2.137**. AcOH (1.5 mL) a été ajouté à l'autre moitié de la réaction et l'hydrogénation a été continuée pour 18 h additionnelles et un spectre de masse a indiqué que le composé **2.138** était le seul produit. Le mélange a été filtré sur un lit de célite et le filtrat a été évaporé sous pression réduite. Le résidu a été lavé avec un minimum de CH₂Cl₂ (1 mL, 2 fois) puis dissout dans un minimum de H₂O et lyophilisé pour donner le composé **2.138**.



4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-[[3-O-(2,6-amino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-(2-phényléthan-2-ol)- β -D-ribofuranosyl]]-2-désoxystreptamine (2.137). (21 mg, 70%); $[\alpha]_D +9.2^0$ (c 0.5, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 7.43 (m, 5H), 5.83 (m, 1H), 5.44 (m, 1H), 5.14 (m, 1H), 4.56 (m, 1H), 4.42 (m, 1H) 4.24-4.14 (m, 4H), 3.92-3.62 (m, 23H), 3.51-3.31 (m, 6H), 3.12 (m, 1H), 2.43 (m, 1H), 1.82 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 141.0, 129.5 (2C), 129.1, 127.2, 109.0, 96.6, 96.0, 85.6, 82.5, 81.7, 78.0, 74.5, 73.9, 73.4, 72.9, 71.0, 69.6, 68.2, 68.0, 61.0, 59.8, 58.3, 54.6, 51.7, 51.5, 50.5, 49.6, 41.1, 29.3; *m/z* calculée pour C₃₁H₅₃N₅O₁₅ [M+H]⁺: 736.36164, SM trouvée: 736.7, SMHR trouvée: 736.36153.

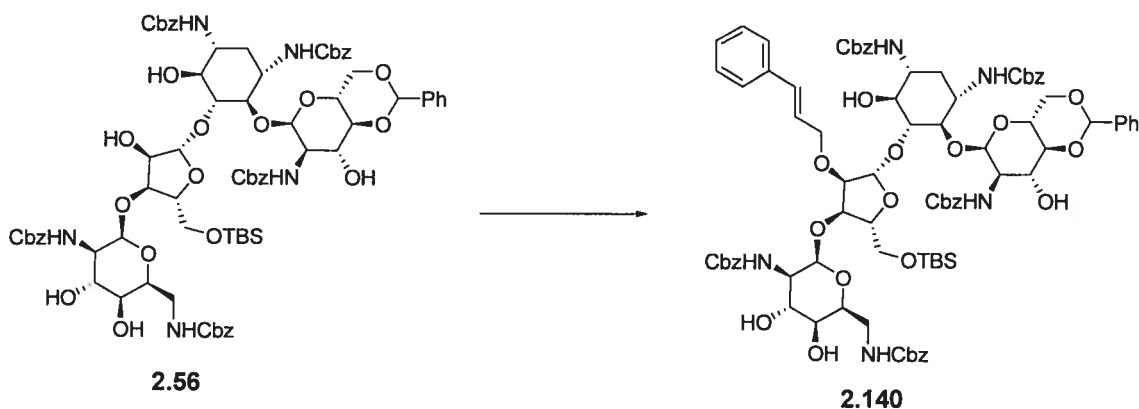


4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-[[3-O-(2,6-amino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-(2-phényléthyl)- β -D-ribofuranosyl]]-2-désoxystreptamine (2.138). (24 mg, 80%); $[\alpha]_D +10.3^0$ (c 1.0, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 7.41 (m, 5H), 5.80 (m, 1H), 5.32 (m, 1H), 5.08 (m, 1H), 4.68 (m, 1H), 4.42-4.12 (m, 5H), 4.03 (m, 1H), 3.90-3.57 (m, 11H), 3.47-3.30 (m, 6H), 2.94 (m, 2H), 2.40 (m, 1H), 1.90 (s, 15H), 1.82 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 182.0, 139.8, 129.9 (2C), 129.5 (2C), 127.3, 109.0, 96.6, 95.8, 85.9, 82.2, 81.2, 78.5, 74.8, 73.5, 72.9, 72.1, 71.0, 69.7, 68.2, 68.0, 61.0, 59.6, 55.3, 54.6, 51.5, 50.6, 49.6, 41.1, 36.0, 29.8, 23.8; *m/z* calculée pour C₃₁H₅₃N₅O₁₄ [M+H]⁺: 720.36673, SM trouvée: 720.7, SMHR trouvée: 720.36462.

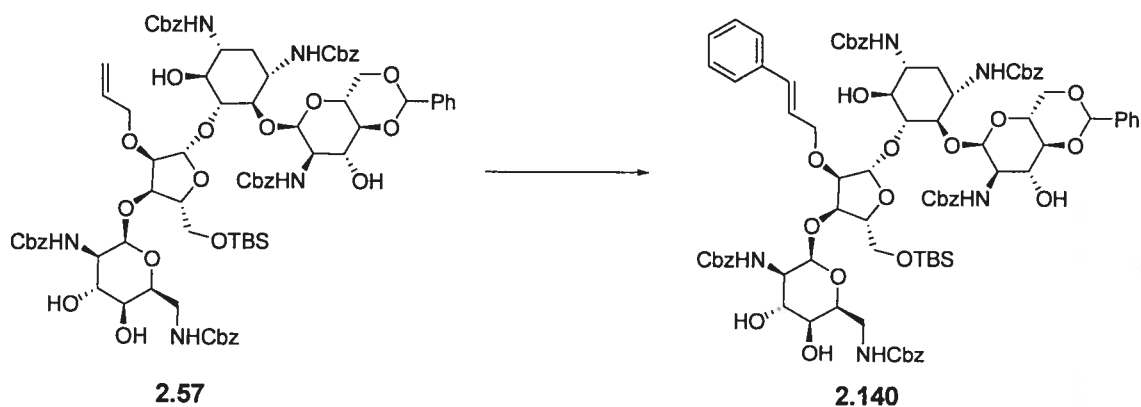


4-O-[{2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5-O-{3-O-(2,6-amino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-(5-phénylpentyl)- β -D-ribofuranosyl}]-2-déoxystreptamine

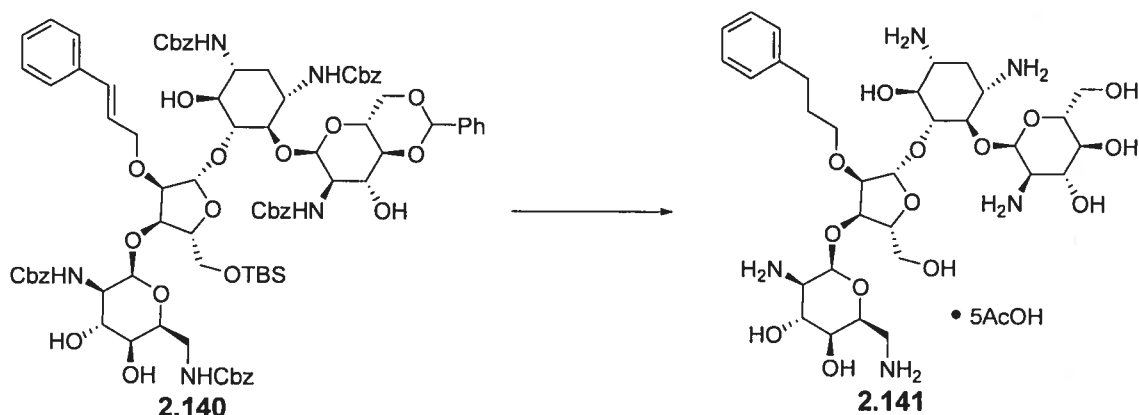
(**2.139**). Le composé **2.136** (25 mg, 0.015 mmol) a été dissout dans AcOH:H₂O (4:1, 5 mL) puis cette solution a été chauffée à 60 °C. 5 h plus tard, un spectre de masse a indiqué que le substrat de départ a été complètement converti au produit avec le TBS et le benzylidène hydrolysés. La solution a été refroidie à TP et une quantité catalytique (environ 20 mol %) d'hydroxyde de palladium 20% sur charbon a été ajoutée. Le mélange a été laissé sous agitation pendant 3 h sous 1 atm de H₂, puis un spectre de masse a indiqué que la réaction était terminée. Le mélange a été filtré sur un lit de célite et le filtrat a été évaporé sous pression réduite. Le résidu a été lavé avec un minimum de CH₂Cl₂ (1 mL, 2 fois) puis dissout dans un minimum de H₂O et lyophilisé pour donner le composé **2.139** (11 mg, 70%). $[\alpha]_D +10.5^0$ (c 0.6, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 7.36-7.26 (m, 5H), 5.69 (m, 1H), 5.43 (m, 1H), 5.12 (m, 1H), 4.39 (m, 1H), 4.18-4.12 (m, 5H), 3.93-3.04 (m, 18H), 2.63 (m, 2H), 2.22 (m, 1H), 1.90 (s, 15H), 1.71 (m, 1H) 1.64 (m, 4H) 1.35 (m, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 182.6, 141.0, 129.7 (2C), 129.1 (2C), 125.9, 107.6, 97.7, 96.3, 84.9, 82.3, 81.2, 78.4, 74.5, 74.3, 72.1, 71.2, 70.4, 69.8, 68.5, 68.0, 62.7, 61.9, 60.1, 54.1, 50.8, 49.7, 49.2, 40.6, 37.3, 33.4, 32.5, 28.7, 26.4, 23.9; m/z calculée pour C₃₄H₅₉N₅O₁₄ [M+H]⁺: 762.41368, SM trouvée: 762.4, SMHR trouvée: 762.41423.



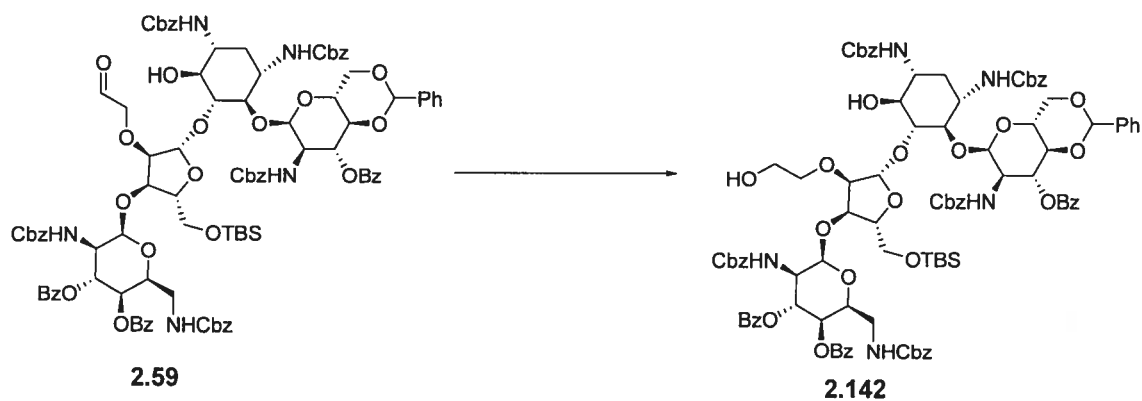
4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucoypyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-cinnamyl- β -D-ribofuranosyl]}-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.140). Le composé **2.56** (0.20 g, 0.134 mmol) a été dissout dans THF anhydre (10 mL). Une quantité catalytique de Bu₄Ni (5.0 mg, 0.013 mmol) et du bromure de cinnamyle (66 mg, 0.27 mmol) ont été ajoutés suivi de l'addition goutte à goutte d'une solution de KHMDS 0.5 M dans le toluène (0.35 mL, 0.18 mmol). La solution a été agitée pour la nuit, puis 0.3 équivalent de KHMDS (81 μ L, 0.040 mmol) a été ajouté. 6 h plus tard, une solution saturée de NH₄Cl a été ajoutée, puis la phase organique séparée et séchée sur Na₂SO₄ avant d'être évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (1 à 2% de MeOH dans CH₂Cl₂) pour donner le composé **2.140** (0.15 g, 70%); $[\alpha]_D +16.4^\circ$ (c 1.0, CHCl₃); R_f 0.7 (CHCl₃:AcOEt:MeOH, 20:5:3); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.65-7.12 (m, 35H), 6.54-3.05 (m, 45H), 2.24 (m, 1H), 1.36 (m, 1H), 0.84 (s, 9H), 0.01 (s, 6H); *m/z* calculée pour C₈₅H₁₀₁N₅O₂₄Si [M+H]⁺: 1604.66840, SM trouvée: 1605.1, SMHR trouvée: 1604.67026.



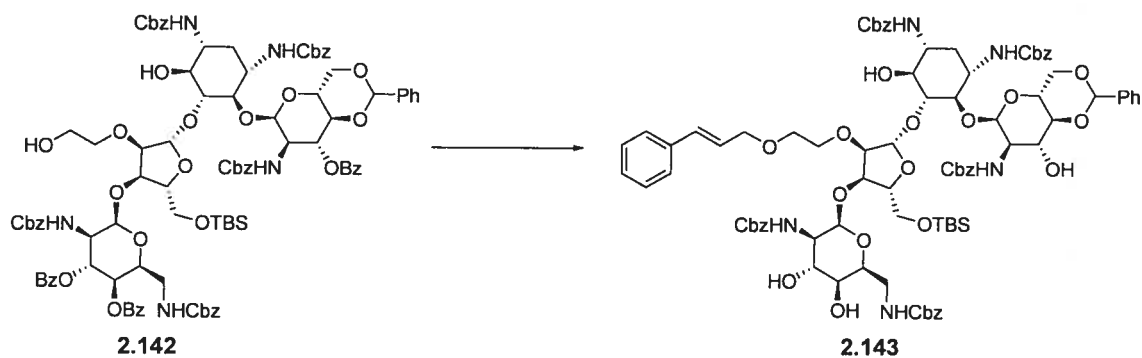
4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-cinnamyl- β -D-ribofuranosyl]}-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.140). Le catalyseur de Grubbs de deuxième génération (11 mg, 0.013 mmol) a été ajouté à une solution du composé **2.57** (0.20 g, 0.13 mmol) dans CH₂Cl₂ (15 mL pour une concentration en substrat d'environ 0.01M). Après 16 h, la solution a été chauffée à reflux pour 24 h additionnelles. Le solvant a été évaporé sous pression réduite pour fournir un solide brun qui a été purifié par chromatographie éclair (3% MeOH dans CH₂Cl₂) pour donner le composé **2.140** (0.16 g, 76%) décrit ci-haut.



4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-amino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-(3-phénylpropyl)- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (2.141). Le composé **2.140** (0.10 g, 0.062 mmol) a été dissout dans AcOH:H₂O (4:1, 5 mL) puis cette solution a été chauffée à 60 °C. 5 h plus tard, un spectre de masse a indiqué que le substrat de départ a été complètement converti au produit avec le TBS et le benzyldène hydrolysés. La solution a été refroidie à TP et une quantité catalytique (environ 20 mol %) d'hydroxyde de palladium 20% sur charbon a été ajoutée. Le mélange a été laissé sous agitation pendant 3 h sous 1 atm de H₂, puis un spectre de masse a indiqué que la réaction était terminée. Le mélange a été filtré sur un lit de célite et le filtrat a été évaporé sous pression réduite. Le résidu a été lavé avec un minimum de CH₂Cl₂ (1 mL, 2 fois) puis dissout dans un minimum de H₂O et lyophilisé pour donner le du composé **2.141** (32 mg, 50%). $[\alpha]_D +10.5^\circ$ (c 0.6, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ 7.28-7.19 (m, 5H), 5.67 (m, 1H), 5.32 (m, 1H), 5.13 (m, 1H), 4.47 (m, 1H), 4.18-4.11 (m, 5H), 3.86-3.51 (m, 12H), 3.40-3.19 (m, 6H), 2.61-2.36 (m, 4H), 2.31 (m, 1H), 1.84 (s, 15H), 1.71 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O) δ 181.9, 142.3, 129.1 (2C), 128.9 (2C), 126.5, 108.7, 96.2, 95.5, 85.4, 81.8, 80.9, 78.0, 74.3, 74.1, 73.1, 71.8, 70.7, 69.9, 69.6, 69.3, 68.0 67.9, 67.7, 60.4, 54.2, 51.3, 50.3, 49.2, 40.7, 31.7, 30.7, 23.8; *m/z* calculée pour C₃₂H₅₅N₅O₁₄ [M+H]⁺: 734.38238, SM trouvée: 734.5, SMHR trouvée: 734.38213.

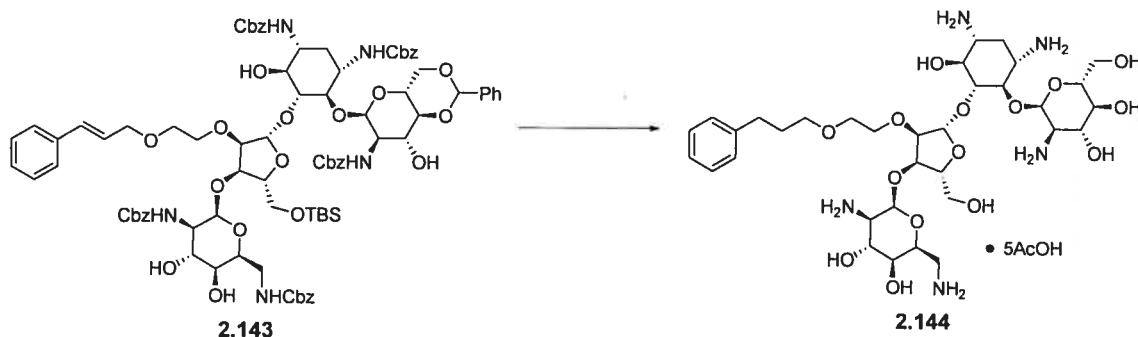


4-*O*-[3-*O*-Benzoyl-4,6-*O*-benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(3,4-di-*O*-benzoyl-2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-(éthan-2-ol)- β -D-ribofuranosyl]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.142). À une solution de l'aldéhyde **2.59** (240 mg, 0.130 mmol) dans MeOH (10 mL) a été ajouté AcOH (0.1 mL), suivi d'une solution 1.0 M de NaBH₃CN dans THF (180 μ L, 0.180 mmol). Après 18h, le solvant a été évaporé sous pression réduite puis le résidu a été purifié par chromatographie éclair (2:3 AcOEt:hexane) pour obtenir le composé **2.142** (190 mg, 80%); $[\alpha]_D +23.7^\circ$ (c 1.0, CHCl₃); R_f 0.3 (1:1 AcOEt:hexane); *m/z* calculée pour C₉₉H₁₀₉N₅O₂₈Si [M+Na]⁺: 1866.7, SM trouvée: 1868.0; *m/z* calculée pour C₉₉H₁₀₉N₅O₂₈Si [M+H]⁺: 1844.71066, SMHR trouvée: 1844.71460.



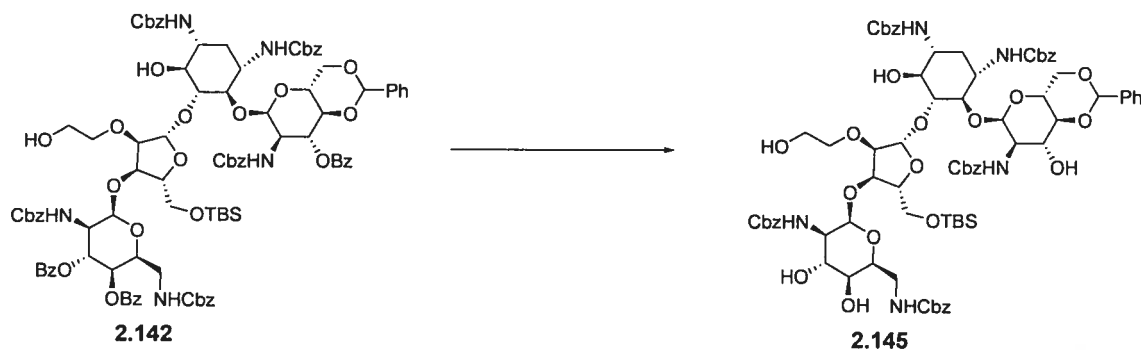
4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-(éthoxycinnamyl)- β -D-ribofuranosyl]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.143). Le composé **2.142** (75 mg, 0.041 mmol) a été dissout dans THF anhydre (5 mL). Une quantité catalytique de Bu₄NI (2.0 mg, 0.0050 mmol) et le bromure de cinnamyle (17 mg, 0.085 mmol) ont été ajoutés suivi de l'addition goutte à goutte d'une solution de KHMDS 0.5 M dans le toluène (0.11 mL, 0.055 mmol). La solution a été agitée pour la nuit, puis KHMDS (25 μ L, 0.012 mmol) a été ajouté. 6 h plus tard, une solution saturée de NH₄Cl a été ajoutée et la phase organique a été séparée, séchée sur Na₂SO₄, puis évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (2:3 AcOEt:hexane) pour donner le produit alkylé (30 mg, 37%); [α]_D +21.5° (c 1.0, CHCl₃); R_f 0.5 (AcOEt:hexane 1:1); *m/z* calculée pour C₁₀₈H₁₁₇N₅O₂₈Si [M+H]⁺: 1960.8, SMHR trouvée: 1960.9. Ce composé alkylé (30 mg, 0.015 mmol) a été dissout dans MeOH (5 mL) et une solution fraîchement préparée de MeONa dans du MeOH a été ajoutée tranquillement jusqu'à ce que le pH atteigne 10.5. 36 h plus tard, un spectre de masse a indiqué que la réaction était terminée. La solution a été refroidie à -78 °C et de la glace sèche a été ajoutée jusqu'à ce que le pH soit neutre et le solvant a été évaporé. Le résidu a été dissout dans AcOEt et la phase organique a été lavée avec une solution de HCl 0.5 M et avec une solution saturée de NaHCO₃. La phase organique a été séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (3% MeOH dans CH₂Cl₂) pour donner le composé **2.143** (19 mg, 80%); [α]_D +11.2° (c 0.8, CHCl₃); R_f 0.4 (CHCl₃:AcOEt:MeOH, 20:5:3); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.60-7.10 (m,

35H), 6.52-3.05 (m, 49H), 2.23 (m, 1H), 1.33 (m, 1H), 0.86 (s, 9H), 0.01 (s, 6H); m/z calculée pour $C_{87}H_{105}N_5O_{25}Si$ $[M+Na]^+$: 1670.67656, SM trouvée: 1670.7, SMHR trouvée: 1670.67734.

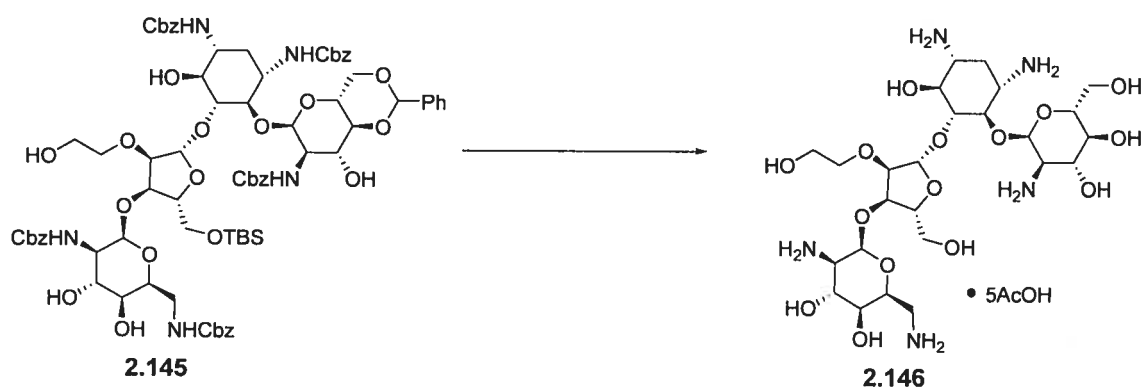


4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-amino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-(éthoxy-3-phénylpropyl)- β -D-ribofuranosyl}]-2-

désoxystreptamine (2.144). Le composé **2.143** (19 mg, 0.012 mmol) a été dissout dans AcOH:H₂O (4:1, 3 mL) puis cette solution a été chauffée à 60 °C. 2h plus tard, un spectre de masse a indiqué que le substrat de départ avait été complètement converti au produit avec le TBS et le benzylidène hydrolysés. m/z calculée pour $C_{74}H_{87}N_5O_{25}$ $[M+H]^+$: 1446.6, SM trouvée: 1446.4. La solution a été refroidie à TP et une quantité catalytique (environ 20 mol %) d'hydroxyde de palladium 20% sur charbon a été ajoutée. Le mélange a été laissé sous agitation pendant 3 h sous 1 atm de H₂, puis un spectre de masse a indiqué que la réaction était terminée. Le mélange a été filtré sur un lit de célite et le filtrat a été évaporé sous pression réduite. Le résidu a été lavé avec un minimum de CH₂Cl₂ (1 mL, 2 fois) puis dissout dans un minimum de H₂O et lyophilisé pour fournir le composé **2.144** (5.1 mg, 40%) $[\alpha]_D +6.8^\circ$ (c 0.4, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 7.38, (m, 5H), 5.68 (m, 1H), 5.26 (m, 1H), 5.17 (m, 1H), 4.42 (m, 1H), 4.28-4.07 (m, 5H), 3.88-3.59 (m, 16H), 3.47-3.19 (m, 10H), 2.34 (m, 1H), 1.82 (s, 15H), 1.47 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 182.6, 140.7, 129.3 (2C), 129.1 (2C), 127.3, 109.0, 96.7, 95.3, 85.7, 81.5, 80.6, 77.7, 74.1, 73.8, 73.0, 71.4, 70.2, 69.7, 69.3, 69.1, 67.8 67.4, 67.1, 63.4, 61.5, 60.2, 53.9, 51.3, 49.8, 49.1, 40.5, 31.6, 29.2, 23.4; m/z calculée pour $C_{34}H_{59}N_5O_{15}$ $[M+H]^+$: 778.40858, SM trouvée: 778.6, SMHR trouvée 778.40746.

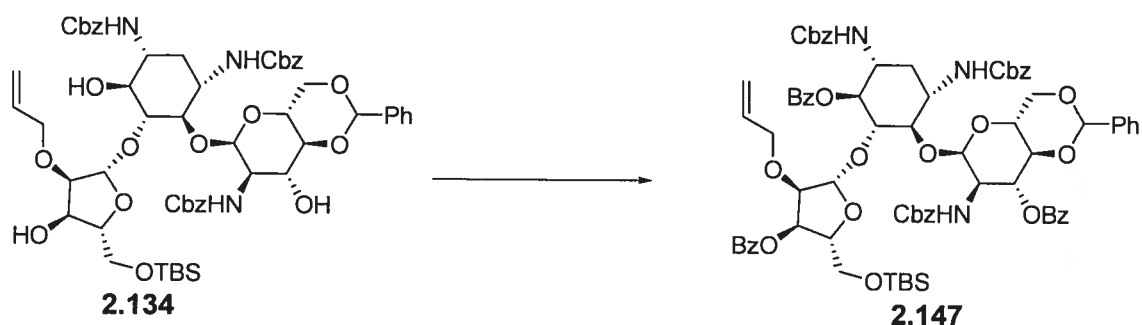


4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-(éthan-2-ol)- β -D-ribofuranosyl]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.145). Le composé **2.142** (75 mg, 0.043 mmol) a été dissout dans MeOH (5 mL) et une solution fraîchement préparée de MeONa dans du MeOH a été ajoutée tranquillement jusqu'à ce que le pH atteigne 10.5. 36 h plus tard, un spectre de masse indique que la réaction était terminée. À ce moment, la solution a été refroidie à -78 °C et de la glace sèche a été ajoutée jusqu'à ce que le pH soit neutre. Le résidu a été dissout dans AcOEt et la phase organique a été lavée avec une solution de HCl 0.5 M et avec une solution saturée de NaHCO₃. La phase organique a été séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (3% MeOH dans CH₂Cl₂) pour donner le composé **2.145** (58 mg, 80%). $[\alpha]_D^{20} +13.2^0$ (c 0.7, CHCl₃); R_f 0.4 (CHCl₃:AcOEt:MeOH, 20:5:3); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.60-7.10 (m, 30H), 5.65-3.00 (m, 45H), 2.26 (m, 1H), 1.41 (m, 1H), 0.85 (s, 9H), 0.01 (s, 6H); m/z calculée pour C₇₈H₉₇N₅O₂₅Si [M+Na]⁺: 1554.6, SM trouvée: 1656.0.



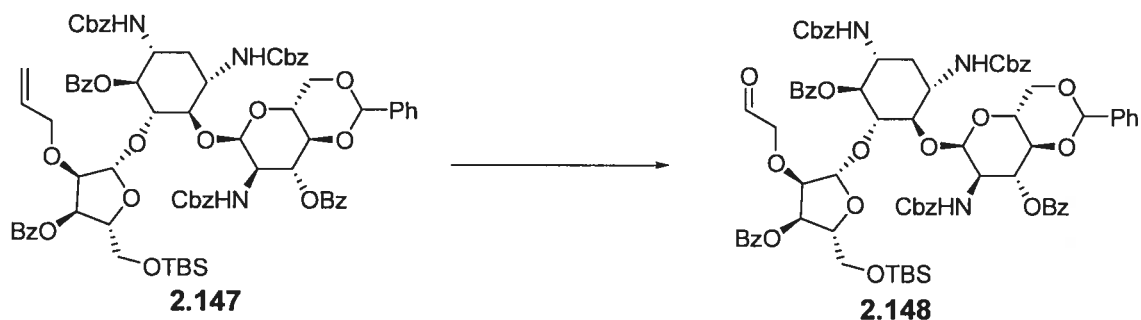
4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-amino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-O-(éthan-2-ol)}- β -D-ribofuranosyl]-2-déoxystreptamine

(**2.146**). Le composé **2.145** (50 mg, a été dissout dans AcOH:H₂O (4:1, 3 mL) puis cette solution a été chauffée à 60 °C. 4 h plus tard, un spectre de masse a indiqué que le substrat de départ a été complètement converti au produit avec le TBS et le benzylidène hydrolysés. m/z calculée pour C₆₅H₇₉N₅O₂₅ [M+Na]⁺: 1352.5, SM trouvée: 1352.7. La solution a été refroidie à TP et une quantité catalytique (environ 20 mol %) d'hydroxyde de palladium 20% sur charbon a été ajoutée. Le mélange a été laissé sous agitation pendant 3 h sous 1 atm de H₂, puis un spectre de masse a indiqué que la réaction était terminée. Le mélange a été filtré sur un lit de célite et le filtrat a été évaporé sous pression réduite. Le résidu a été lavé avec un minimum de CH₂Cl₂ (1 mL, 2 fois) puis dissout dans un minimum de H₂O et lyophilisé pour donner le **2.146** (21 mg, 67%). [α]_D +11.4° (c 0.8, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 5.76 (m, 1H), 5.47 (m, 1H), 5.26 (m, 1H), 4.58 (m, 1H), 4.40 (m, 1H), 4.29-4.20 (m, 4H), 3.90-3.26 (m, 16H), 3.11-3.05 (m, 4H), 2.38 (m, 1H), 1.88 (s, 15H), 1.72 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 182.2, 108.9, 96.8, 96.3, 85.8, 82.5, 81.8, 79.7, 75.3, 74.3, 73.8, 72.7, 71.2, 70.0, 68.7, 68.5, 68.0, 61.4, 61.3, 58.9, 54.8, 51.8, 50.8, 50.2, 41.2, 29.3, 24.6; m/z calculée pour C₂₅H₄₉N₅O₁₅ [M+H]⁺: 660.33034, SM trouvée: 660.5, SMHR trouvée: 660.32818.

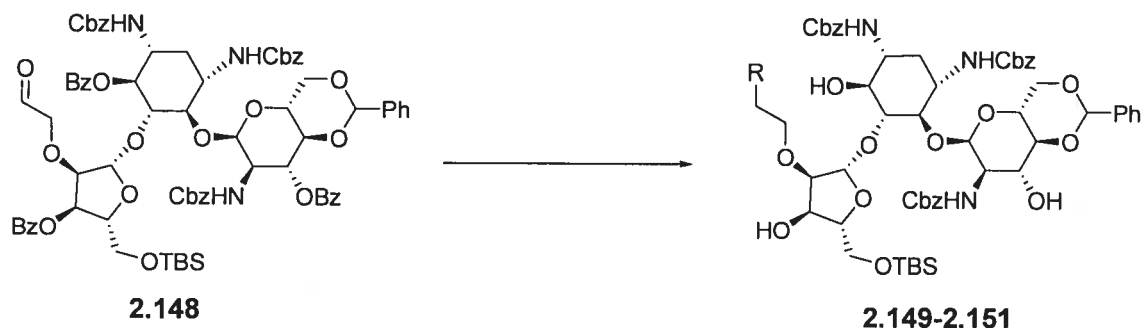


4-*O*-[3-*O*-Benzoyl-4,6-*O*-benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[2-*O*-allyl-3-*O*-benzoyl-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl- β -D-ribofuranosyl]-6-*O*-benzoyl-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine

(**2.147**). Du chlorure de benzoyle (0.21 mL, 1.8 mmol) et une quantité catalytique de DMAP (5.0 mg) ont été ajoutés à une solution de **2.134** (0.20 g, 0,18 mmol) dans la pyridine (10 mL). 16 h plus tard, de l'eau (1 mL) a été ajoutée et les solvants ont été évaporés sous pression réduite. Le résidu a été dissout dans AcOEt et la phase organique a été lavée avec une solution de HCl 0.5 M et avec une solution saturée de NaHCO₃. La phase organique a ensuite été séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (AcOEt:hexane 1:1) pour donner le composé **2.147** (0.24 g, quant.). $[\alpha]_D^{+21.6^\circ}$ (c 0.7, CHCl₃); R_f 0.5 (1:1 AcOEt:hexane); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.15-7.10 (m, 35H), 6.30-3.00 (m, 33H), 2.23 (m, 1H), 1.37 (m, 1H), 0.89 (s, 9H), 0.03 (s, 6H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 160.3, 158.6, 142.4, 139.4, 138.2, 137.5, 134.1, 131.6, 130.5, 129.4, 129.2, 129.1, 129.0, 128.9, 128.8, 128.7, 128.5, 128.3, 128.2, 128.1, 128.0, 126.7, 99.4, 84.5, 77.6, 71.8, 68.7, 67.9, 67.6, 67.2, 29.5; m/z calculée pour C₇₈H₈₅N₃O₂₀Si [M+H]⁺: 1412.55439, SM trouvée: 1412.9, SMHR trouvée: 1412.55173.

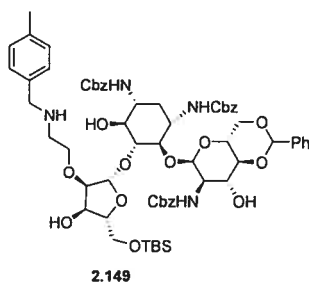


4-*O*-[3-*O*-Benzoyl-4,6-*O*-benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-benzoyl-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-(2-éthanal)- β -D-ribofuranosyl]}-6-*O*-benzoyl-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.148). Le composé **2.147** (250 mg, 0.177 mmol) a été dissout dans CH₂Cl₂ (15 mL) et refroidi à -78 °C. De l'ozone a été bullé dans le ballon jusqu'à ce que la solution devienne bleue pâle et 1 h plus tard de l'argon a été bullé dans le ballon pour enlever l'excès d'ozone. Par la suite, Me₂S (0.130 mL, 1.77 mmol), a été ajouté et la solution a été réchauffée à TP. 2h plus tard, le solvant a été évaporé sous pression réduite et le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (AcOEt:hexane 2:3) pour donner l'aldéhyde **2.148** (200 mg, 80%); R_f 0.25 (1:1 AcOEt:hexane); *m/z* calculée pour C₇₇H₈₃N₃O₂₁Si [M+H]⁺: 1414.5, SM trouvée: 1414.7.

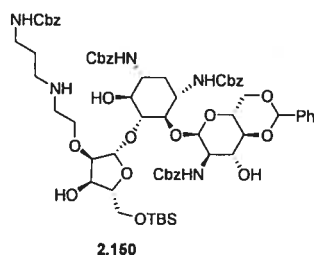


Procédure générale pour les aminations réductrices suivies du traitement avec le méthanolate de sodium (2.149-2.151):

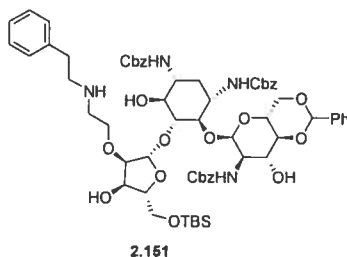
L'aldéhyde **2.148** (70 mg, 0.050 mmol) ainsi que l'amine appropriée (0.15 mmol) ont été dissouts dans du MeOH (3 mL). Par la suite, AcOH (0.1 mL) suivi d'une solution 1.0 M de NaBH₃CN dans THF (0.15 mL, 0.15 mmol) ont été ajoutés. Le lendemain matin, une CCM a indiquée que l'aldéhyde était complètement consommé. Une solution fraîchement préparée de MeONa dans du MeOH a été ajoutée tranquillement jusqu'à ce que le pH atteigne 10.5. La solution a été agitée jusqu'à ce qu'un spectre de masse indique que la réaction était terminée (généralement 24 à 48 h). À ce moment, la solution a été refroidie à -78 °C et de la glace sèche a été ajoutée jusqu'à ce que le pH soit neutre et le solvant a été évaporé. Le résidu a été dissout dans AcOEt et la phase organique a été lavée avec une solution de HCl 0.5 M et avec une solution saturée de NaHCO₃. La phase organique a ensuite été séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair pour donner les composés **2.149-2.151**.



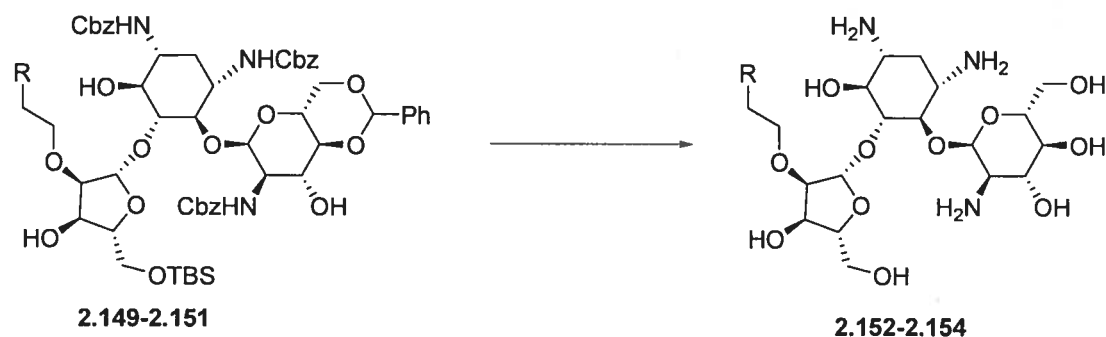
4-O-[[4,6-O-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{5-O-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-O-{2-N-(4-méthylbenzyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di-N-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.149). (64%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +10.3° (c 0.5, MeOH); R_f 0.2 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₆₄H₈₂N₄O₁₇Si [M+H]⁺: 1207.6, SM trouvée: 1208.2.



4-O-[[4,6-O-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{5-O-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-O-{2-N-(3-benzyloxycarbonylaminopropyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di-N-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.150). (77%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +14.8° (c 1.0, MeOH); R_f 0.15 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₆₇H₈₇N₅O₁₉Si [M+H]⁺: 1294.6, SM trouvée: 1294.9.

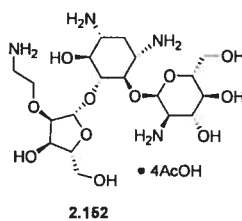


4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl-2-*O*-{2-*N*-(2-phényléthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (2.151). (82%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 3 à 5% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +11.7° (c 0.9, MeOH); R_f 0.2 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₆₄H₈₂N₄O₁₇Si [M+H]⁺: 1207.6, SM trouvée: 1207.9.

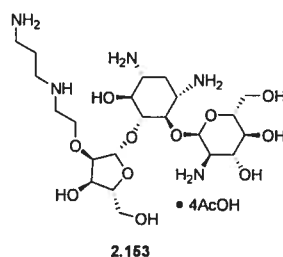


Procédure générale pour les déprotections (2.142-2.154):

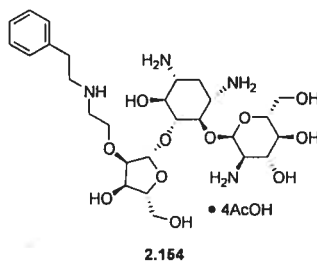
Le substrat de départ **2.149-2.151** a été dissout dans AcOH:H₂O (4:1, 3 mL) puis cette solution a été chauffée à 60 °C jusqu'à ce qu'un spectre de masse indique que le substrat de départ était complètement converti au produit avec le TBS et le benzylidène hydrolysés (généralement 2 à 5h). La solution a été refroidie à TP et une quantité catalytique (environ 20 mol %) d'hydroxyde de palladium 20% sur charbon a été ajoutée. Le mélange a été laissé sous agitation pendant 3 h sous 1 atm de H₂, puis un spectre de masse a indiqué que la réaction était terminée. Le mélange a été filtré sur un lit de célite et le filtrat a été évaporé sous pression réduite. Le résidu a été lavé avec CH₂Cl₂ (1 mL, 2 fois) puis dissout dans un minimum de H₂O et lyophilisé pour donner les composés **2.152-2.154**.



4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{2-O-(2-aminoéthyl)- β -D-ribofuranosyl}]-2-déoxystreptamine (2.152). (75%); $[\alpha]_D +6.9^\circ$ (c 0.5, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 5.67 (m, 1H), 5.34 (m, 1H), 4.35 (m, 1H), 4.22 (m, 1H), 3.99-3.12 (m, 16H), 2.81 (m, 2H), 2.21 (m, 1H), 1.82 (s, 12H), 1.53 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 182.6, 108.5, 96.4, 85.7, 83.3, 82.6, 73.9, 73.8, 73.5, 69.7, 69.6, 68.9, 66.6, 60.9, 60.6, 54.5, 50.8, 49.4, 39.8, 28.7, 23.5; *m/z* calculée pour C₁₉H₃₈N₄O₁₁ [M+H]⁺: 499.26153, SM trouvée: 499.4, SMHR trouvée: 499.26104.

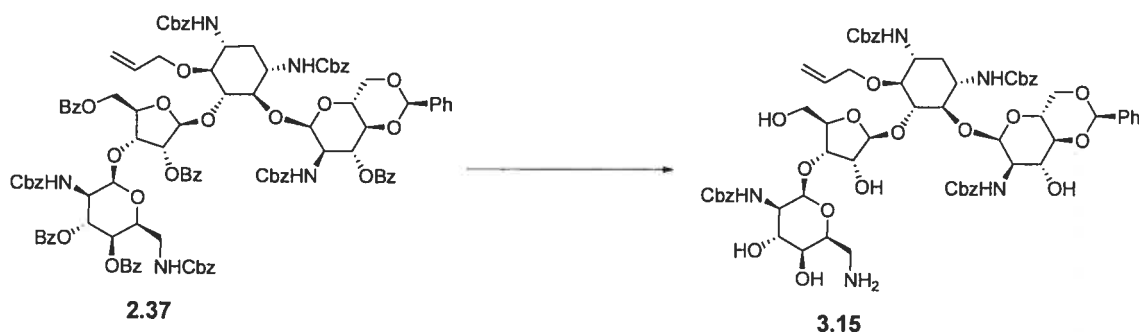


4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{2-O-{2-N-(3-aminopropyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-déoxystreptamine (2.153). (85%); $[\alpha]_D +10.8^\circ$ (c 1.0, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 5.66 (m, 1H), 5.34 (m, 1H), 4.35 (m, 1H), 4.24 (m, 1H), 3.99-2.97 (m, 20H), 2.49 (m, 2H), 2.21 (m, 1H), 2.03 (m, 2H), 1.82 (s, 15H), 1.54 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 182.3, 108.6, 96.8, 86.1, 83.7, 82.8, 80.3, 74.3, 74.1, 73.6, 70.0, 69.2, 66.0, 61.2, 61.0, 54.9, 51.1, 49.8, 48.2, 45.3, 37.3, 31.5, 24.5, 24.1; *m/z* calculée pour C₂₂H₄₅N₅O₁₁ [M+H]⁺: 556.31938, SM trouvée: 556.4; SMHR trouvée: 556.31849.

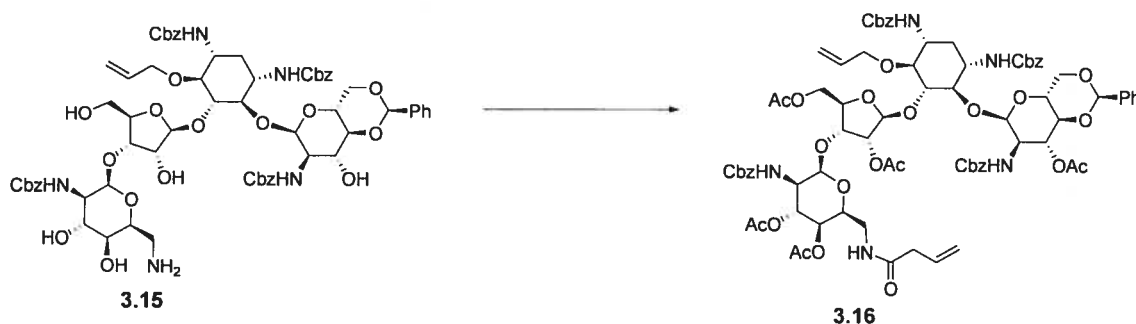


4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{2-O-{2-N-(2-phényléthyl)-aminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-2-déoxystreptamine (2.154). (85%); $[\alpha]_D +7.8^\circ$ (c 0.9, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O) δ (ppm): 7.36-7.25 (m, 5H), 5.72 (m, 1H), 5.33 (m, 1H), 4.37 (m, 1H), 4.26 (m, 1H), 3.98-2.95 (m, 20H), 2.73 (m, 2H), 2.21 (m, 1H), 1.87 (s, 12H), 1.71 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 181.4, 132.3, 131.6, 129.5, 129.2, 128.7, 127.1, 126.8, 108.8, 96.2, 95.3, 85.3, 81.6, 78.0, 74.1, 73.1, 70.7, 69.6, 69.3, 68.0, 67.7, 60.7, 60.3, 54.2, 50.3, 49.2, 43.0, 40.7, 29.2, 23.5; *m/z* calculée pour C₂₇H₄₆N₄O₁₁ [M+H]⁺: 602.3163, SM trouvée: 603.32413; SMHR trouvée: 603.32322.

6.3 Procédures expérimentales pour le Chapitre 3.

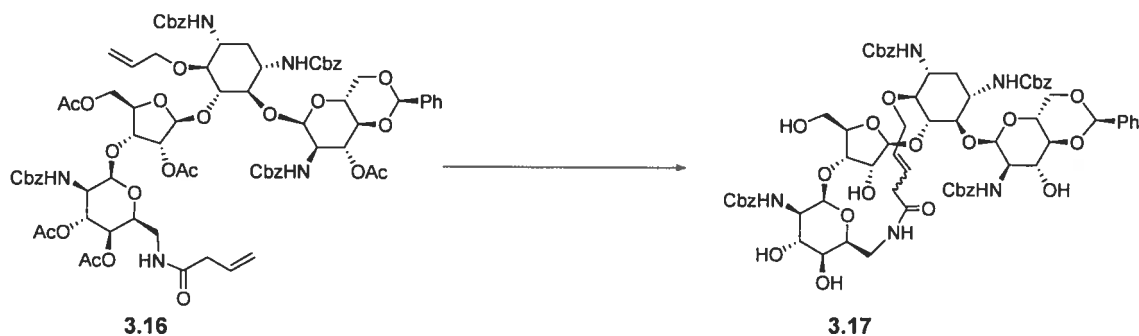


4-*O*-{[4,6-*O*-Benzyldène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(6-amino-2-benzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl]}-6-*O*-allyl-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (3.15). NaOH (0.24 g, 6.0 mmol) a été dissout dans l'eau (2.5 mL) et cette solution a été ajoutée à une solution du composé **2.37** (0.20 g, 0.10 mmol) dans dioxane (7.5 mL). Après 16h, le dioxane a été évaporé sous pression réduite, puis le composé **3.15** a été décanté sous forme d'une gomme blanche contenant de l'eau (0.33 mg). m/z calculée pour $C_{65}H_{77}N_5O_{22}$ $[M+H]^+$: 1280.5, SM trouvée: 1280.6. Cette gomme blanche contenant de l'eau a été utilisée telle quelle à la prochaine étape.

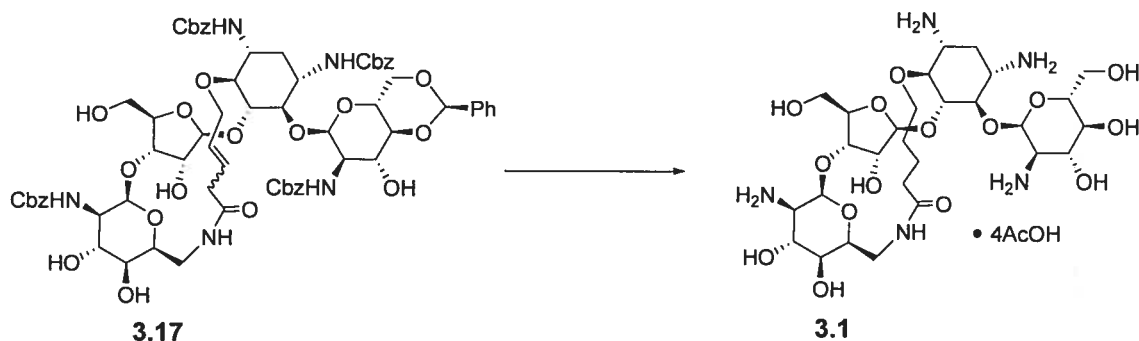


4-*O*-[3-*O*-Acétyl-4,6-*O*-benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(6-amino-3,4-di-*O*-acétyl-2-benzyloxycarbonylamino-6-*N*-(3-buténoyl)-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2,5-di-*O*-acétyl- β -D-ribofuranosyl]-6-*O*-allyl-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (3.16).

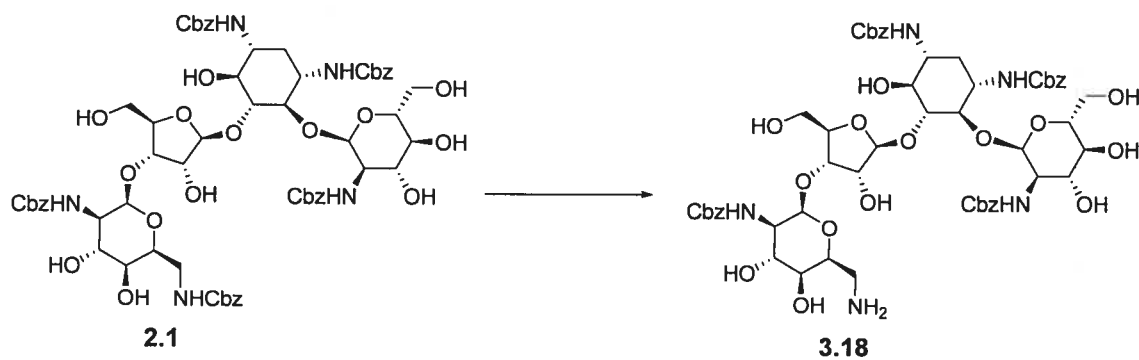
Le substrat **3.15** (0.33 g) sous forme de gomme blanche contenant de l'eau obtenu à l'étape précédente a été dissout dans CH₂Cl₂:DMF (9:1, 10 mL), puis l'acide 3-butenoïque (27 mg, 0.31 mmol) suivi d'EDC (50 mg, 0.26 mmol) et de Et₃N (0.14 mL, 1.0 mmol) ont été ajoutés. Après 4 h, un spectre de masse a montré que l'amide était le produit majoritaire. *m/z* calculée pour C₆₉H₈₁N₅O₂₃ [M+H]⁺: 1348.5, SM trouvée: 1348.5. À ce moment, pyridine (5 mL) suivie de Ac₂O (1.0 mL, 10 mmol) ont été ajoutés et les solvants ont été évaporés sous pression réduite le lendemain matin. L'huile jaune obtenue a été dissoute dans AcOEt et la phase organique a été lavée avec une solution de HCl 0.5 M et avec une solution saturée de NaHCO₃. La phase organique a été séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (AcOEt:hexane, 3:2 à 4:1) pour donner le composé **3.16** (0.14 g, 47 %); [α]_D +16.8° (c 0.7, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.10-7.60 (m, 30H), 6.28-3.05 (m, 38H), 2.23-1.80 (m, 21H), 1.43 (m, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 172.4, 171.7, 170.9, 170.4, 169.7, 166.4, 163.0, 162.5, 162.3, 161.2, 140.1, 137.4, 119.7, 117.8, 133.5-125.9 (30C), 110.7, 101.8, 101.2, 86.8, 83.1, 82.2, 81.6, 81.0, 80.4, 77.8, 76.1, 75.3, 74.6, 72.2, 71.7, 71.3, 70.9, 70.6, 69.7, 67.8, 63.3, 59.7, 54.9, 51.0, 51.5, 49.4, 42.8, 40.8, 35.7, 33.8, 26.9, 26.4, 26.0, 25.2, 24.3; *m/z* calculée pour C₇₉H₉₁N₅O₂₈ [M+H]⁺: 1558.59288, SM trouvée: 1558.9, SMHR trouvée: 1558.59143.



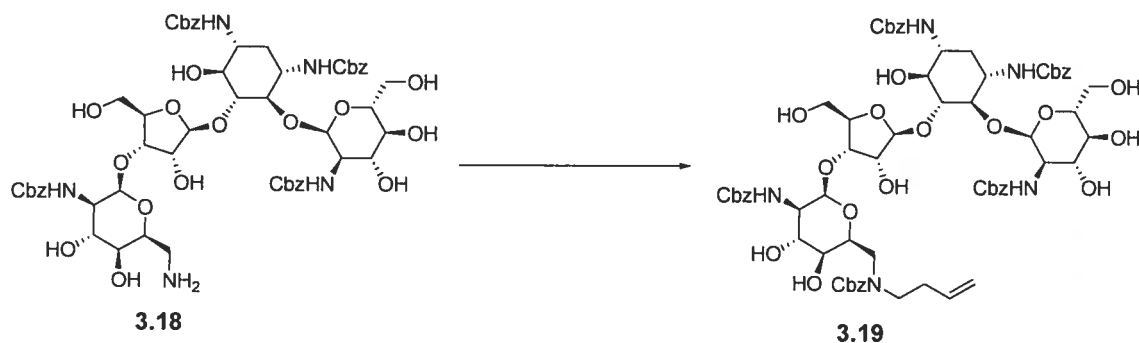
Composé 3.17. À une solution du diène **3.16** (50 mg, 0.032 mmol) dans CH_2Cl_2 (10 mL) anhydre a été ajouté 10 mole % du catalyseur de Grubbs de deuxième génération (3.0 mg, 0.0030 mmol). La solution a été chauffée à reflux pour 36 h et un spectre de masse a indiqué la formation du composé macrocyclique désiré. m/z calculée pour $\text{C}_{77}\text{H}_{87}\text{N}_5\text{O}_{28}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1530.6, SM trouvée: 1530.5. Le solvant a été évaporé et le résidu brun a été dissout dans MeOH (5 mL). Une solution fraîchement préparée de MeONa dans du MeOH a été ajoutée tranquillement jusqu'à ce que le pH atteigne 10.5. 36 h plus tard, un spectre de masse a indiqué que la réaction était terminée. À ce moment, la solution a été refroidie à -78 °C et de la glace sèche a été ajoutée jusqu'à ce que le pH soit neutre. Le solvant a été évaporé sous pression réduite et le résidu a été dissout dans AcOEt. La phase organique a été lavée avec de l'eau, séchée sur Na_2SO_4 , puis évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH_2Cl_2 a été purifié par chromatographie éclair (AcOEt:hexane 80 à 100% AcOEt) pour donner le composé **3.17**. (15 mg, 36%); $[\alpha]_{\text{D}} +11.7^\circ$ (c 0.5, CHCl_3). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.60-7.10 (m, 30H), 6.21-3.04 (m, 38H), 2.36 (m, 2H), 2.21 (m, 1H), 1.34 (m, 1H); m/z calculée pour $\text{C}_{67}\text{H}_{77}\text{N}_5\text{O}_{23}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1320.50876, SMHR trouvée: 1320.50993.



Composé 3.1. Le composé **3.17** (15 mg, 0.012 mmol) a été dissout dans AcOH:H₂O (4:1, 3 mL) puis cette solution a été chauffée à 60 °C pour 5 h. À ce moment, un spectre de masse a indiqué que le substrat de départ a été complètement converti au produit avec le benzylidène hydrolysé. *m/z* calculée pour C₆₀H₇₃N₅O₂₃ [M+H]⁺: 1232.5, SM trouvée 1232.5. La solution a été refroidie à TP et une quantité catalytique (environ 20 mol %) d'hydroxyde de palladium 20% sur charbon a été ajoutée. Le mélange a été laissé sous agitation pendant 3 h sous 1 atm de H₂, puis un spectre de masse a indiqué que la réaction était terminée. Le mélange a été filtré sur un lit de célite et les solvants ont été évaporés sous pression réduite. Le résidu obtenu a été lavé avec CH₂Cl₂ (1 mL, 2 fois), dissout dans un minimum de H₂O et lyophilisé pour donner le composé **3.1**. (6.8 mg, 63%); [α]_D +11.6° (c 0.4, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 5.62 (m, 1H), 5.21 (m, 1H), 5.08 (m, 1H), 4.37-3.10 (m, 25H), 2.38 (m, 2H), 2.14 (m, 3H), 1.78 (s, 12H), 1.41 (m, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 181.8, 177.5, 110.6, 97.0, 94.5, 85.2, 84.0, 78.8, 76.3, 75.6, 74.8, 74.4, 73.5, 73.3, 71.1, 70.1, 69.8, 68.6, 68.4, 68.1, 67.7, 63.5, 61.2, 54.6, 51.9, 50.5, 49.7, 41.3, 36.2, 29.5, 23.9; *m/z* calculée pour C₂₈H₅₁N₅O₁₅ [M+H]⁺: 698.34599, SM trouvée: 698.3, SMHR trouvée: 698.34612.

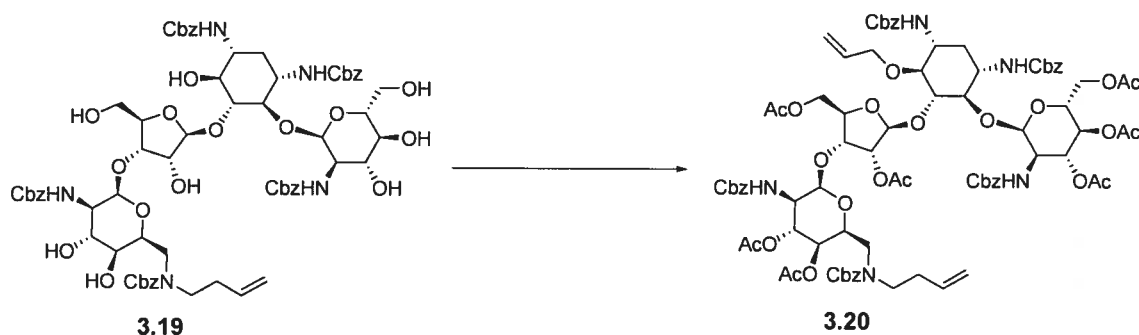


4-*O*-[2-Benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(6-amino-2-benzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (3.18). NaOH (300 mg, 7.50 mmol) a été dissout dans l'eau (5 mL) et cette solution a été ajoutée à une solution de **2.1**¹ (250 mg, 0.194 mmol) dans le dioxane (10 mL). Après 16h, le dioxane a été évaporé sous pression réduite, puis le composé **3.18** a été décanté sous forme d'une gomme blanche contenant de l'eau (360 mg). *m/z* calculée pour C₅₅H₆₉N₅O₂₂ [M+H]⁺: 1152.45124, SM trouvée: 1152.5, SMHR trouvée: 1152.45191. Cette gomme blanche contenant de l'eau a été utilisée telle quelle à la prochaine étape.

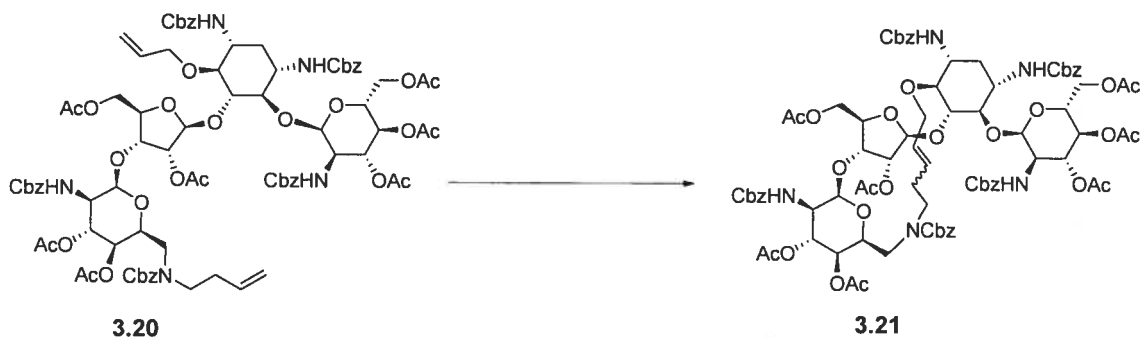


4-*O*-[2-Benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(2-6-dibenzyloxycarbonylamino-6-*N*-3-butènyl-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl]}-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (3.19).

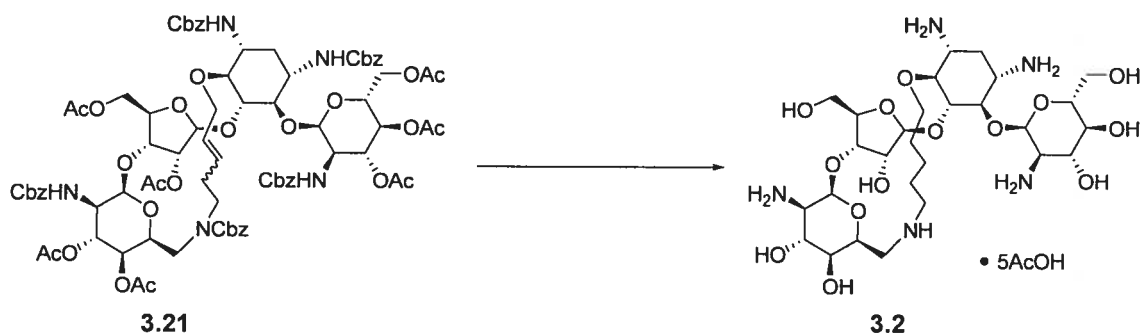
Le composé **3.18** (360 mg) sous forme de gomme blanche contenant de l'eau obtenu à l'étape précédente a été dissout dans la DMF (10 mL) et une portion de cette solution (8 mL, correspondant à 200 mg, 0.173 mmol de **3.18**) a été utilisé pour cette réaction. Le bromobut-3-ène (21 μ L, 0.21 mmol) et le NaHCO₃ (73 mg, 0.87 mmol) ont été ajoutés à la solution du composé **3.18** dans la DMF. 16 h plus tard, une autre portion de bromobut-3-ène (21 μ L, 0.21 mmol) a été ajouté. 36 h plus tard, un spectre de masse à indiqué que la réaction était terminée. m/z calculée pour C₅₉H₇₅N₅O₂₂ [M+H]⁺: 1206.5, SM trouvée: 1206.4. À ce moment, une solution de NH₄OH 6 M (1 mL) a été ajoutée pour arrêter la réaction. Les solvants ont été évaporés sous pression réduite et le solide a été mis en suspension dans un mélange de MeOH:H₂O (20:1, 20 mL). NaHCO₃ (73 mg, 0.87 mmol) a été ajouté, suivi de Cbz-Cl (50 μ L, 0.347 mmol). Le lendemain matin, la suspension a été filtrée et le filtrat a été concentré sous pression réduite. L'huile jaune obtenue a été purifiée par chromatographie éclair (5% MeOH dans CH₂Cl₂) pour donner le composé **3.19**. (95 mg, 36%); [α]_D +12.7° (c 0.9, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.63-7.11 (m, 25H), 6.21-2.63 (m, 44H), 2.49 (m, 2H), 2.23 (m, 1H), 1.42 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 163.8, 163.2, 162.9, 162.6, 162.1, 135.6, 132.3-125.8 (30C), 121.3, 111.6, 99.4, 98.7, 87.2, 83.6, 80.2, 79.5, 77.1, 76.2, 75.6, 74.9, 74.3, 72.9, 72.7, 72.0, 71.7, 71.2, 70.9, 70.7, 70.2, 69.1, 63.5, 58.2, 54.8, 53.2, 51.6, 49.5, 41.7, 36.4, 27.3; m/z calculée pour C₆₇H₈₁N₅O₂₄ [M+H]⁺: 1340.53497, SM trouvée: 1340.7, SMHR trouvée: 1340.53326.



4-*O*-[3-*O*-Acétyl-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(3,4-di-*O*-acétyl-2-6-dibenzyloxycarbonylamino-6-*N*-3-butényl-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl]-6-*O*-allyl-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-déoxystreptamine (3.20). Le composé **3.19** (95 mg, 0.071 mmol) en solution dans la pyridine (3 mL) a été traité avec Ac₂O (50 μ L, 0.53 mmol). 16 h plus tard, le solvant a été évaporé sous pression réduite et l'huile jaune obtenue a été dissoute dans AcOEt. La phase organique a été lavée avec une solution de HCl 0.5 M et avec une solution saturée de NaHCO₃, puis séchée sur Na₂SO₄ avant d'être évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (AcOEt:hexane 1:1) pour donner le produit acétylé correspondant (77 mg, 65%). *m/z* calculée pour C₈₁H₉₅N₅O₃₁ [M+H]⁺: 1634.6, SM trouvée: 1634.6. À une solution de ce composé acétylé (75 mg, 0.046 mmol) et d'iodure d'allyle (42 μ L, 0.46 mmol) dans THF anhydre (3 mL) à 0 °C a été ajoutée une solution de KHMDS 0.5 M dans du toluène (0.11 mL, 0.055 mmol). Cette solution a été amenée à TP et 12 h plus tard, une solution saturée de NH₄Cl a été ajoutée, puis les solvants ont été évaporés sous pression réduite. L'huile jaunâtre obtenue a été dissoute dans AcOEt et la phase organique a été lavée avec une solution de thiosulfate de sodium 1 M, séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (AcOEt/Hexane 2:3) pour donner le composé **3.20** (43 mg, 35 %); [α]_D +15.1° (c 0.7, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.65-7.09 (m, 25H), 6.24-2.75 (m, 49H), 2.53 (m, 2H), 2.31-1.81 (m, 22H), 1.48 (m, 1H); *m/z* calculée pour C₈₄H₉₉N₅O₃₁ [M+H]⁺: 1674.64023, SM trouvée: 1674.6, SMHR trouvée: 1674.63927.



Composé 3.21. À une solution du diène **3.20** (28 mg, 0.017 mmol) dans CH_2Cl_2 (5 mL) anhydre a été ajouté 10 mole % du catalyseur de Grubbs de deuxième génération (1.5 mg, 0.0017 mmol). La solution a été chauffée à reflux pour 24 h et un spectre de masse a indiqué la formation du composé macrocyclique **3.21** (12 mg, 43 %); $[\alpha]_{\text{D}} +11.3^\circ$ (c 0.3, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.70-7.10 (m, 25H), 6.21-2.60 (m, 47H), 2.34-1.76 (m, 22H), 1.52 (m, 1H); m/z calculée pour $\text{C}_{82}\text{H}_{95}\text{N}_5\text{O}_{31}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1646.6, SM trouvée: 1646.5.



Composé 3.2. Le composé **3.21** (12 mg, 7.3 μmol) a été dissout dans MeOH (5 mL). Une solution fraîchement préparée de MeONa dans du MeOH a été ajoutée tranquillement jusqu'à ce que le pH atteigne 10. 8 h plus tard, la solution a été refroidie à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ et de la glace sèche a été ajoutée jusqu'à ce que le pH soit neutre et le solvant a été évaporé sous pression réduite. Le résidu a été dissout dans AcOEt et la phase organique a été lavée avec de l'eau, séchée sur Na_2SO_4 , puis évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH_2Cl_2 a été purifié par chromatographie éclair (5 à 10% de MeOH dans CH_2Cl_2) pour donner le composé désacétylé (8.3 mg, 85 %). m/z calculée pour $\text{C}_{68}\text{H}_{81}\text{N}_5\text{O}_{24}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1351.5, SM trouvée: 1351.1. Ce produit désacétylé a été dissout dans AcOH:H₂O (4:1, 3 mL) et une quantité catalytique (environ 20 mol %) d'hydroxyde de palladium 20% sur charbon a été ajoutée. Le mélange a été laissé sous agitation pendant 3 h sous 1 atm de H_2 , puis un spectre de masse a indiqué que la réaction était terminée. Le mélange a été filtré sur un lit de célite et le filtrat a été évaporé sous pression réduite. Le résidu a été lavé avec CH_2Cl_2 (1 mL, 2 fois) puis dissout dans un minimum de H_2O et lyophilisé pour donner le composé **3.2**. (3.3 mg, 55%); $[\alpha]_{\text{D}} +4.8^{\circ}$ (c 0.3, H_2O); ^1H NMR (400 MHz, D_2O), δ (ppm): 5.65 (m, 1H), 5.23 (m, 1H), 5.11 (m, 1H), 4.46-3.12 (m, 24H), 2.58 (m, 2H), 2.33 (m, 1H), 1.81 (s, 15H), 1.74-1.15 (m, 7H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O), δ (ppm): 182.6, 109.7, 96.8, 94.1, 84.7, 81.5, 77.4, 75.3, 74.6, 73.8, 71.5, 70.8, 69.7, 69.5, 68.1, 67.6, 60.4, 59.8, 57.4, 54.3, 51.0, 50.2, 49.1, 40.6, 38.7, 29.9, 28.7, 28.0, 23.8, 20.6; m/z calculée pour $\text{C}_{28}\text{H}_{53}\text{N}_5\text{O}_{14}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 684.35890, SM trouvée: 684.5, SMHR trouvée: 684.35685.

Expression et purification de l'APH(3')-IIIa.

L'APH(3')-IIIa a été exprimée par *Escherichia coli* BL21(DE3) en utilisant le plasmide pET-SACG1,¹ gracieusement fourni par le Dr. Albert Berghuis (reçu du Dr. Gerard D. Wright). La purification de l'enzyme a été réalisée selon le protocole standard⁴ avec les modifications suivantes : Les bactéries contenant le plasmide ont été cultivées à 37 °C dans 1 L du milieu de culture Luria-Bertani jusqu'à la moitié de la phase logarithmique. 3 h après l'induction de l'expression de l'APH(3')-IIIa, les cellules ont été collectées par centrifugation et rincées avec une solution saline isotonique (0.85% NaCl). Les cellules ont ensuite été remises en suspension dans le tampon pour briser les parois cellulaires, puis soniquées. Les débris cellulaires ont été séparés par une centrifugation pendant 20 min à 10000 g et la fraction soluble a été directement purifiée par une chromatographie à échange d'anion (50 mL, Q-Sepharose Fast flow). Les protéines ont été éluées avec un gradient linéaire de 0 à 500 mM NaCl avec le tampon B (50 mM Tris-Cl pH 8.0, 1 mM EDTA, 1 M NaCl). Les fractions qui ont montré une activité de phosphotransférase en présence de la kanamycine, selon le protocole standard,⁴ ont été combinées et concentrées. Une chromatographie sur Superose 12 (colonne de 2.5cm × 35 cm) avec le tampon A (50 mM Tris-Cl pH 8.0, 1 mM EDTA) a permis l'élimination des sels et des autres protéines minoritaires présentes dans l'échantillon pour fournir 120 mg de la protéine par litre de culture. La pureté a été jugée satisfaisante par une électrophorèse avec 15% SDS-PAGE (voir Figure 6.2 à la page suivante). La concentration finale en protéine a été déterminée par le dosage de Bradford.⁵ Après concentration, l'APH(3')-IIIa a été entreposée dans une solution aqueuse contenant 20% de glycérol à -20 °C jusqu'aux utilisations ultérieures. Les chromatographies décrites ci-haut ont été réalisées en utilisant un appareil Äkta purifier FPLC system (Amersham Biosciences, maintenant GE).



Figure 6.2 Gel SDS-PAGE de l'APH(3')-IIIa. (a) Avant l'expression de l'enzyme; (b) Après l'expression de l'enzyme; (c) Après la chromatographie à échange d'anion (Q-Sepharose); (d) Enzyme recueillie après la chromatographie sur Superose et utilisée pour les mesures cinétiques subséquentes.

Cinétique de l'APH(3')-IIIa à 4 °C.

Les paramètres cinétiques des phosphorylations ont été mesurés selon le protocole standard⁴ avec les modifications suivantes : le 2-amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol (Tris), le KCl, le MgCl₂, le phosphoénol du pyruvate (PEP), l'ATP, le NADH, la kinase du pyruvate, la déshydrogénase du lactate et l'APH(3')-IIIa (1 μL/mL de tampon de réaction) ont été mélangés ensemble et conservés à 4 °C. Les phosphorylations ont été initiées par l'ajout d'une solution de l'aminoglycoside (complété à 100 μL avec le tampon de réaction sans enzyme) à 1 mL de cette solution dans une cuvette à l'intérieur du spectrophotomètre (Varian Cary UV 100-Bio) thermostaté à 4 °C. Les vitesses de phosphorylation ont été déterminées en suivant la baisse d'absorbance à 340 nm en utilisant un coefficient d'extinction de 6220 cm⁻¹M⁻¹ pour le NADH.

Pour la paromomycine ainsi que pour les composés **2.46**, **2.48**, **3.1**, **3.38**, **3.42**, **3.57**, les vitesses de phosphorylation ont été déterminées en duplicata pour au moins 10 concentrations différentes et, lorsque possible, régulièrement dispersées autour des valeurs de leur K_m respectifs (généralement entre 0 et 300 μM).

Détermination du site de phosphorylation du composé 3.1

Les phosphorylations ont été réalisées selon le protocole standard⁴ avec les modifications décrites ci-haut. Après un temps de réaction déterminé, 30 μL d'une solution aqueuse contenant 40% d'acide trichloracétique ont été ajoutés à la cuvette pour dénaturer l'APH(3')-IIIa et ainsi arrêter la phosphorylation. Après une centrifugation, le supernageant a été lyophilisé et mis en suspension dans 100 μL d'eau puis filtré. Un aliquot a ensuite été injecté dans le spectromètre de masse pour identifier les pics moléculaires. Une analyse LC-MS subséquente en utilisant des conditions hautement énergétiques a ensuite été réalisée pour induire la fragmentation. Une comparaison des données expérimentales avec le patron de fragmentation connu pour les antibiotiques aminoglycosidiques⁶ nous a permis de déterminer le site de phosphorylation.

La réaction de phosphorylation de la paromomycine (100 μM , temps de réaction: 5 min.) a été traitée comme décrit ci-haut et utilisée pour déterminer les conditions LC-MS appropriées. Les paromomycines mono- et bis-phosphorylées ont été séparées avec une colonne Phenomex, Luna CN 5 μ , 150 x 4.60 mm en utilisant un gradient de 80% à 10% de MeOH dans l'eau sur une durée de 20 min. Le spectromètre de masse utilisé pour cette expérience a été un Agilent LCMSD-TOF opéré en mode positif. Le premier composé ayant élué a été la paromomycine bis-phosphorylée **3.25** (RT 12.30 min, SM calculée pour $\text{C}_{23}\text{H}_{47}\text{N}_5\text{O}_{20}\text{P}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 776.23679, SMHR trouvée: 776.23615), suivi des paromomycine mono-phosphorylée **3.26-3.27** qui ont virtuellement co-élus (RT 12.86 min, SM calculée pour $\text{C}_{23}\text{H}_{46}\text{N}_5\text{O}_{17}\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 696.27046, SMHR trouvée: 696.27136) (Figure 6.3).

Lors de l'analyse du patron de fragmentation de la paromomycine mono-phosphorylée, nous avons observé que deux isomères ont virtuellement co-élus. Le composé majoritaire **3.26** a produit le fragment **3.28** (SM calculée pour $\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_{13}\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 535.20165, SMHR trouvée: 535.20162) et le fragment complémentaire **3.29** (SM calculée pour $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 162.07663, SMHR trouvée: 162.07825) ce qui nous a permis de localiser le phosphate sur les cycles II, III ou IV (Figure 6.3). Cette observation est en accord avec les données publiées qui soutiennent que la phosphorylation initiale la plus abondante est sur l'alcool 5''-OH du cycle III.⁷ Cette assignation a aussi été supportée par la présence d'une seconde paire de fragments

complémentaires: **3.30** (SM calculée pour $C_{12}H_{25}N_3O_7$ $[M+H]^+$: 324.17708, SMHR trouvée: 324.17728) et **3.31** (SM calculée pour $C_{11}H_{23}N_2O_{10}P$ $[M+H]^+$: 375.11686, SMHR trouvée: 375.11712). Une série de pics correspondant à la paromomycine mono-phosphorylée minoritaire **3.27** ont aussi été détectés. Le fragment **3.32** (SM calculée pour $C_6H_{12}NO_7P$, $[M+H]^+$: 242.04296, SMHR trouvée: 242.04545) localise le groupement phosphate sur le cycle I, ce qui est en accord avec les données publiées pour la phosphorylation initiale moins abondante à la position 3'-OH du cycle I.⁷ L'identification de fragments supplémentaires a appuyé cette assignation: fragment **3.33** (SM calculée pour $C_{17}H_{34}N_4O_{10}$ $[M+H]^+$: 455.23532, SMHR trouvée: 455.23627), **3.34** (SM calculée pour $C_{12}H_{26}N_3O_{10}P$ $[M+H]^+$: 404.14341, SMHR trouvée: 404.14412) et **3.35** (SM calculée pour $C_{11}H_{22}N_2O_7$ $[M+H]^+$: 295.15053, SMHR trouvée: 295.15069).

La même approche expérimentale a été utilisée pour localiser le site de la phosphorylation pour le composé **3.1**. La réaction de phosphorylation du composé **3.1** (100 μ M, temps de réaction: 30 min.) a été traitée et analysée comme décrit ci-haut. Nous n'avons pas observé de composé bis-phosphorylé selon les conditions expérimentales que nous avons utilisées. Le patron de fragmentation du composé mono-phosphorylé **3.22** (RT: 12.54 min, SM calculée pour $C_{28}H_{52}N_5O_{18}P$ $[M+H]^+$: 778.31232, SMHR trouvée: 778.31451) a été étudié pour déterminer le site de phosphorylation (Figure 6.3). Le principal fragment observé a été **3.23** (SM calculée pour $C_{22}H_{41}N_4O_{14}P$ $[M+H]^+$: 617.24351, SMHR trouvée: 617.24357) qui localise le phosphate sur les cycles II, III ou IV. Le fragment complémentaire **3.24**, correspondant au cycle I non-phosphorylé a aussi été observé (SM calculée pour $C_6H_{11}NO_4$ $[M+H]^+$: 162.07663, SMHR trouvée: 162.07825). Les fragments correspondants aux cycles II-III-IV non-phosphorylés et au cycle I phosphorylé n'ont pas été observés. Par analogie avec des études déjà publiées,⁷ nous assumons que le site de phosphorylation des cycles II-III-IV de l'analogue **3.1** de la paromomycine est l'alcool 5''-OH.

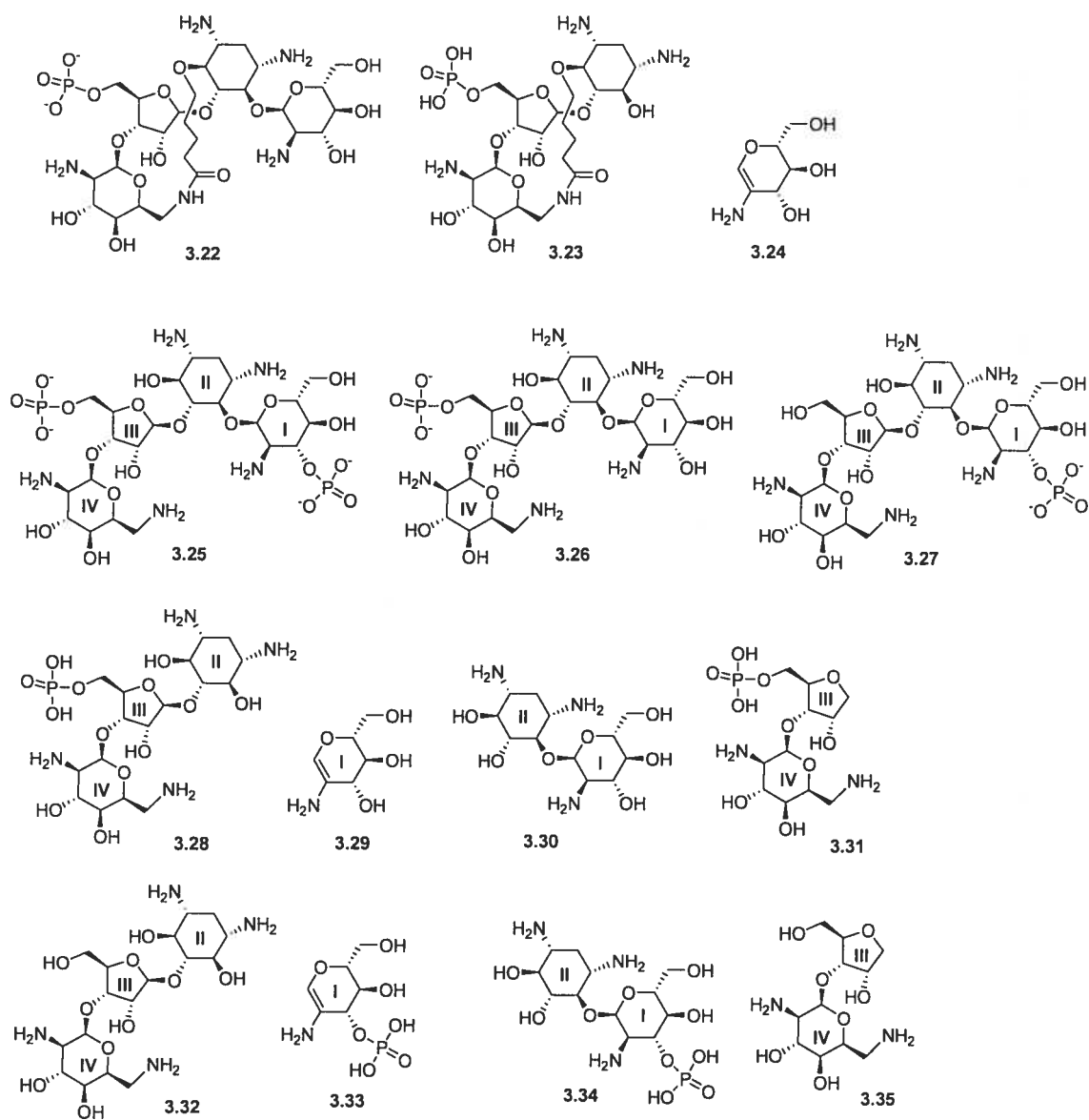
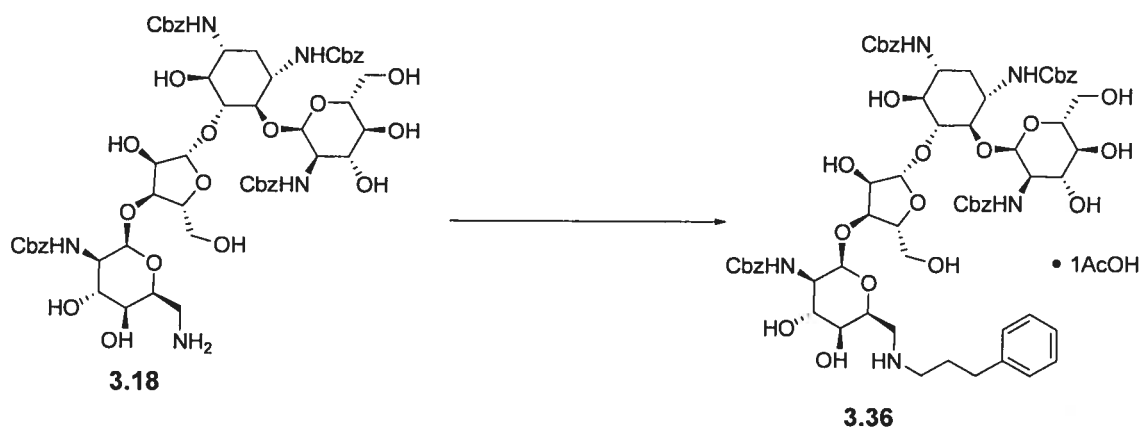
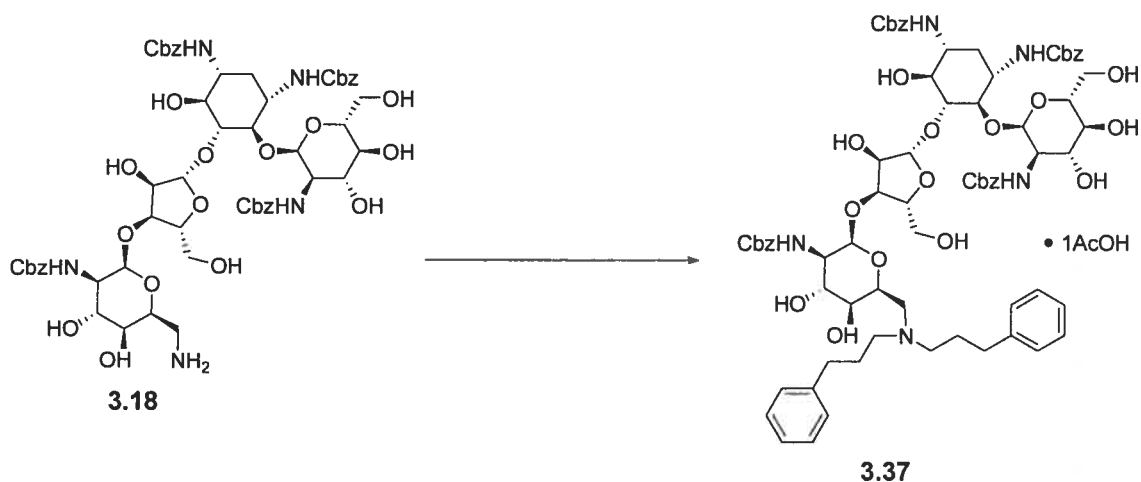


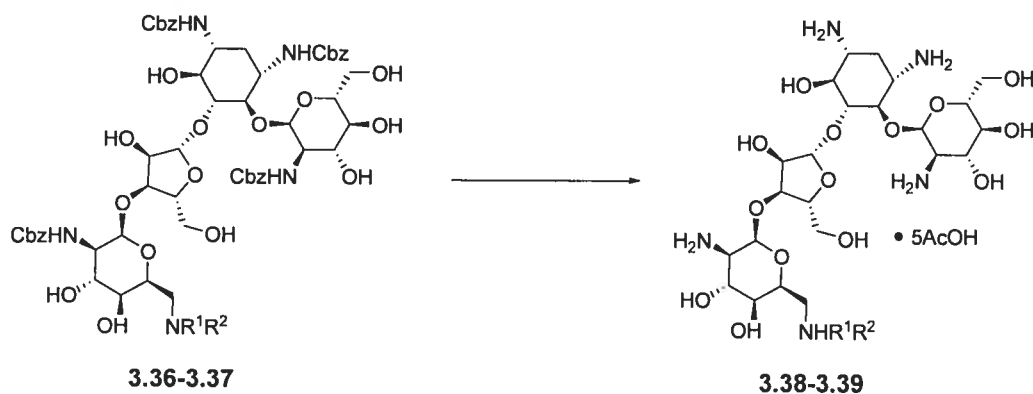
Figure 6.3. Fragments observés en spectrométrie de masse pour la paromomycine et le composé **3.1** phosphorylés.



4-*O*-[2-Benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(6-amino-2-benzyloxycarbonylamino-6-*N*-3-phénylpropyl-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (3.36). Au composé **3.18** (200 mg, 0.173 mmol) dissout dans MeOH (10 mL), AcOH (0,3 mL) a été ajouté suivie du 3-phénylpropanal (34.0 μ L, 0,260 mmol). Le NaBH₃CN 1 M dans THF (0.174 mL, 0.174 mmol) a été ajouté et le lendemain matin le solvant a été évaporé sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (5 à 25% MeOH dans CH₂Cl₂) pour donner le composé **3.36** (164 mg, 71%). *m/z* calculée pour C₆₄H₇₉N₅O₂₂ [M+H]⁺: 1270.5, SM trouvée: 1271.0.

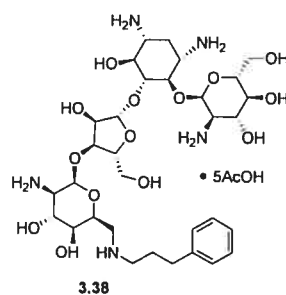


4-*O*-[2-Benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(6-amino-2-benzyloxycarbonylamino-6,6-di-*N*-3-phénylpropyl-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (3.37). Au composé **3.18** (200 mg, 0.173 mmol) dissout dans MeOH (10 mL), AcOH (0,3 mL) a été ajouté suivie du 3-phénylpropanal (0.114 mL, 0,868 mmol). Le NaBH₃CN 1 M dans THF (0.434 mL, 0.434 mmol) a été ajouté et le lendemain matin le solvant a été évaporé sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (5 à 25% MeOH dans CH₂Cl₂) pour donner le composé **3.37** (223 mg, 89%). *m/z* calculée pour C₇₃H₈₉N₅O₂₂ [M+H]⁺: 1388.6, SM trouvée: 1388.9.



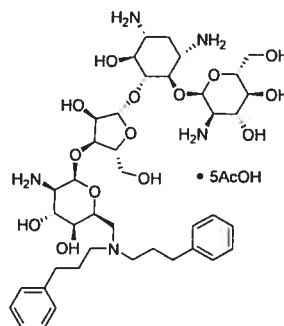
Procédure générale pour les déprotections finales (3.38-3.39):

Le substrat de départ (3.36-3.37) a été dissout dans AcOH:H₂O (4:1, 3 mL) et une quantité catalytique (environ 20 mol %) d'hydroxyde de palladium 20% sur charbon a été ajoutée. Le mélange a été laissé sous agitation pendant 3 h sous 1 atm de H₂, puis un spectre de masse a indiqué que la réaction était terminée. Le mélange a été filtré sur un lit de célite et le filtrat a été évaporé sous pression réduite. Le résidu a été lavé avec CH₂Cl₂ (1 mL, 2 fois) puis dissout dans un minimum de H₂O et lyophilisé pour donner les composés (3.38-3.39).



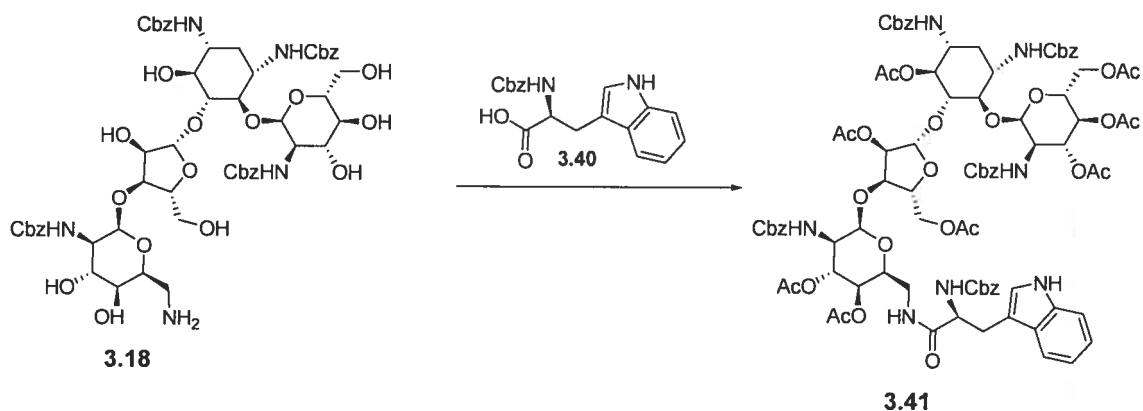
4-O-[{2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5-O-{3-O-(2,6-diamino-6-N-(3-phénylpropyl)-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (3.38). (85%); $[\alpha]_D +14.8^\circ$ (c 1.0, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 7.36-7.13 (m, 5H), 5.81 (m, 1H), 5.42 (m, 1H), 5.33 (m, 1H), 4.51 (m, 1H) 4.37-4.04 (m, 5H), 3.92-3.48 (m, 12H), 3.40-3.26 (m, 4H), 2.73-2.57 (m, 4H) 2.41 (m, 1H), 1.91 (s, 15H), 1.76-1.64 (m, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 181.7, 142.6, 129.5 (2C), 128.8 (2C), 125.4, 110.7, 96.8, 95.2, 84.6, 81.6, 77.6, 75.7, 74.8, 74.0, 72.6, 69.1, 68.8, 68.0, 67.6, 63.4, 60.9, 60.5, 54.3, 51.5, 50.4, 48.6, 38.5, 36.7,

36.0, 33.7, 28.2, 23.6; m/z calculée pour $C_{32}H_{55}N_5O_{14}$ $[M+H]^+$: 734.38238, SM trouvée: 734.4, SMHR trouvée: 734.38126.

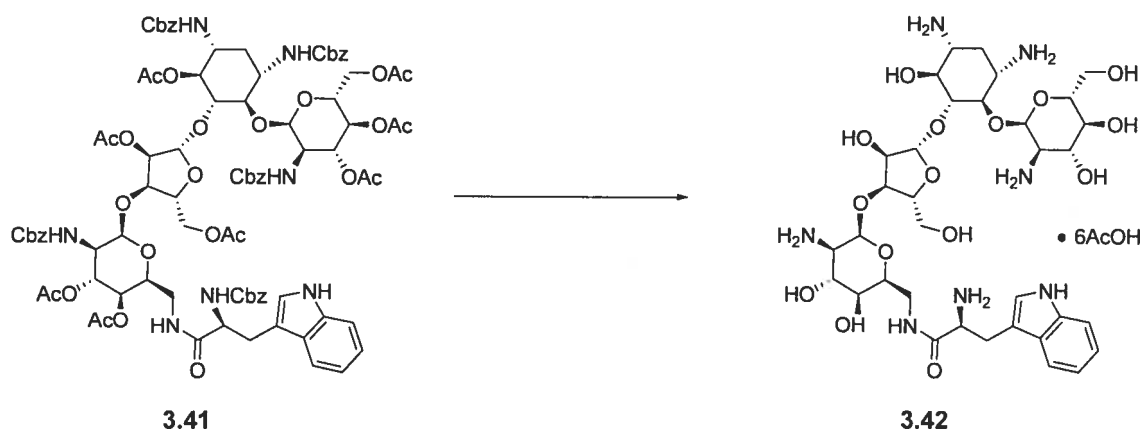


3.39

4-O-[{2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5-O-{3-O-(2,6-diamino-6,6-di-N-3-phénylpropyl-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (3.39). (80%); $[\alpha]_D +11.3^\circ$ (c 1.0, H_2O); 1H NMR (400 MHz, D_2O), δ (ppm): 7.41-7.06 (m, 10H), 5.72 (m, 1H), 5.44 (m, 1H), 5.31 (m, 1H), 4.48 (m, 1H) 4.35-4.00 (m, 5H), 3.95-3.47 (m, 12H), 3.43-3.22 (m, 4H), 2.75-2.52 (m, 8H) 2.36 (m, 1H), 1.87 (s, 15H), 1.80-1.62 (m, 5H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O), δ (ppm): 180.9, 141.3(2C), 128.1 (4C), 127.6 (4C), 124.2 (2C), 110.6, 96.5, 95.8, 85.3, 81.4, 77.7, 75.4, 74.2, 73.9, 72.3, 68.6, 68.3, 67.5, 67.2, 63.1, 60.7, 60.5, 54.7, 51.5, 50.2, 47.8, 36.9, 36.4 (2C), 33.2 (2C), 31.8 (2C), 28.2, 23.6; m/z calculée pour $C_{41}H_{65}N_5O_{14}$ $[M+H]^+$: 852.46063, SM trouvée: 852.7, SMHR trouvée: 852.45873.

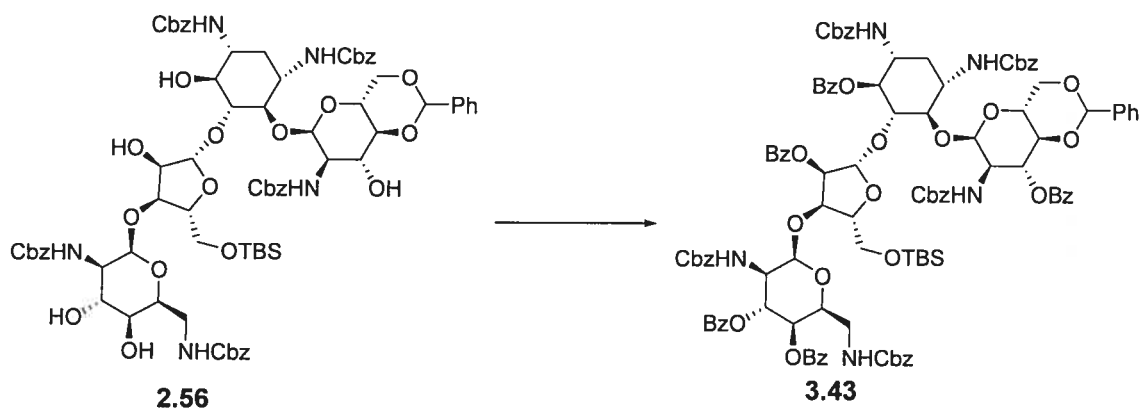


4-*O*-[3,4,6-Tri-*O*-acétyl-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(3,4-di-*O*-acétyl-6-amino-2-benzyloxycarbonylamino-6-*N*-(*L*-tryptophanoyl)-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2,5-di-*O*-acétyl- β -D-ribofuranosyl]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (3.41). Le composé **3.18** (200 mg, 0.174 mmol), l'acide **3.40** (176 mg, 0.521 mmol), HOBT (82.0 mg, 0.608 mmol) et la triéthylamine (73.0 μ L, 0.521 mmol) sont dissout dans le CH₂Cl₂ (10 mL) et EDC (103 mg, 0.538 mmol) est ajouté à 0 °C. Après 3 h, une solution saturée de NH₄Cl 2 M est ajoutée et la phase organique est séparée, lavée avec HCl 0.5 M, puis séchée avec Na₂SO₄ avant d'être évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (AcOEt:hexane, 1:1) pour donner le composé **3.41** (245 mg, 78%), *m/z* calculée pour C₉₀H₁₀₁N₇O₃₃ [M+H]⁺: 1808.6, SM trouvée: 1808.8.



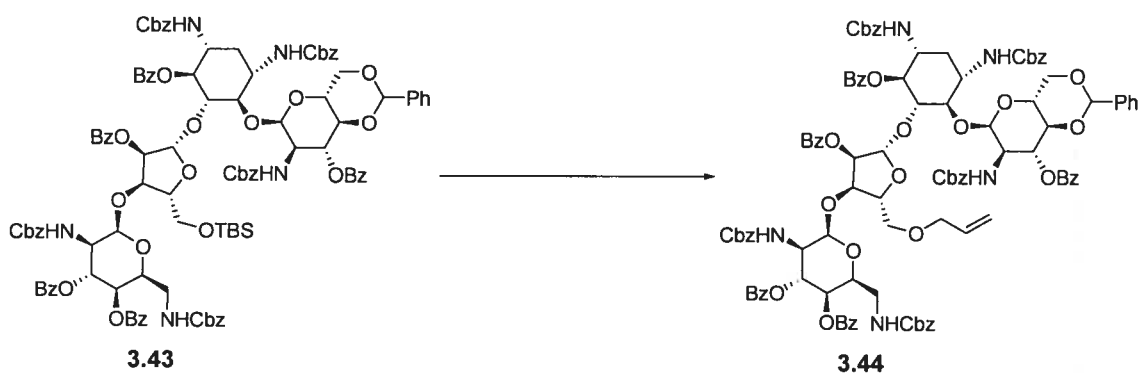
4-O-[[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-diamino-6-N-(L-tryptophanoyl)-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (3.42). Le composé **3.41** (100 mg, 0.0550 mmol) a été dissout dans MeOH (5 mL). Une solution fraîchement préparée de MeONa dans du MeOH a été ajoutée tranquillement jusqu'à ce que le pH atteigne 10. 8 h plus tard, la solution a été refroidie à -78 °C et de la glace sèche a été ajoutée jusqu'à ce que le pH soit neutre et le solvant a été évaporé sous pression réduite. Le résidu a été dissout dans AcOEt et la phase organique a été lavée avec de l'eau, séchée sur Na_2SO_4 , puis évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH_2Cl_2 a été purifié par chromatographie éclair (3 à 7% de MeOH dans CH_2Cl_2) pour donner le composé désacétylé (62.2 mg, 76 %). m/z calculée pour $\text{C}_{74}\text{H}_{85}\text{N}_7\text{O}_{25}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1472.6, SM trouvée: 1472.9. Ce composé désacétylé (62 mg, 0.042mmol) a été dissout dans AcOH:H₂O (4:1, 3 mL) et une quantité catalytique (environ 20 mol %) d'hydroxyde de palladium 20% sur charbon a été ajoutée. Le mélange a été laissé sous agitation pendant 3 h sous 1 atm de H₂, puis un spectre de masse a indiqué que la réaction était terminée. Le mélange a été filtré sur un lit de célite et le filtrat a été évaporé sous pression réduite. Le résidu a été lavé avec CH_2Cl_2 (1 mL, 2 fois) puis dissout dans un minimum de H₂O et lyophilisé pour donner le composé **3.42**. (21.3 mg, 45%); $[\alpha]_{\text{D}} +26.2^\circ$ (c 1.0, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 7.67-7.08 (m, 5H), 5.66 (m, 1H), 5.31 (m, 1H), 5.07 (m, 1H), 4.47 (m, 1H), 4.21-4.03 (m, 5H), 3.93-3.48 (m, 15H), 3.44-3.12 (m, 8H), 2.27 (m, 1H), 1.89 (s, 18H), 1.66 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 181.5, 168.2, 137.3, 128.2, 127.6, 123.5, 121.2, 119.8, 113.6, 110.1, 108.9, 96.6, 95.6, 85.6, 81.6,

78.1, 74.5, 74.3, 73.5, 71.2, 69.9, 69.6, 68.4, 68.0, 66.2, 60.9, 60.1, 57.4, 54.6, 51.8, 51.6, 50.7, 49.5, 47.1, 41.1, 30.4, 29.5, 23.6; m/z calculée pour $C_{34}H_{55}N_7O_{15}$ $[M+H]^+$: 802.38344, SM trouvée: 802.3, SMHR trouvée: 802.38104.



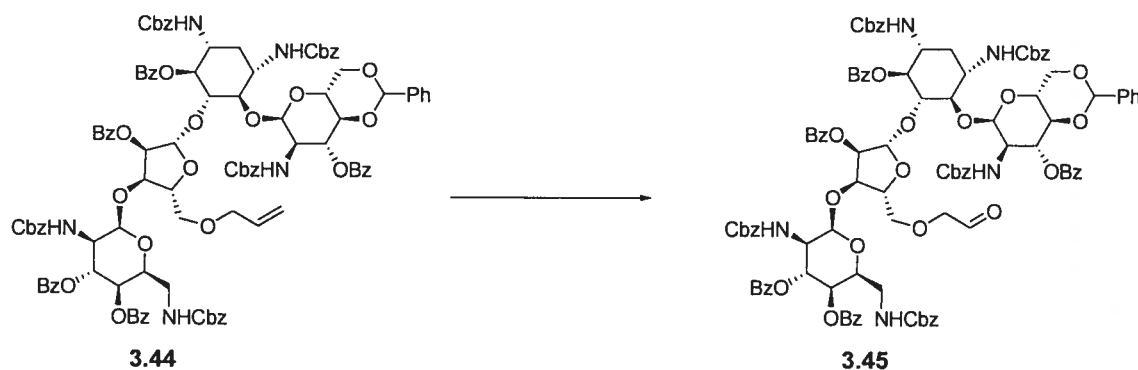
4-*O*-[3-*O*-Benzoyl-4,6-*O*-benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(3,4-di-*O*-benzoyl-2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-*O*-benzoyl-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl- β -D-ribofuranosyl]}-6-*O*-benzoyl-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (3.43).

(3.43). Du chlorure de benzoyle (850 μ L, 7.25 mmol) a été ajouté à une solution du composé **2.56** (540 mg, 0.362 mmol) dans la pyridine (20 mL) contenant du DMAP (176 mg, 1.44 mmol). Après 24 h à 70 °C, la solution a été refroidie à TP et de l'eau (1 mL) a été ajoutée, puis les solvants ont été évaporés sous pression réduite. Le résidu a été dissout dans AcOEt et la phase organique a été lavée avec une solution de HCl 0.5 M et avec une solution saturée de $NaHCO_3$, puis séchée sur Na_2SO_4 avant d'être évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH_2Cl_2 a été purifié par chromatographie éclair (AcOEt:hexane 2:3) pour donner le composé **3.43** (510 mg, 70%); R_f 0.4 (1:1 AcOEt:hexane); $[\alpha]_D +37.9^\circ$ (c 1.15, $CHCl_3$); 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 8.11-7.08 (m, 55H), 6.28-3.05 (m, 36H), 2.21 (m, 1H), 1.42 (m, 1H), 0.81 (s, 9H), 0.02 (s, 6H); m/z calculée pour $C_{111}H_{113}N_5O_{29}Si$ $[M+H]^+$: 2008.73687, SMHR trouvée: 2008.73984.

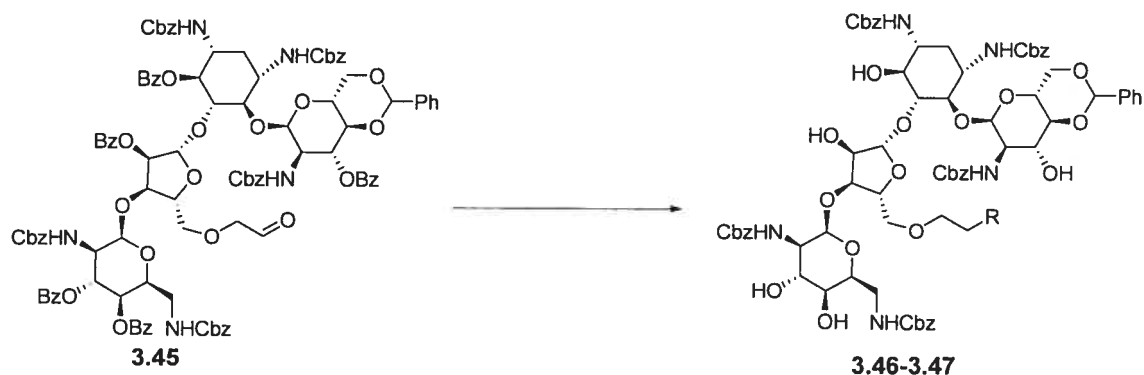


4-*O*-[3-*O*-Benzoyl-4,6-*O*-benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(3,4-di-*O*-benzoyl-2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-allyl-2-*O*-benzoyl- β -D-ribofuranosyl]-6-*O*-benzoyl-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (3.44). Une solution 1 M de fluorure de tétrabutyle d'ammonium dans le THF (2.00 mL, 2.00 mmol) a été ajoutée à une solution du composé **3.43** (420 mg, 0.209 mmol) et AcOH (120 μ L, 2.00 mmol) dans THF (20 mL). Après 16 h, le solvant a été évaporé sous pression réduite et le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (AcOEt:hexane, 2:1) pour fournir le composé avec l'alcool 5''-OH libre (202 mg, 51%); R_f 0.5 (AcOEt:hexane, 3:2); [α]_D +25.16 (c 0.93, CHCl₃); *m/z* calculée pour C₁₀₅H₉₉N₅O₂₉ [M+H]⁺: 1894.9; SM trouvée: 1895.0. À une solution de ce composé (120 mg, 0.0630 mmol) et d'iodure d'allyle (58.2 μ L, 0.630 mmol) dans THF anhydre (3 mL) à 0 °C a été ajoutée une solution de KHMDS 0.5 M dans du toluène (152 μ L, 0.0760 mmol). Cette solution a été amenée à TP et 12 h plus tard, une solution saturée de NH₄Cl a été ajoutée, puis les solvants ont été évaporés sous pression réduite. L'huile jaunâtre a été dissoute dans AcOEt et la phase organique a été lavée avec une solution de thiosulfate de sodium 1 M, séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (AcOEt:hexane, 2:3) pour donner le composé **3.44** (71.4 mg, 58%); R_f 0.6 (1:1 AcOEt:hexane); [α]_D +39.6° (c 0.84, CHCl₃); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.16-7.11 (m, 55H), 6.30-3.00 (m, 41H), 2.17 (m, 1H), 1.41 (m, 1H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 168.4, 168.3, 167.8, 167.7, 167.1, 162.3, 162.0, 161.8, 161.5, 161.2, 139.6, 117.5, 133.4-126.3 (66C), 110.7, 101.3, 100.8, 86.4, 84.2, 82.5, 81.8, 81.3,

79.7, 78.2, 76.8, 75.9, 75.6, 74.7, 74.1, 71.3, 70.9, 70.1, 69.6, 69.3, 68.7, 68.0, 63.6, 54.2, 51.7, 51.4, 49.3, 43.6, 36.2, 35.1; m/z calculée pour $C_{108}H_{103}N_5O_{29}$ $[M+H]^+$: 1934.68190, SM trouvée: 1934.9, SMHR trouvée: 1934.68326.

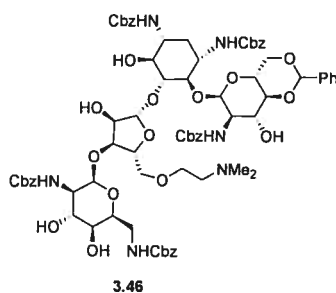


4-*O*-[3-*O*-Benzoyl-4,6-*O*-benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(3,4-di-*O*-benzoyl-2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-*O*-benzoyl-5-*O*-(2-éthanal)- β -D-ribofuranosyl]]-6-*O*-benzoyl-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (3.45). Le composé **3.44** (100 mg, 0.0517 mmol) a été dissout dans CH_2Cl_2 (5 mL) et cette solution a été refroidie à -78 °C. De l'ozone a été bullé dans le ballon jusqu'à ce que la solution devienne bleue pâle et 1 h plus tard de l'argon a été bullé dans le ballon pour enlever l'excès d'ozone. Par la suite, Ph_3P (40.6 mg, 0.299 mmol) a été ajouté et la solution a été réchauffée à TP. 2h plus tard, le solvant a été évaporé sous pression réduite et le résidu dissout dans un minimum de CH_2Cl_2 a été purifié par chromatographie éclair (AcOEt:hexane, 2:3) pour donner l'aldéhyde **3.45** (60.3 mg, 60%); R_f 0.4 (1:1 AcOEt:hexane); m/z calculée pour $C_{107}H_{101}N_5O_{30}$ $[M+H]^+$: 1936.7; SM trouvée: 1936.9.



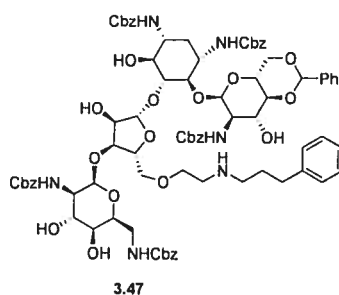
Procédure générale pour les aminations réductrices suivies du traitement avec méthanolate de sodium (3.46-3.47):

L'aldéhyde **3.45** (30.2 mg, 0.0155 mmol) ainsi que l'amine appropriée (0.155 mmol) ont été dissouts dans MeOH (3 mL). Par la suite, AcOH (0.1 mL) suivi d'une solution de NaBH₃CN 1 M dans du THF (155 µL, 0.155 mmol) ont été ajoutés. Le lendemain matin, une CCM a indiquée que l'aldéhyde était complètement consommé. Une solution fraîchement préparée de MeONa dans du MeOH a été ajoutée tranquillement jusqu'à ce que le pH atteigne 10.5. La solution a été agitée jusqu'à ce qu'un spectre de masse indique que la réaction était terminée (24 à 36h). À ce moment, la solution a été refroidie à -78 °C et de la glace sèche a été ajoutée jusqu'à ce que le pH soit neutre. Le résidu a été dissout dans AcOEt et la phase organique a été lavée avec une solution de HCl 0.5 M et avec une solution saturée de NaHCO₃, puis séchée sur Na₂SO₄ avant d'être évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair pour donner les composés **3.46-3.47**.

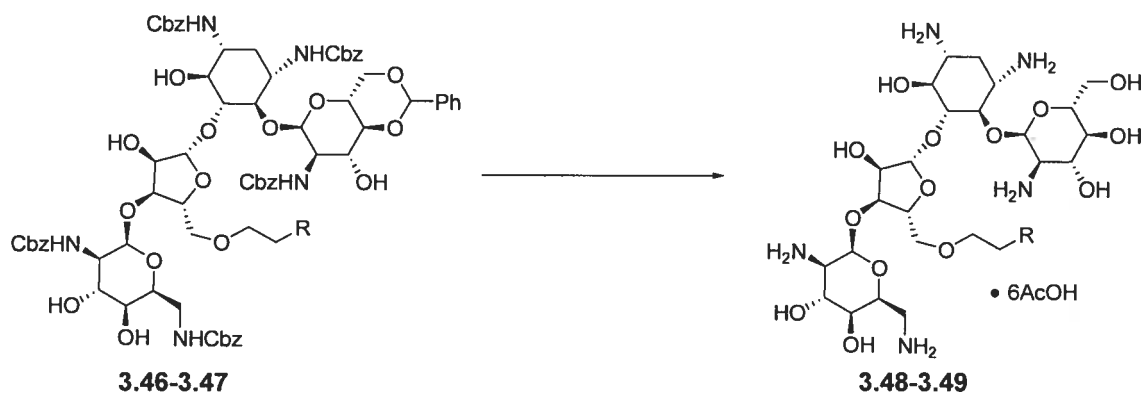


4-O-[[4,6-O-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-O-{3-O-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-O-{2,2-di-N-diméthylaminoéthyl}- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di-N-

benzyloxycarbonyl-2-déoxystreptamine (3.46). (64%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 5% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +18.5° (c 0.5, MeOH); R_f 0.3 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₇₄H₈₈N₆O₂₄ [M+H]⁺: 1445.6, SM trouvée: 1445.9.

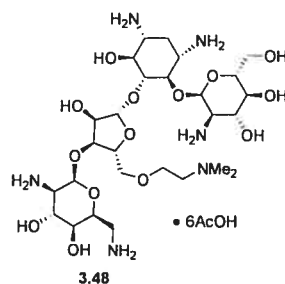


4-O-[(4,6-O-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy-α-D-glucopyranosyl)-5-O-(3-O-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy-α-L-idopyranosyl)-5-O-(2-N-(3-phénylpropyl)-aminoéthyl)-β-D-ribofuranosyl)]-1,3-di-N-benzyloxycarbonyl-2-déoxystreptamine (3.47). (75%); éluant pour la purification par chromatographie éclair: 5% MeOH dans CH₂Cl₂; [α]_D +12.3° (c 0.5, MeOH); R_f 0.3 (5% MeOH dans CH₂Cl₂); *m/z* calculée pour C₈₁H₉₄N₆O₂₄ [M+H]⁺: 1535.6, SM trouvée: 1536.0.



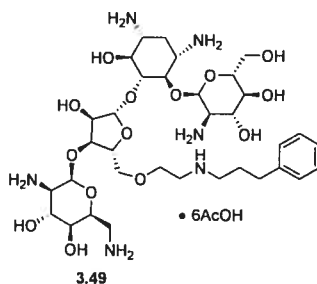
Procédure générale pour les déprotections finales (3.48-3.49):

Le substrat de départ (**3.46-3.47**) a été dissout dans AcOH:H₂O (4:1, 3 mL) puis cette solution a été chauffée à 60 °C pendant 8 h. La solution a été refroidie à TP et une quantité catalytique (environ 20 mol %) d'hydroxyde de palladium 20% sur charbon a été ajoutée. Le mélange a été laissé sous agitation pendant 3 h sous 1 atm de H₂, puis un spectre de masse a indiqué que la réaction était terminée. Le mélange a été filtré sur un lit de célite et le filtrat a été évaporé sous pression réduite. Le résidu a été lavé avec CH₂Cl₂ (1 mL, deux fois), puis dissout dans un minimum de H₂O et lyophilisé pour donner les composés **3.48-3.49**.

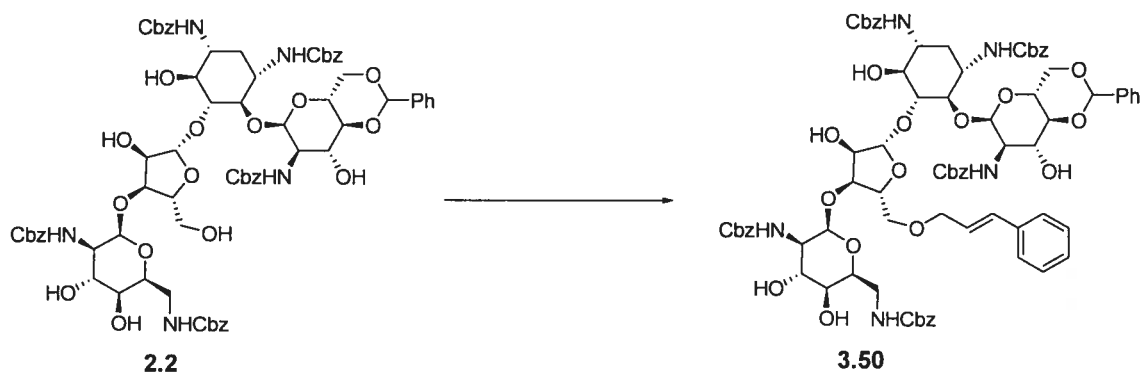


4-O-[{2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5-O-{3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-O-(2-N,N-diméthylaminoéthyl)- β -D-ribofuranosyl}]-2-désoxystreptamine (**3.48**). (55%); $[\alpha]_D +33.1^\circ$ (c 0.26, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 5.34 (s, 1H), 5.23 (s, 1H), 5.0 (s, 1H), 4.33-4.12 (m, 4H), 4.11-4.0 (m, 1H), 3.94-3.83 (m, 1H), 3.75-3.63 (m, 5H), 3.61-3.58 (m, 4H), 3.50-3.21 (m, 8H), 3.13-2.93 (m, 3H), 2.78 (s, 6H), 2.17-2.08 (m, 1H), 1.82 (s, 15H), 1.44-1.37 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 182.1, 108.9, 96.9, 95.5, 85.6, 81.7, 81.3, 78.5, 74.6,

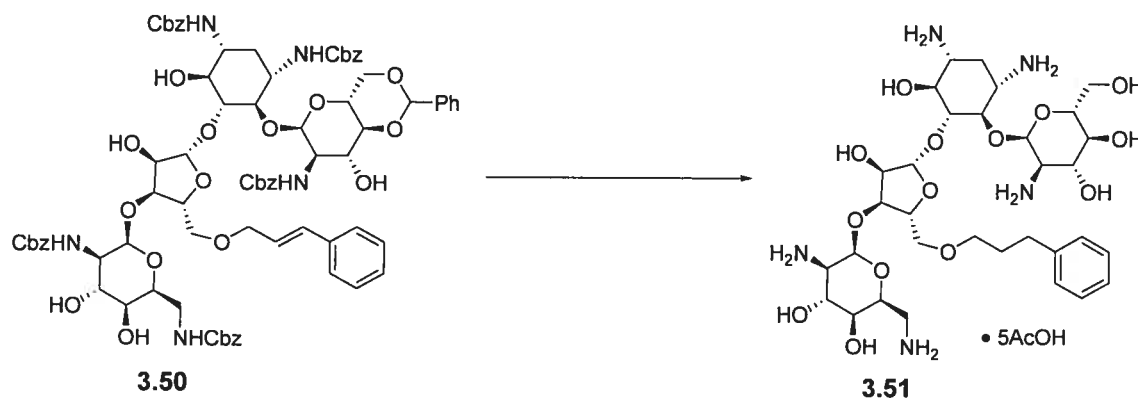
74.4, 73.9, 71.5, 70.1, 69.9, 68.7, 68.3, 65.4, 61.3, 60.2, 57.7, 54.9, 51.7, 50.9, 49.8, 43.8 (2C), 41.3, 30.5, 23.9; m/z calculée pour $C_{27}H_{54}N_6O_{14}$ $[M+H]^+$: 687.37763; SM trouvée: 687.6, SMHR trouvée: 687.37907.



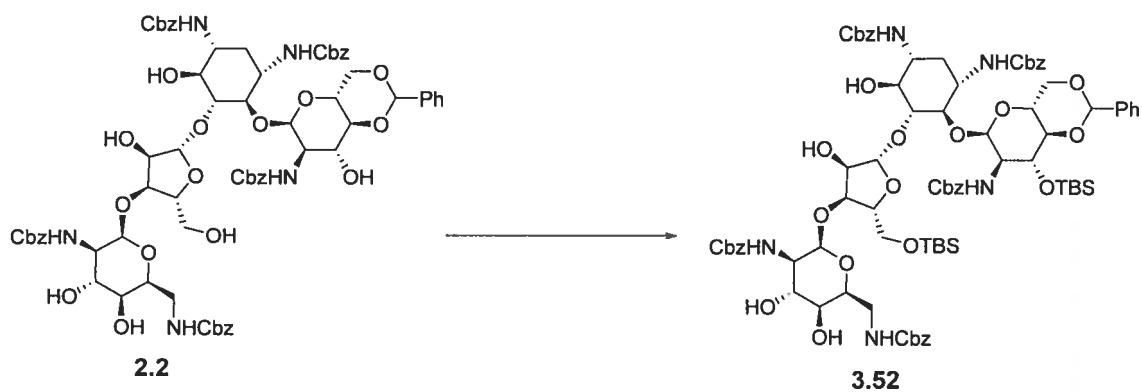
4-O-[{2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl}-5-O-{3-O-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-O-(2-N-(3-phénylpropyl)éthyl)- β -D-ribofuranosyl}]-2-déoxystreptamine (3.49). (63%); $[\alpha]_D +13.6$ (c 0.5, H_2O); 1H NMR (400 MHz, D_2O), δ (ppm): 7.24-7.15 (m, 5H) 5.32 (s, 1H), 5.22 (s, 1H), 5.03 (s, 1H), 4.34-4.09 (m, 4H), 4.10-4.02 (m, 1H), 3.94-3.83 (m, 1H), 3.75-3.63 (m, 5H), 3.61-3.58 (m, 4H), 3.50-3.21 (m, 8H), 3.13-2.93 (m, 3H), 2.18-2.05 (m, 1H), 1.81 (s, 15H), 1.49-1.41 (m, 1H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O), δ (ppm): 182.5, 132.9, 129.7 (2C), 129.6 (2C), 127.0, 110.7, 97.5, 97.1, 85.8, 82.2, 81.9, 76.1, 74.7, 74.4, 74.1, 71.5, 71.3, 70.5, 69.3, 68.7, 61.9, 61.1, 55.1, 52.4, 51.1, 50.3, 41.3, 39.7, 33.3, 32.5, 30.8, 29.7, 28.9, 24.0; m/z calculée pour $C_{34}H_{60}N_6O_{14}$ $[M+H]^+$: 777.42758; SM trouvée: 777.5; SMHR trouvée: 777.42090.



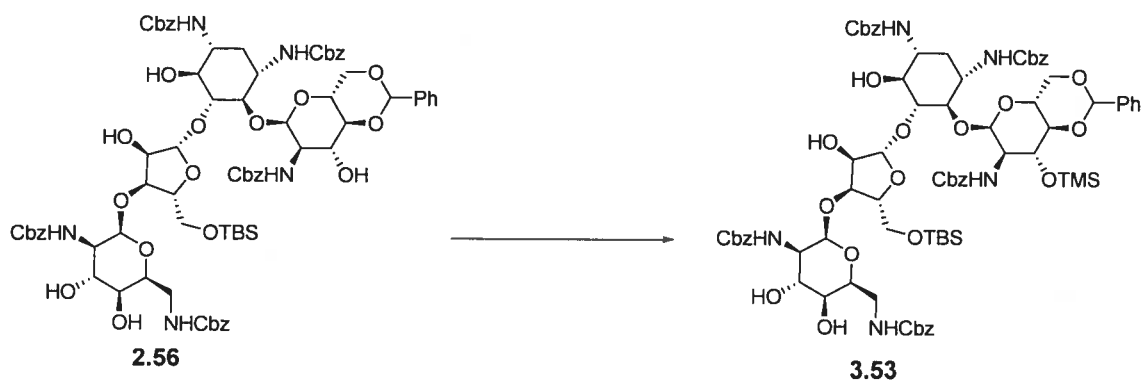
4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-gluco-pyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(-2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-ido-pyranosyl)-5-*O*-cinnamyl- β -D-ribofuranosyl]]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (3.50). Le composé **2.2**¹ (100 mg, 0.0730 mmol) a été dissout dans THF anhydre (5 mL). Une quantité catalytique de Bu₄NI (3.00 mg, 8.00 nmol) et du bromure de cinnamyle (43.0 mg, 0.218 mmol) ont été ajoutés suivi de l'addition goutte à goutte d'une solution de KHMDS 0.5 M dans le toluène (160 μ L, 0.0800 mmol). Le lendemain matin, une solution saturée de NH₄Cl a été ajoutée et la phase organique a été séparée, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (2% de MeOH dans CH₂Cl₂) pour donner le composé **3.50** (71.3 mg, 65%); *m/z* calculée pour C₇₉H₈₇N₇O₂₄ [M+H]⁺: 1490.6; SM trouvée: 1490.7.



4-*O*-[2-Amino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-(3-phénylpropyl)- β -D-ribofuranosyl]-2-désoxystreptamine (3.51). Le substrat de départ **3.50** (50 mg, 0.034 mmol) a été dissout dans AcOH:H₂O (4:1, 5 mL) puis cette solution a été chauffée à 60 °C pendant 8 h. La solution a été refroidie à TP et une quantité catalytique (environ 20 mol %) d'hydroxyde de palladium 20% sur charbon a été ajoutée. Le mélange a été laissé sous agitation pendant 3 h sous 1 atm de H₂, puis un spectre de masse a indiqué que la réaction était terminée. Le mélange a été filtré sur un lit de célite et le filtrat a été évaporé sous pression réduite. Le résidu a été lavé avec un minimum de CH₂Cl₂ (1 mL, 2 fois) puis dissout dans un minimum de H₂O et lyophilisé pour donner le composé **3.51**. (14 mg, 40%). $[\alpha]_D +11.7^\circ$ (c 1.0, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 7.33-7.21 (m, 5H), 5.68 (m, 1H), 5.31 (m, 1H), 5.23 (m, 1H), 4.49 (m, 1H), 4.23-4.08 (m, 5H), 3.91-3.45 (m, 12H), 3.40-3.13 (m, 6H), 2.58-2.34 (m, 4H), 2.27 (m, 1H), 1.81 (s, 15H), 1.66 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 182.3, 143.6, 130.1 (2C), 129.6 (2C), 126.9, 109.2, 97.1, 96.2, 86.2, 82.3, 81.2, 78.5, 74.6, 74.3, 73.7, 72.5, 71.0, 70.6, 70.1, 69.9, 68.4, 67.3, 67.6, 62.0, 54.7, 51.2, 50.8, 49.6, 41.3, 31.8, 31.1, 24.3; *m/z* calculée pour C₃₂H₅₅N₅O₁₄ [M+H]⁺: 734.38238, SM trouvée: 734.5, SMHR trouvée: 734.37928.



4-*O*-[3-*O*-*tert*-Butyldiméthylsilyl-4,6-*O*-benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(-2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl- β -D-ribofuranosyl]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (3.52). Le composé **2.2**¹ (1.00 g, 0.728 mmol) préalablement séché par deux codistillations avec du toluène a été dissout dans CH₂Cl₂ (100 mL) et la 2,6-lutidine (0.254 mL, 2.18 mmol) suivie de TBDMSOTf (0.421 mL, 0.673 mmol) ont été ajoutés à 0 °C. Le lendemain matin, de l'eau a été ajouté (1 mL) et la phase organique a été lavée avec une solution de HCl 0.5 M, puis avec une solution saturée de NaHCO₃. La phase organique a ensuite été séchée sur Na₂SO₄, puis évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (1.5% de MeOH dans CH₂Cl₂) pour donner le composé **3.52** (800 mg, 69%); [α]_D: +31.6° (*c* 1.0, CHCl₃); R_f 0.7 (CHCl₃:AcOEt:MeOH, 20:5:3); ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.60-7.10 (m, 28H), 6.40 (m, 2H), 5.60-3.00 (m, 40H), 2.20 (m, 1H), 1.30 (m, 1H), 0.91-0.80 (m, 18H), 0.04-0.00 (m, 12H); *m/z* calculée pour C₈₂H₁₀₇N₅O₂₄Si₂ [M+H]⁺: 1602.69228; SM trouvée: 1602.8, SMHR trouvée: 1602.68843.



4-*O*-[3-*O*-Triméthylsilyl-4,6-*O*-benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(-2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (3.53). Le composé **2.56** (1.01 g, 0.672 mmol) préalablement séché par deux codistillations avec du toluène a été dissout dans CH₂Cl₂ (100 mL) et la solution a été refroidie à -40 °C. La 2,6-lutidine (117 μ L, 1.00 mmol) suivie de TMSCl (0.0940 mL, 0.739 mmol) ont été ajoutés. 3 h plus tard, de l'eau a été ajouté (1 mL) et la phase organique a été lavée avec une solution saturée de CuSO₄, puis avec de l'eau. La phase organique a ensuite été séchée sur Na₂SO₄, puis évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (1.5% de MeOH dans CH₂Cl₂) pour donner le composé **3.53** (603 mg, 57%). [α]_D: +33.4° (*c* 1.0, CHCl₃); R_f 0.7 (CHCl₃:AcOEt:MeOH, 20:5:3); ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.63-7.08 (m, 28H), 6.44 (m, 2H), 5.65-3.00 (m, 40H), 2.23 (m, 1H), 1.41 (m, 1H), 0.84 (s, 9H), 0.05-0.01 (m, 15H); *m/z* calculée pour C₇₉H₁₀₁N₅O₂₄Si₂ [M+H]⁺: 1560.64533; SM trouvée: 1560.8, SMHR trouvée: 1560.64478.

Sachant que l'analyse des fragments en spectrométrie de masse est une méthode bien établie pour les caractérisation structurales des aminoglycosides,⁶ nous avons déterminé la régiosélectivité de la triméthylsilylation à partir du patron de fragmentation en spectrométrie de masse du composé **3.53** (Figure 6.4), qui montre que le groupement TMS se trouve sur le cycle I ou II alors que nous savons que l'alcool 6-OH a une réactivité moindre que les autres alcools libres du composé **2.2** tel que décrit dans la littérature²⁷ et tel que nous l'avons déterminé au Chapitre 2.

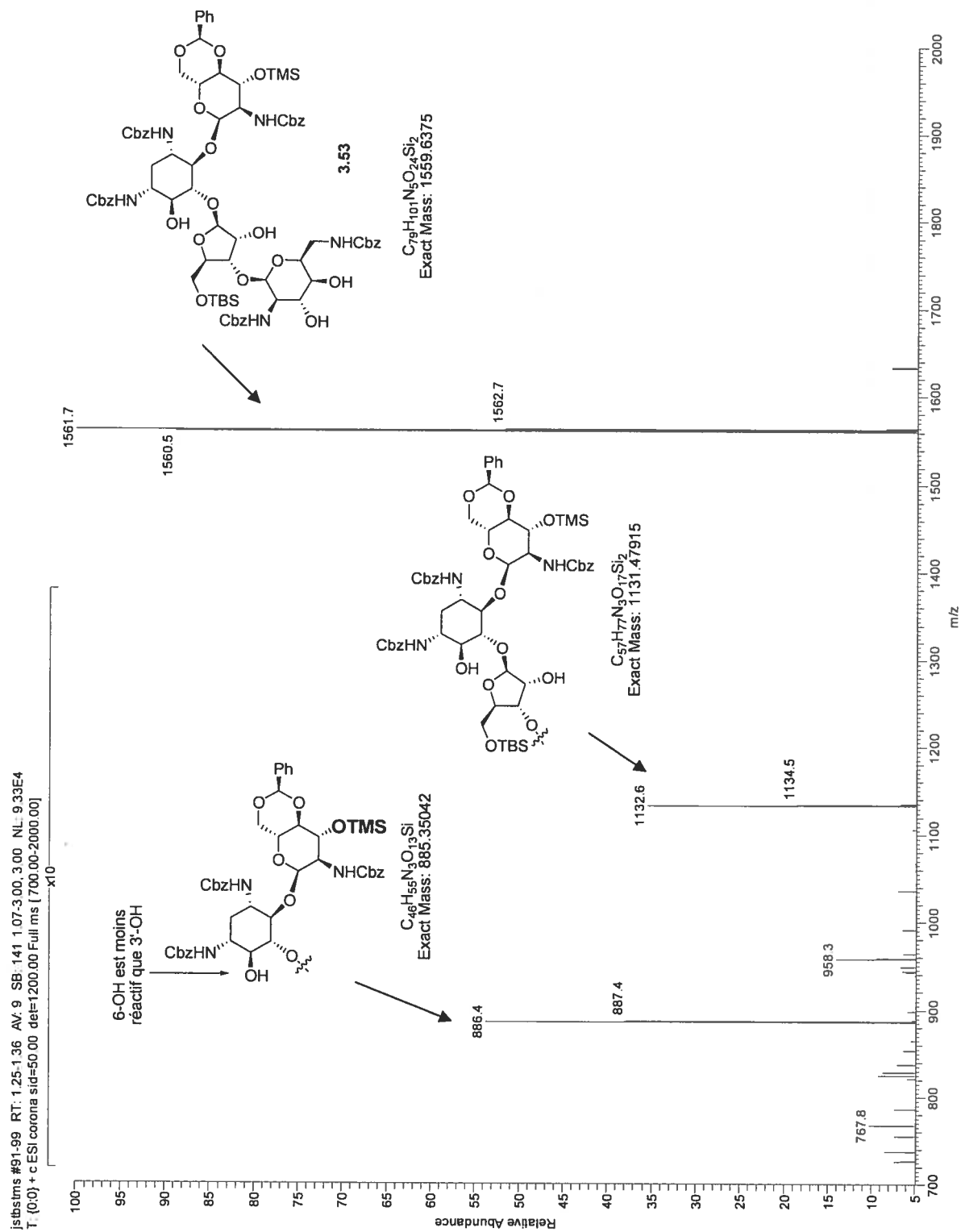
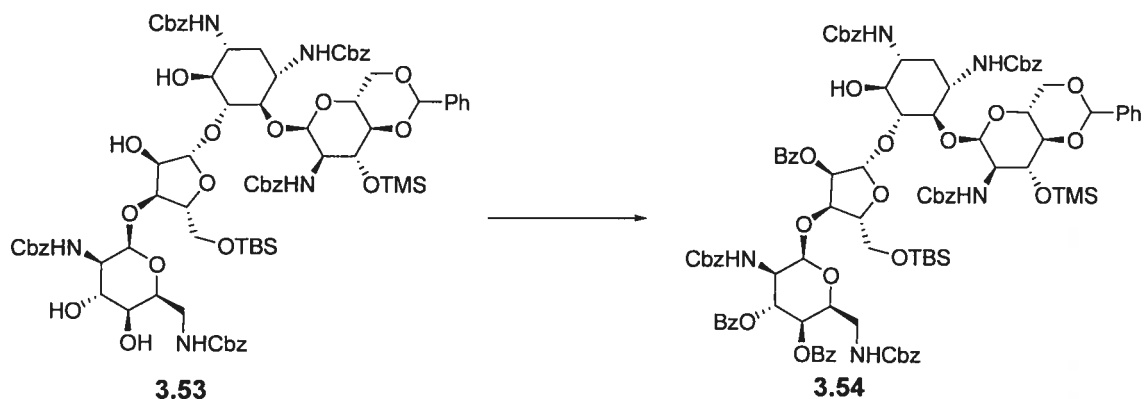
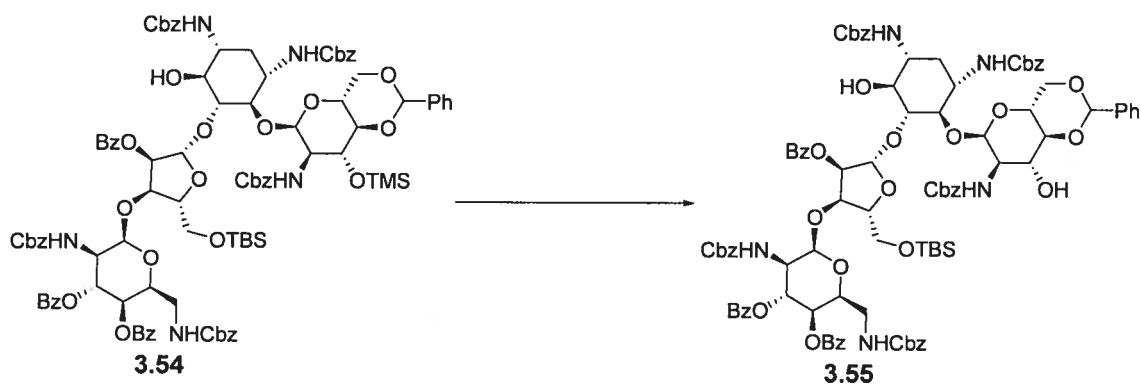


Figure 6.4. Fragments observés en spectrométrie de masse pour le composé **3.53**.

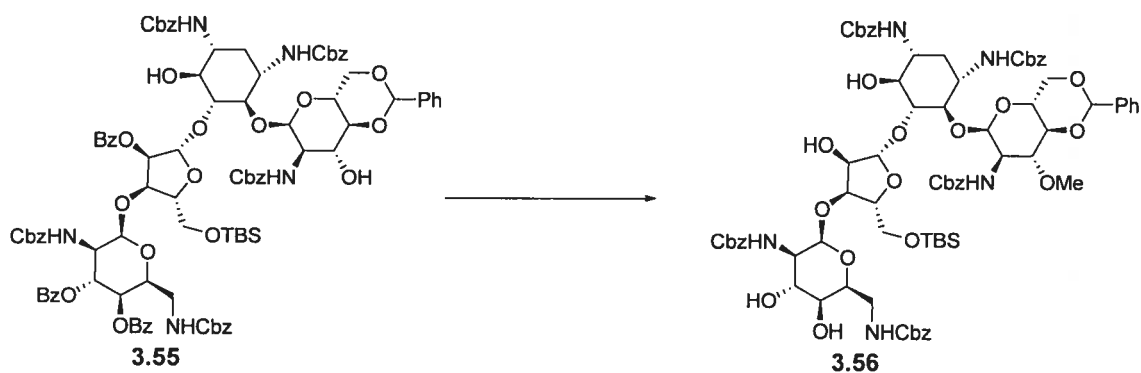




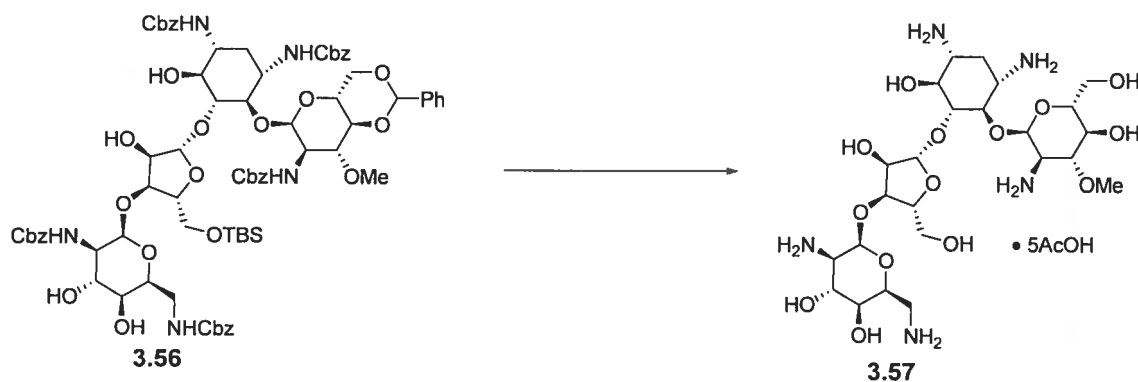
4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy-3-*O*-triméthylsilyl- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(3,4-di-*O*-benzoyl-2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-*O*-benzoyl-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl- β -D-ribofuranosyl]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (3.54). De la pyridine (233 μ L, 2.88 mmol) et du chlorure de benzoyle (0.223 μ L, 1.92 mmol) ont été ajoutés à une solution de **3.53** (300 mg, 0.192 mmol) dans CH_2Cl_2 (5 mL). Après 16h, de l'eau (1 mL) a été ajoutée et les solvants ont été évaporés sous pression réduite. Le résidu a été dissout dans de AcOEt et la phase organique a été lavée avec une solution saturée de CuSO_4 et avec une solution saturée de NaHCO_3 . La phase organique a été séchée sur Na_2SO_4 puis évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH_2Cl_2 a été purifié par chromatographie éclair (AcOEt/Hexane 3:7 à 1:1) pour fournir le composé **3.54** (341 mg, 95%). $[\alpha]_D$: +21.7° (*c* 0.5, CHCl_3); R_f 0.4 (AcOEt:hexane, 1:1); ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 8.15-7.03 (m, 45H), 6.31-3.11 (m, 36H), 2.24 (m, 1H), 1.52 (m, 1H), 0.83 (s, 9H), 0.01 (s, 15H); *m/z* calculée pour $\text{C}_{100}\text{H}_{113}\text{N}_5\text{O}_{27}\text{Si}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1872.72397; SM trouvée: 1872.9; SMHR trouvée: 1872.71896.



4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-[3-*O*-(3,4-di-*O*-benzoyl-2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-2-*O*-benzoyl-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl- β -D-ribofuranosyl]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (3.55). Le composé **3.54** (300 mg, 0.160 mmol) a été dissout dans un mélange de AcOH:CH₃CN:H₂O (2:9:1, 10 mL). Le lendemain matin, les solvants ont été évaporés sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (AcOEt:hexane, 1:1) pour donner le composé **3.55** (163 mg, 57%). [α]_D: +26.4° (*c* 1.0, CHCl₃); R_f 0.2 (AcOEt:hexane, 1:1); ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 8.11-7.06 (m, 45H), 6.27-3.03 (m, 36H), 2.21 (m, 1H), 1.57 (m, 1H), 0.82 (s, 9H), 0.00 (s, 6H); *m/z* calculée pour C₉₇H₁₀₅N₅O₂₇Si [M+H]⁺: 1800.68444; SM trouvée: 1800.7; SMHR trouvée: 1800.68217.



4-*O*-[4,6-*O*-Benzylidène-2-benzyloxycarbonylamino-2-désoxy-3-*O*-méthyl- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(2,6-dibenzyloxycarbonylamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)-5-*O*-*tert*-butyldiméthylsilyl- β -D-ribofuranosyl}]-1,3-di-*N*-benzyloxycarbonyl-2-désoxystreptamine (3.56). Le composé 3.55 (100 mg, 0,0550 mmol) a été séché par deux codistillations avec du toluène et dissout dans THF anhydre (5 mL). L'iodure de méthyle (70.0 μ L, 1.11 mmol) a été ajouté suivi d'une solution de KHMDS 0.5 M dans du toluène (0.133 mL, 0.0670 mmol). 3 h plus tard, une autre portion de KHMDS (67.0 μ L, 0,0340 mmol) a été ajoutée. 2h plus tard, une solution de NH₄Cl 2 M a été ajoutée et la phase organique a été séparée, lavée avec de l'eau, puis séchée avec Na₂SO₄ avant d'être évaporée sous pression réduite. L'huile jaune obtenue a été dissoute dans MeOH (5 mL) et une solution fraîchement préparée de MeONa dans du MeOH a été ajoutée tranquillement jusqu'à ce que le pH atteigne 10. 8 h plus tard, la solution a été refroidie à -78 °C et de la glace sèche a été ajoutée jusqu'à ce que le pH soit neutre et le solvant a été évaporé sous pression réduite. Le résidu a été dissout dans AcOEt et la phase organique a été lavée avec de l'eau, séchée sur Na₂SO₄, puis évaporée sous pression réduite. La purification par chromatographie éclair n'a pas permis de séparer le produit désiré d'un produit di-méthylé indésirable. Le résidu a donc été purifié par HPLC (colonne Alltech Prevail C18 250 x 22 mm, 5 μ ; gradient 20 à 80% CH₃CN dans l'eau sur 40 min; détection par MS) pour fournir le composé 3.56 (12 mg, 14%). $[\alpha]_D$: +32.6 (*c* 1.0, CHCl₃); R_f 0.6 (CHCl₃:AcOEt:MeOH, 20:5:3); ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.64-7.06 (m, 30H), 5.61-3.05 (m, 40H), 2.26 (m, 1H), 1.38 (m, 1H), 0.84 (s, 9H), 0.01 (s, 6H); *m/z* calculée pour C₇₇H₉₅N₅O₂₄Si [M+H]⁺: 1502.62145, SM trouvée: 1502.6, SMHR trouvée: 1502.61859.



4-*O*-[2-Amino-2-désoxy-3-*O*-méthyl- α -D-glucopyranosyl]-5-*O*-{3-*O*-(2,6-diamino-2,6-didésoxy- α -L-idopyranosyl)- β -D-ribofuranosyl]-2-désoxystreptamine (3.57). Le composé **3.56** (12 mg, 8.0 nmol) a été dissout dans AcOH:H₂O (4:1, 5 mL) puis cette solution a été chauffée à 60 °C pendant 8 h pour obtenir le produit correspondant avec le TBS et le benzyldène hydrolysés. *m/z* calculée pour C₆₄H₇₇N₅O₂₄ [M+H]⁺: 1300.5, SM trouvée: 1300.4. La solution a été refroidie à TP et une quantité catalytique (environ 20 mol %) d'hydroxyde de palladium 20% sur charbon a été ajoutée. Le mélange a été laissé sous agitation pendant 3 h sous 1 atm de H₂, puis un spectre de masse a indiqué que la réaction était terminée. Le mélange a été filtré sur un lit de célite et le filtrat a été évaporé sous pression réduite. Le résidu a été lavé avec un minimum de CH₂Cl₂ (1 mL, 2 fois) puis dissout dans un minimum de H₂O et lyophilisé pour donner le composé **3.57**. (3.5 mg, 47%). [α]_D +16.1° (c 1.0, H₂O); ¹H NMR (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 5.72 (m, 1H), 5.44 (m, 1H), 5.31 (m, 1H), 4.47 (m, 1H) 4.35-4.08 (m, 5H), 3.97-3.44 (m, 12H), 3.41-3.07 (m, 7H), 2.36 (m, 1H), 1.87 (s, 15H), 1.61 (m, 1H); ¹³C NMR (101 MHz, D₂O), δ (ppm): 181.7, 111.7, 97.2, 96.8, 84.5, 81.4, 77.3, 75.6, 74.3, 74.0, 69.9, 69.2, 68.7, 68.0, 67.6, 62.8, 61.3, 60.7, 58.4, 53.5, 51.2, 49.9, 48.0, 42.1, 28.3, 23.4; *m/z* calculée pour C₂₄H₄₇N₅O₁₄ [M+H]⁺: 630.31980, SM trouvée: 630.3, SMHR trouvée: 630.31743.

6.4 Procédures expérimentales pour le Chapitre 4.

Cinétique de l'APH(3')-IIIa à 37 °C.

L'expression et la purification de l'enzyme APH(3')-IIIa sont décrits à la section précédente (Section 6.3). Les paramètres cinétiques des phosphorylations ont été mesurés selon le protocole standard⁴ avec les modifications suivantes: le 2-amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol (TRIS) (0.60 g), KCl (0.30 g) et l'hexahydrate de MgCl₂ (0.20 g) ont été dissout dans H₂O (100 mL) et le pH de cette solution a été ajusté à 7.5 avec une solution de HCl 6.0 M, puis refroidie à 4 °C. 20 mL de cette solution ont été mis de côté et maintenus à 4 °C. Aux 80 mL, la forme réduite de NADH (34 mg), le phosphoénol du pyruvate (68 mg), le sel de sodium de l'ATP (56 mg), le mélange commercial de la kinase du pyruvate et de la déshydrogénase du lactate (200 µL) et l'APH(3')-IIIa (30 µL) ont été ajoutés et cette solution a été maintenue à 4 °C. 900 µL de cette solution ont été placés dans une cuvette à l'intérieur du spectrophotomètre (Varian Cary UV 100-Bio) thermostaté à 37 °C et une période de 10 min. a été allouée pour que la solution atteigne 37 °C. Les phosphorylations ont ensuite été initiées par l'ajout de l'aminoglycoside, ou d'un mélange de l'aminoglycoside et de l'inhibiteur, suivi d'une légère agitation. Le volume de la solution de l'aminoglycoside ajouté à la cuvette a été préalablement complété à 100 µL avec les 20 mL du tampon de réaction restant (voir ci-haut). Les vitesses de phosphorylation ont été déterminées en suivant la baisse d'absorbance à 340 nm en utilisant un coefficient d'extinction de 6220 cm⁻¹M⁻¹ pour le NADH.

Détermination des vitesses de phosphorylation initiales (V₀).

Pour déterminer V₀, le protocole standard décrit ci-haut a été appliqué, mais avec le tiers de la quantité de l'APH(3')-IIIa (10 µL ici). Cet ajustement a permis d'enregistrer les vitesses de phosphorylation de la paromomycine sur une période de temps raisonnable, alors qu'avec la quantité standard d'APH(3')-IIIa (30 µL), la vitesse de phosphorylation de la paromomycine est trop rapide. La concentration des aminoglycosides a été fixée à 50 µM.

Détermination des K_i et K_i' par rapport à l'amikacine.

Pour déterminer les constantes d'inhibition par rapport à l'amikacine, le protocole standard décrit ci-haut a été appliqué. Les $K_m(app)$ et $V_{max}(app)$ de l'amikacine, dont la concentration a varié entre $K_m/2$ et $3K_m$ ($K_m = 150 \mu M$) ont été déterminés en présence de 0, 1, 2.5, 5, 10 et 15 μM d'inhibiteur (composés **2.106** et **2.108**) à l'aide des régressions non-linéaires obtenues par le logiciel Origin 6.0 Microcal. La valeur de K_i' a été déterminée par l'équation suivante:

$$\frac{1}{V_{max}(app)} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{[I]}{V_{max} K_i'}$$

Puis la valeur de K_i a été déterminée avec l'équation suivante:

$$\frac{K_m(app)}{V_{max}(app)} = \frac{K_m}{V_{max}} + \frac{K_m [I]}{V_{max} K_i}$$

Détermination des IC_{50} .

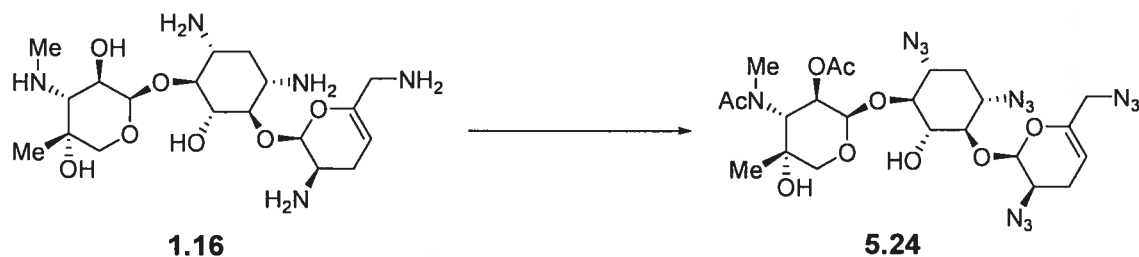
Pour déterminer les IC_{50} , le protocole standard décrit ci-haut a été appliqué. La concentration de l'amikacine a été fixée à $1.33K_m$, soit 200 μM . Les vitesses de phosphorylation de l'amikacine ont été déterminées en présence de 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5, 10, 15, 20 et 30 μM d'inhibiteurs. La diminution de la vitesse de phosphorylation de l'amikacine a été linéaire avec l'augmentation de la concentration de l'inhibiteur jusqu'à ce que cette dernière atteigne la valeur du IC_{50} . Seule la partie linéaire du graphique de la vitesse de la phosphorylation de l'amikacine en fonction de la concentration de l'inhibiteur a été utilisée pour déterminer les IC_{50} .

Détermination des K_i par rapport à l'ATP.

Pour déterminer les constantes d'inhibition par rapport à l'ATP, le protocole standard décrit ci-haut a été appliqué, mais sans ATP dans le tampon de réaction et avec $6.66K_m$ d'amikacine (1 mM) dans le tampon de réaction. Les $K_m(\text{app})$ et $V_{\text{max}}(\text{app})$ de l'ATP, dont la concentration a variée entre $K_m/4$ et $1.5K_m$ ($K_m = 40 \mu\text{M}$) ont été déterminés en présence de 0, 1, 2.5, 5 et 10 μM d'inhibiteur (composé **2.108**) à l'aide des régressions non-linéaires obtenues par le logiciel Origin 6.0 Microcal. Les valeurs de K_i ont été déterminées par les équations suivantes:

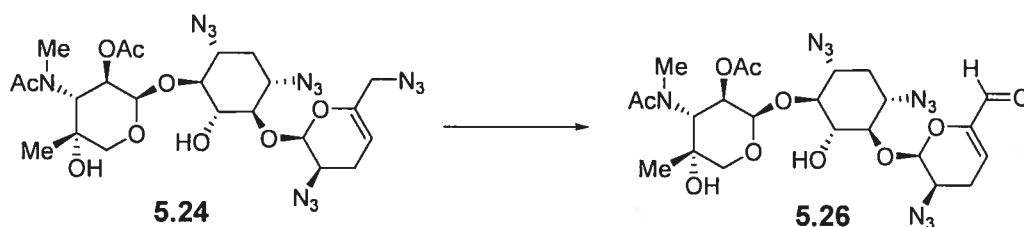
$$\frac{1}{K_m(\text{app})} = \frac{1}{K_m} + \frac{[I]}{K_m K_i}, \quad \text{et} \quad \frac{1}{V_{\text{max}}(\text{app})} = \frac{1}{V_{\text{max}}} + \frac{[I]}{V_{\text{max}} K_i}$$

6.5 Procédures expérimentales pour le Chapitre 5.

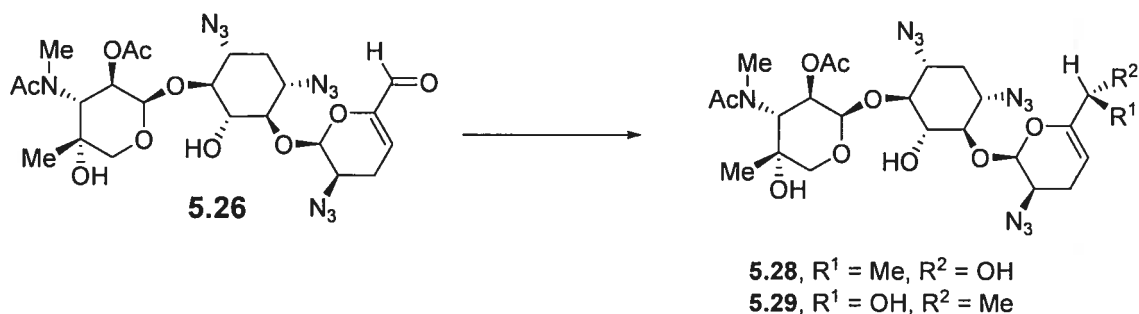


4-O-[[2,6-Diazo-2,3,4,6-tétradésoxy- α -D-glycéro-hex-4-énopyranosyl]-6-O-{3-N-acétyl-2-O-acétyl-3-amino-3-N-méthyl-4-C-méthyl-3-désoxy- β -L-arabinopyranosyl]-1,3-diazo-1,3-désamino-2-désoxystreptamine (5.24). L'azidure de sodium (8.76 g, 134.0 mmol) a été dissout dans un minimum d'eau (25 mL) et un volume identique de CH_2Cl_2 (25 mL) a été ajouté. La solution a été refroidie à 0 °C et une solution de $\text{Tf}_2\text{O}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1 en volume, 18.0 mL, 53.6 mmol de Tf_2O) a été ajoutée goutte à goutte sous forte agitation sur une période de 1h. Une fois l'addition de Tf_2O terminée, le mélange a été réchauffé à TP et agité pour 2 h supplémentaires. Une solution saturée de NaHCO_3 a été ajoutée (50 mL), la phase organique a été séparée et la phase aqueuse a été lavée avec CH_2Cl_2 (10 mL, 2 fois). Les phases organiques ont été combinées pour fournir une solution de TfN_3 qui sera utilisée ci-dessous. Dans un autre ballon, la sisomicine (**1.16**) (3.00 g, 6.70 mmol) et le CuSO_4 (107 mg, 0.670 mmol) ont été dissouts dans H_2O (50 mL). MeOH (150 mL) a été ajouté, suivi de NaHCO_3 (6.8 g, 80.4 mmol) et de la solution de TfN_3 (lentement) fraîchement préparée ci-haut. 16 h plus tard, le produit désiré est l'unique pic visible en spectrométrie de masse. m/z calculée pour $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{N}_{13}\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 552.2, SM trouvée: 552.5. À ce moment les solvants organiques ont été évaporés sous pression réduite et l'eau a été enlevée par lyophilisation. Le solide obtenu a été mis en suspension dans la pyridine (50 mL), puis Ac_2O (20.0 mL, 212 mmol) a été ajouté. Le lendemain matin, les solvants ont été évaporés sous pression réduite et le résidu a été repris dans AcOEt . La phase organique a été lavée avec une solution de HCl 0.5 M, puis avec une solution saturée de NaHCO_3 et elle a été séchée sur Na_2SO_4 avant d'être évaporée sous pression réduite. Le résidu noir dissout dans un minimum de CH_2Cl_2 a été purifié par chromatographie éclair (2%

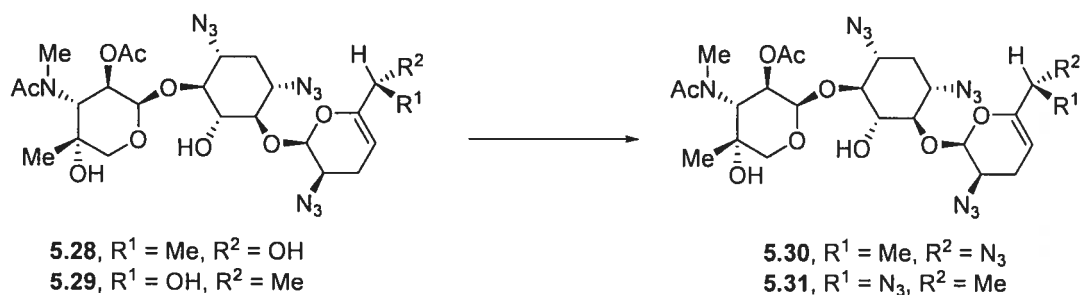
MeOH dans CH₂Cl₂) pour donner le composé **5.24** (2.30 g, 54%); $[\alpha]_D +140.8^\circ$ (c 1.0, CHCl₃) ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 5.95-5.78 (m, 1H), 5.50-5.30 (m, 1H), 5.08 (d, $J = 11.59$ Hz, 1H), 4.95 (d, $J = 4.94$ Hz, 1H), 4.64 (s, 1H), 4.57-4.41 (m, 1H), 4.14 (d, $J = 11.97$ Hz, 1H), 3.88-3.59 (m, 4H), 3.40 (m, 5H), 3.12 (d, $J = 0.99$ Hz, 1H), 3.01 (s, 1H), 2.94 (s, 1H), 2.55-2.37 (m, 1H), 2.37-2.19 (m, 2H), 2.10 (dd, $J = 11.26, 10.13$ Hz, 6H), 1.38 (s, 1H), 1.27-1.09 (m, 3H) ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 174.4-169.5 (m, 2C), 145.3, 98.3-96.6 (m, 2C), 87.5, 85.2, 79.8-79.1 (m, 2C), 75.5, 74.2, 72.9, 69.5, 67.7-66.3 (m, 2C), 59.7-59.4 (m, 2C), 54.5, 52.2, 32.5, 23.2-20.1 (m, 3C); m/z calculée pour C₂₃H₃₃N₁₃O₉ [M+H]⁺: 636.26024, SM trouvée: 636.5, SMHR trouvée: 636.25293.



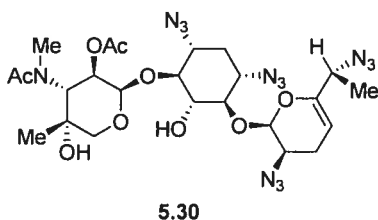
4-O-[[2-Azido-5-C-formyl-2,3,4,6-tétradésoxy- α -D-glycero-hex-4-énopyranosyl]-6-O-[[3-N-acétyl-2-O-acétyl-3-amino-3-N-méthyl-4-C-méthyl-3-désoxy- β -L-arabinopyranosyl]-1,3-diazido-1,3-désamino-2-désoxystreptamine (5.26**).** Le substrat **5.24** (2.00 g, 3.15 mmol) a été dissout dans CH₂Cl₂ (50 mL) et SeO₂ (1.68 g, 15.7 mmol) suivie de la pyridine (2.54 mL, 31.5 mmol) ont été ajoutés. 48 h plus tard, de l'eau (50 mL) est ajoutée et la phase organique a été séparée, séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (2% MeOH dans CH₂Cl₂) pour donner le composé **5.26** (1.45 g, 76%) qui a été utilisé rapidement. $[\alpha]_D +146.3^\circ$ (c 0.5, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 9.21 (d, $J = 8.75$ Hz, 1H), 6.23-5.81 (m, 2H), 5.63-5.27 (m, 1H), 5.22-4.98 (m, 1H), 4.77-4.41 (m, 1H), 4.26-3.91 (m, 1H), 3.89-3.58 (m, 3H), 3.58-3.19 (m, 5H), 3.19-2.86 (m, 3H), 2.82-2.46 (m, 2H), 2.36-1.96 (m, 6H), 1.63-1.30 (m, 1H), 1.30-1.00 (m, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 185.8, 174.7-169.8 (m, 2C), 148.9, 120.3, 98.7-96.7 (m, 2C), 88.0, 86.0, 80.3-79.8 (m, 1C), 75.8-73.2 (m, 2C), 70.0, 68.1-66.7 (m, 1C), 60.1-59.6 (m, 2C), 54.4, 52.5, 43.4, 32.6, 23.6-20.5 (m, 3C); m/z calculée pour C₂₃H₃₂N₁₀O₁₀ [M+H]⁺: 609.23811, SM trouvée: 609.4, SMHR trouvée: 609.23612.



4-*O*-[2-Azido-6-*C*-méthyl-2,3,4-tridéoxy- α -D-glycéro-hex-4-ènoypyranosyl]-6-*O*-[3-*N*-acétyl-2-*O*-acétyl-3-amino-3-*N*-méthyl-4-*C*-méthyl-3-désoxy- β -L-arabinopyranosyl]-1,3-diazido-1,3-désamino-2-désoxystreptamine (5.28-5.29). Le composé **5.26** (800 mg, 1.32 mmol) a été dissout dans THF anhydre (15 mL) puis la solution a été refroidie à -78 °C. Une solution de MeMgBr 3.0 M dans l'éther (880 μ L, 2.63 mmol) a été ajoutée suivie, 15 min. plus tard, d'une solution saturée de NH₄Cl. La phase organique a été séparée et séchée sur Na₂SO₄. Le solvant a été évaporé et le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (2% de MeOH dans CH₂Cl₂) pour donner un mélange 1:1 des composés diastéréomériques **5.28-5.29** inséparables (548 mg, 67%). Puisque ces composés ont été préparés séparément ultérieurement, la caractérisation de chaque diastéréoisomère est décrite plus loin dans ce chapitre.

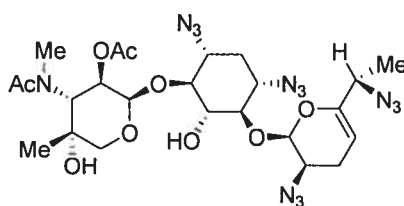


Composés 5.30 et 5.31. Le mélange des composés **5.28-5.29** (500 mg, 0.800 mmol) a été dissout dans CH₂Cl₂ (20 mL), puis de la pyridine (130 µL, 1.60 mmol) a été ajoutée suivie de Ms-Cl (93.0 µL, 1.20 mmol). Le lendemain matin, de l'eau (5 mL) a été ajoutée et la phase organique a été séparée et lavée avec une solution de HCl 0.5 M, puis avec une solution saturée de NaHCO₃. La phase organique a ensuite été séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée sous pression réduite. Le résidu a été dissout dans DMF (10 mL). NaN₃ (156 mg, 2.40 mmol) a été ajouté et la solution a été chauffée à 80 °C. 16 h plus tard, le solvant a été évaporé puis le résidu a été dissout dans AcOEt. La phase organique a été lavée avec de l'eau, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée sous pression réduite. Le résidu a été dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ et purifié par chromatographie éclair (2% de MeOH dans CH₂Cl₂) pour donner les composés **5.30** et **5.31** inséparables (263 mg, 50%). Puisque les composés ont été préparés séparément à partir des composés **5.28** et **5.29** respectivement en utilisant le protocole décrit ici, la caractérisation de chaque diastéréoisomère a été réalisée.



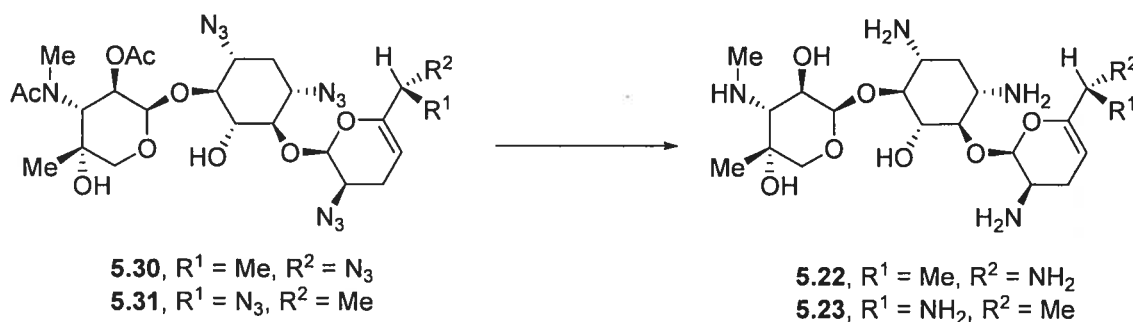
4-O-[[2,6-Diazo-6-(R)-C-méthyl-2,3,4,6-tétradésoxy-α-D-glycero-hex-4-énopyranosyl]-6-O-{3-N-acétyl-2-O-acétyl-3-amino-3-N-méthyl-4-C-méthyl-3-désoxy-β-L-arabinopyranosyl]-1,3-diazo-1,3-désamino-2-désoxystreptamine (**5.30**). [α]_D +31.8° (c 1.0, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.02-5.88 (m, 1H), 5.55-5.31 (m, 1H), 5.18-5.06 (m, 1H), 5.00-4.88 (m, 1H), 4.72-4.62 (m, 1H), 4.51-

4.40 (m, 1H), 4.24-4.11 (m, 1H), 3.86-3.66 (s, 2H), 3.57-3.24 (m, 5H), 3.08 (t, $J = 35.01$ Hz, 3H), 2.62-2.39 (m, 1H), 2.39-2.23 (m, 2H), 2.23-2.07 (m, 6H), 1.98-1.77 (m, 1H), 1.47-1.29 (m, 3H), 1.18 (d, $J = 34.08$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 174.2-169.3 (m, 2C), 148.6, 98.2, 97.6, 96.2, 95.5, 87.7, 85.2, 79.5-78.8 (m, 1H), 75.4, 74.2, 72.6, 69.7-69.3 (m, 1H), 67.7, 67.0-66.1 (m, 1C), 59.6-59.2 (m, 1C), 57.5, 54.5, 51.9, 42.8, 32.4-31.8 (m, 1C), 23.1-20.0 (m, 3C), 16.6; m/z calculée pour $\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{N}_{13}\text{O}_9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 650.27589, SM trouvée: 650.6, SMHR trouvée: 650.27487.



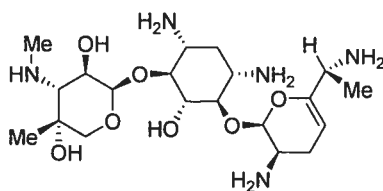
5.31

**4-*O*-[2,6-Diazido-6-(*S*)-*C*-méthyl-2,3,4,6-tétradésoxy- α -*D*-glycéro-hex-4-
*en*opyranosyl]-6-*O*-[3-*N*-acétyl-2-*O*-acétyl-3-amino-3-*N*-méthyl-4-*C*-méthyl-3-
désoxy- β -*L*-arabinopyranosyl]-1,3-diazido-1,3-désamino-2-déoxystreptamine
(5.31).** $[\alpha]_{\text{D}} +26.7^\circ$ (c 1.0, CHCl_3); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 6.01-5.92 (m, 1H), 5.53-5.30 (m, 1H), 5.16-5.05 (m, 1H), 4.67 (s, 1H), 4.51-4.37 (m, 1H), 4.27-3.90 (m, 1H), 3.89-3.76 (m, 1H), 3.76-3.62 (m, 2H), 3.58-3.35 (m, 4H), 3.34-3.26 (m, 1H), 3.05 (t, $J = 34.08$ Hz, 3H), 2.61-2.39 (m, 1H), 2.34-2.21 (s, 2H), 2.23-2.05 (m, 6H), 1.99-1.73 (m, 1H), 1.49-1.34 (m, 3H), 1.20 (d, $J = 36.00$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 174.2-169.3 (m, 2C), 148.6, 98.2, 97.6, 96.2, 95.5, 87.7, 85.3, 79.5-78.7 (m, 1H), 74.2, 72.6, 69.7-69.3 (m, 1H), 67.5-66.9 (m, 1C), 66.1 (m, 1C), 59.6-59.1 (m, 1C), 58.1-57.5 (m, 1C), 54.7, 51.9, 42.8, 32.4-31.8 (m, 1C), 23.1-20.0 (m, 3C), 16.6; m/z calculée pour $\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{N}_{13}\text{O}_9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 650.27589, SM trouvée: 650.6, SMHR trouvée: 650.27623.



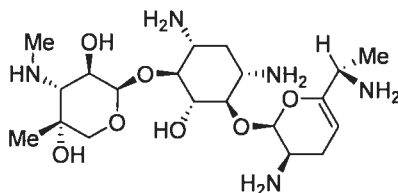
Verdamicines C2 et C2a (5.22-5.23). Le mélange des composés **5.30-5.31** (100 mg, 0.154 mmol) a été dissout dans MeOH (20 mL) et une solution fraîchement préparée de MeONa dans MeOH a été ajoutée jusqu'à ce que le pH atteigne 12. La solution a été chauffée à reflux pour 18 h et un spectre de masse a indiqué que la réaction était terminée. m/z calculée pour C₂₀H₃₁N₁₃O₇ [M+H]⁺: 566.2, SM trouvée: 566.4. À ce moment, le solvant a été évaporé sous pression réduite et le résidu a été mis en suspension dans THF (10 mL). De l'eau (2 mL), suivi d'une solution 1.0 M de la triméthylphosphine dans THF (4.62 mL, 4.62 mmol) ont été ajoutés. 1 h plus tard, les solvants ont été évaporés et le résidu dissout dans 1 mL NH₄OH 1M dans H₂O a été purifié par HPLC préparative pour donner les composés **5.22-5.23** inséparables (17 mg, 24%). Conditions pour la purification préparative: colonne Waters X-bridge Prep Shield RP18 (19x150mm, 5 μ); phase mobile : 0 à 20% solvant B dans solvant A sur 60 min (solvant A: 10 mM NH₄OH dans H₂O, solvant B: 10 mM NH₄OH dans CH₃CN).

Puisque les composés **5.22** et **5.23** ont été préparés séparément à partir des composés **5.30** et **5.31** respectivement en utilisant le protocole décrit ici, la caractérisation de chaque diastéréoisomère a été réalisée.



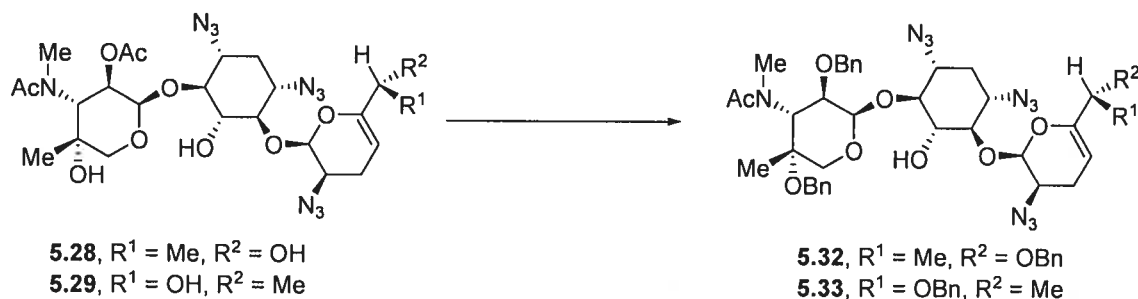
Verdamicine C2
(5.22)

Verdamicine C2 (5.22). $[\alpha]_D +58.4^\circ$ (c 0.7, CHCl_3); ^1H NMR (400 MHz, D_2O), δ (ppm): 5.37 (s, 1H), 5.06 (d, $J = 2.72$ Hz, 1H), 4.93 (s, 1H), 4.03 (d, $J = 12.28$ Hz, 1H), 3.80 (dd, $J = 10.75, 2.53$ Hz, 1H), 3.69-3.39 (m, 3H), 3.41-3.18 (m, 2H), 3.18-3.03 (m, 1H), 3.01-2.72 (m, 3H), 2.61 (d, $J = 10.76$ Hz, 1H), 2.53 (s, 3H), 2.32-2.13 (m, 1H), 1.96 (d, $J = 6.03$ Hz, 2H), 1.32-1.13 (m, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O), δ (ppm): 149.5, 100.2, 96.1, 86.1, 83.5, 74.2, 71.9, 68.8, 67.3, 63.1, 50.5, 49.0, 47.7, 46.1, 36.4, 34.9, 29.6, 24.4, 21.2, 17.9; m/z calculée pour $\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 462.29277, SM trouvée: 462.4, SMHR trouvée: 462.29314.



Verdamicine C2a
(5.23)

Verdamicine C2a (5.23). $[\alpha]_D +53.6^\circ$ (c 0.7, CHCl_3); ^1H NMR (400 MHz, D_2O), δ (ppm): 5.35 (dd, $J = 17.82, 1.88$ Hz, 1H), 5.06 (d, $J = 3.88$ Hz, 1H), 4.93 (dd, $J = 4.58, 2.72$ Hz, 1H), 4.03 (d, $J = 12.43$ Hz, 1H), 3.80 (dd, $J = 10.75, 3.87$ Hz, 1H), 3.68-3.38 (m, 3H), 3.38-3.18 (m, 2H), 3.17-3.02 (m, 1H), 3.00-2.72 (m, 3H), 2.62 (dd, $J = 10.64, 7.03$ Hz, 1H), 2.57-2.47 (m, 3H), 2.31-2.12 (m, 1H), 2.07-1.87 (m, 2H), 1.31-1.11 (m, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, D_2O), δ (ppm): 149.6, 100.2, 96.0, 86.5, 83.5, 74.2, 71.9, 68.9, 67.3, 63.1, 50.5, 49.0, 47.7, 46.1, 36.4, 34.9, 29.6, 24.5, 21.2, 17.9; m/z calculée pour $\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 462.29277, SM trouvée: 462.4, SMHR trouvée: 462.29228.

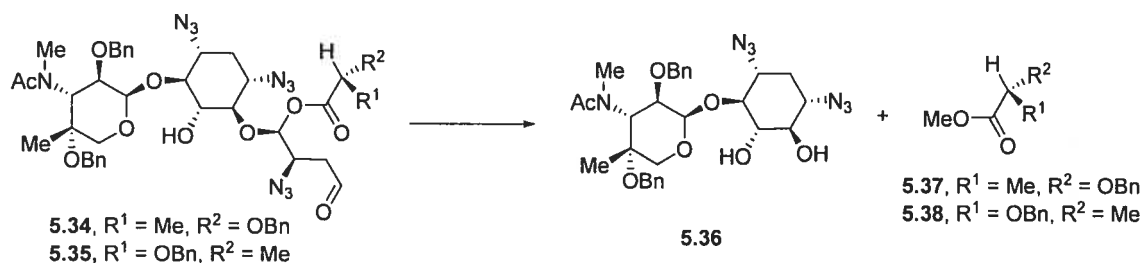


**4-O-[2-Azido-6-O-benzyl-6-C-méthyl-2,3,4-tridésoxy- α -D-glycéro-hex-4-
 ènopyransyl]-6-O-[3-N-acétyl-3-amino-2,4-di-O-benzyl-3-N-méthyl-4-C-méthyl-3-
 désoxy- β -L-arabinopyransyl]-1,3-diazido-1,3-désamino-2-déoxystreptamine**

(**5.32-5.33**). Le mélange des composés **5.28-5.29** (150 mg, 0.258 mmol) a été dissout dans MeOH (5 mL) et une solution fraîchement préparée de MeONa dans MeOH a été ajoutée tranquillement jusqu'à ce que le pH atteigne 11.5. 5 h plus tard, AcOH a été ajoutée jusqu'à ce que le pH soit neutre et le solvant a été évaporé sous pression réduite. Le résidu a été dissout dans AcOEt et la phase organique a été lavée avec une solution saturée de NaHCO₃. La phase organique a été séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée sous pression réduite, puis le résidu a été dissout dans THF anhydre (5 mL). Une quantité catalytique de Bu₄Ni (5.00 mg, 0.0130 mmol) et du bromure de benzyle (306 μ L, 2.57 mmol) ont été ajoutés suivi de l'addition de NaH (60% dans l'huile) (52.5 mg, 1.29 mmol) en 3 portions. La solution a été agitée pour la nuit, puis une solution saturée de NH₄Cl a été ajoutée, puis la phase organique séparée et séchée sur Na₂SO₄ avant d'être évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (1% de MeOH dans CH₂Cl₂) pour donner les composés **5.32-5.33** (161 mg, 73%); [α]_D +68.4° (c 1.0, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.41-7.19 (m, 15H), 6.03-5.85 (m, 1H), 5.43 (d, *J* = 3.73 Hz, 1H), 5.14-4.43 (m, 8H), 4.37-3.99 (m, 1H), 3.91-3.20 (m, 6H), 3.06 (t, *J* = 32.73 Hz, 2H), 2.61-2.42 (m, 1H), 2.39-2.23 (m, 2H), 2.21-2.04 (m, 6H), 1.97-1.70 (m, 1H), 1.58-1.37 (m, 1H), 1.34-1.27 (m, 3H) 1.18 (d, *J* = 37.63 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 173.9-169.2 (m, 2C), 150.6, 131.1-126.4 (m, 18C), 98.1, 97.3, 95.4, 94.4, 87.8, 85.1, 78.3, 75.6, 74.3-69.2 (m, 6C), 67.5, 66.8-65.7 (m, 1C), 60.4-59.1 (m, 1C), 55.8, 52.3, 42.7, 32.7-32.0 (m, 1C), 23.2-20.3 (m, 4C); *m/z* calculée pour C₄₃H₅₂N₁₀O₉ [M+H]⁺: 853.39770, SM trouvée: 853.6, SMHR trouvée: 853.39688.

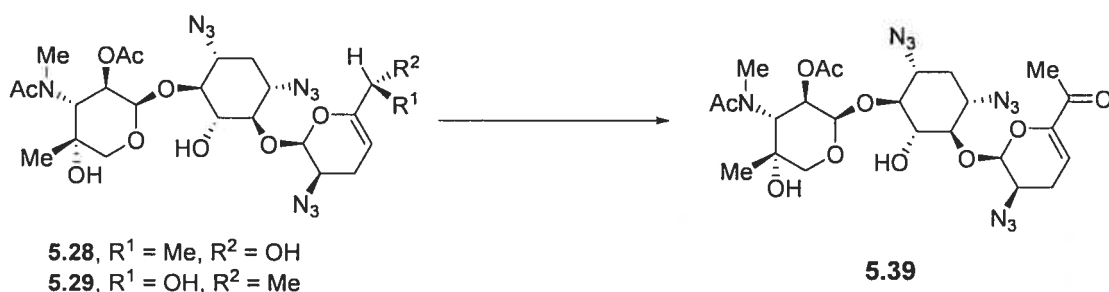


Composés 5.34 et 5.35. Le mélange des composés **5.32-5.33** (100 mg, 0.117 mmol) a été dissout dans CH₂Cl₂ (10 mL) et la solution a été refroidie à -78 °C. De l'ozone a été bullé dans le ballon jusqu'à ce que la solution devienne bleue pâle et 1 h plus tard de l'argon a été bullé dans le ballon pour enlever l'excès d'ozone (10 min). Par la suite, Me₂S (86.0 µL, 1.17 mmol) a été ajouté et la solution a été réchauffée à TP. 2 h plus tard, le solvant a été évaporé sous pression réduite et le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (2% MeOH dans CH₂Cl₂) pour donner un mélange inséparable des produits dicarbonylés **5.34-5.35** (57.3 mg, 55%) qui a été utilisé rapidement. *m/z* calculée pour C₄₃H₅₂N₁₀O₁₁ [M+H]⁺: 885.38953, SM trouvée: 885.5

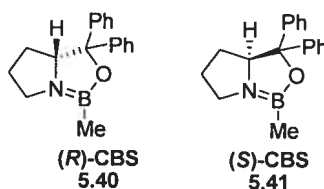
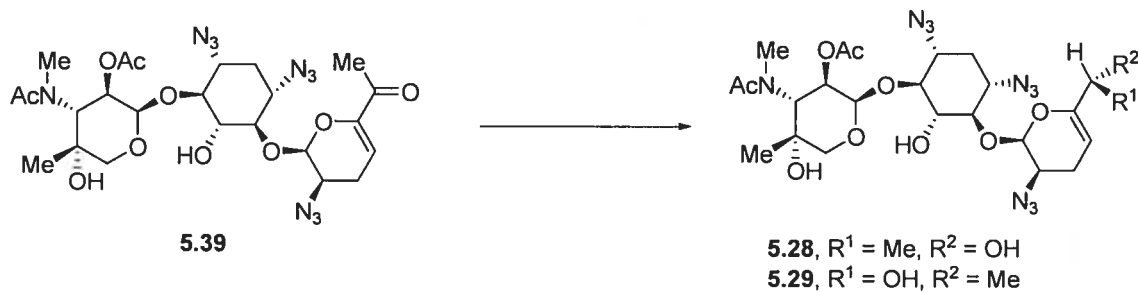


6-O-(3-N-acétyl-3-amino-2,4-di-O-benzyl-3-N-méthyl-4-C-méthyl-3-désoxy-β-L-arabinopyranosyl)-1,3-diazido-1,3-désamino-2-déoxystreptamine (5.36). Le mélange des composés **5.34-5.35** (50 mg, 0.058 mmol) a été dissout dans MeOH (2 mL) et une solution fraîchement préparée de MeONa dans MeOH a été ajoutée tranquillement jusqu'à ce que le pH atteigne 11. Le lendemain matin, AcOH a été ajoutée jusqu'à ce que le pH soit neutre et le solvant a été évaporé sous pression réduite. Le résidu a été dissout dans AcOEt et la phase organique a été lavée avec une solution de saturée de NaHCO₃. La phase organique a été séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (20% AcOEt dans l'hexane) pour donner un mélange des composés **5.37-5.38** (11 mg, 48%) dont les propriétés spectroscopiques ont été en accord avec celles déjà publiées.⁸ La séparation des énantiomères **5.37-5.38** a été réalisée en utilisant les conditions décrites au paragraphe suivant. Le solvant d'éluion a été remplacé par du CH₂Cl₂ et un gradient de MeOH jusqu'à 2% de MeOH a été réalisé pour obtenir le composé **5.36** (49 mg, 70%); [α]_D +61.7° (c 0.7, CHCl₃); 7.38-7.21 (m, 10H), 5.43 (d, *J* = 3.96 Hz, 1H), 4.86-4.57 (m, 5H), 4.32-4.16 (m, 1H), 3.91-3.77 (m, 2H), 3.64-3.51 (m, 3H) 3.06 (s, 1H), 2.96-2.83 (m, 3H), 2.11-2.02 (m, 3H), 1.93-1.75 (m, 2H), 1.57-1.42 (m, 1H), 1.34-1.27 (m, 3H); *m/z* calculée pour C₂₉H₃₇N₇O₇ [M+H]⁺: 596.38327, SM trouvée: 596.6, SMHR trouvée: 596.38258.

Conditions utilisées pour la séparation des composés **5.36** et **5.37** par GC-FID: Colonne Supelco β-dex 30 m x 0.25 mm. Température de l'injecteur et du détecteurs : 250 °C, température initiale : 70 °C, gradient : 2°C/min, température finale : 220 °C, détecteur : FID, temps de rétention **5.37** 31.0 min: et **5.38** : 31.6 min.

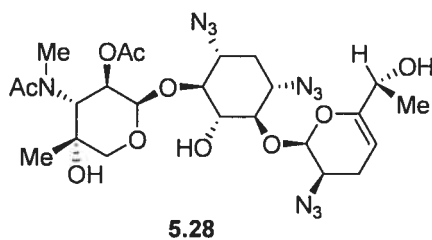


4-O-[[2-Azido-5-C-acétyl-2,3,4,6-tétradésoxy- α -D-glycéro-hex-4-ènopyransyl]-6-O-{3-N-acétyl-2-O-acétyl-3-amino-3-N-méthyl-4-C-méthyl-3-désoxy- β -L-arabinopyransyl]-1,3-diazido-1,3-désamino-2-déoxystreptamine (5.39). Le mélange des composés 5.28-5.29 (500 mg, 0.800 mmol) a été dissout dans CH₂Cl₂ (20 mL), puis le périodinate de Dess-Martin (441 mg, 1.04 mmol) a été ajouté. 1 h plus tard, une solution saturée de NaHCO₃ (10 mL) a été ajoutée suivie d'une solution de thiosulfate de sodium 1 M (2 mL) et la phase organique a été séparée, puis séchée sur Na₂SO₄ avant d'être évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (2% de MeOH dans CH₂Cl₂) pour donner le composé 5.39 (410 mg, 82%), [α]_D +15.2° (c 1.0, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.13-6.09 (m, 1H), 5.95-5.86 (m, 1H), 5.60-5.26 (m, 1H), 5.09 (d, J = 11.87 Hz, 1H), 4.74-4.48 (m, 1H), 4.15 (d, J = 11.99 Hz, 1H), 3.87-3.59 (m, 2H), 3.58-3.22 (m, 5H), 3.04 (t, J = 33.09 Hz, 3H), 2.79-2.39 (m, 2H), 2.37-2.20 (m, 4H), 2.20-2.01 (m, 6H), 1.51-1.27 (m, 1H), 1.18 (d, J = 36.41 Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 193.2, 174.4-169.6 (m, 2C), 146.6, 108.3, 98.3-96.5 (m, 2C), 87.7, 84.9, 80.0, 75.3, 74.2, 72.8, 69.9-69.5 (m, 1C), 67.7, 67.9-66.4 (m, 1C), 59.9-59.4 (m, 1C), 54.2, 52.2, 43.0, 32.6-32.1 (m, 1C), 25.5, 23.2-20.2 (m, 3C); m/z calculée pour C₂₄H₃₄N₁₀O₁₀ [M+H]⁺: 623.25376, SM trouvée: 623.4, SMHR trouvée: 623.25158.

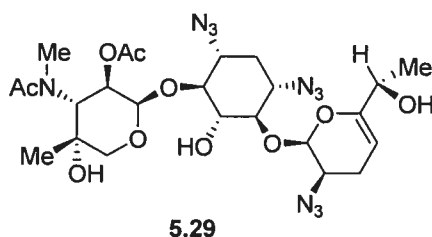


Réduction diastéréosélective du composé 5.39:

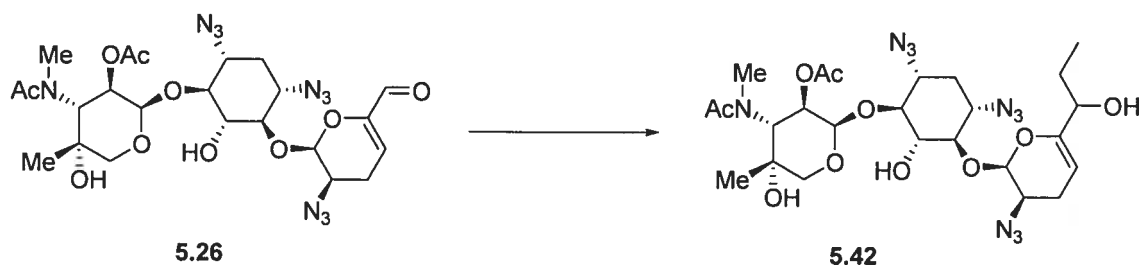
Une solution du composé **5.40** ou **5.41** 1M dans THF (1.61 μ L, 1.61 mmol) a été ajoutée à une solution du complexe THF·BH₃ (1.61 mL d'une solution 1M dans THF, 1.61 mmol) dans le THF (10 mL au total). 5 min plus tard, le composé **5.39** (500 mg, 0.803 mmol) en solution dans le THF (5 mL) a été ajouté et 10 min plus tard NH₄Cl a été ajouté puis le THF a été évaporé sous pression réduite. Le résidu a été repris dans AcOEt et la phase organique a été lavée avec de l'eau, séchée sur Na₂SO₄ avant d'être évaporée sous pression réduite. Le résidu dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ a été purifié par chromatographie éclair (2% de MeOH dans CH₂Cl₂) pour donner les composés diastéréomériques **5.29** (347 mg, 69%) ou **5.28** (368 mg, 73%) respectivement selon un ratio supérieur à 15:1 dans les deux cas.



4-O-[[2-Azido-6-(*R*)-*C*-méthyl-2,3,4-tridésoxy- α -D-glycéro-hex-4-ènopyranosyl]-6-O-[[3-*N*-acétyl-2-*O*-acétyl-3-amino-3-*N*-méthyl-4-*C*-méthyl-3-désoxy- β -L-arabinopyranosyl]-1,3-diazido-1,3-désamino-2-désoxystreptamine (5.28). $[\alpha]_D^{+20.3^\circ}$ (c 1.0, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.02-5.81 (m, 1H), 5.41 (d, $J = 3.66$ Hz, 1H), 5.12-4.95 (m, 1H), 4.72-4.46 (m, 1H), 4.34-3.95 (m, 1H), 3.88-3.64 (m, 4H), 3.64-3.35 (m, 4H), 3.35-3.23 (m, 1H), 3.04 (t, $J = 33.84$ Hz, 2H), 2.57-2.38 (m, 1H), 2.38-2.23 (m, 2H), 2.19-2.01 (m, 6H), 1.95-1.73 (m, 1H), 1.55-1.38 (m, 1H), 1.38-1.29 (m, 3H) 1.19 (d, $J = 38.03$ Hz, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 174.2-169.3 (m, 2C), 151.1, 98.2, 97.5, 95.5, 94.5, 87.6, 84.9, 78.2, 75.2, 74.1, 72.6, 69.4, 67.7, 66.9-66.1 (m, 1C), 60.2-59.2 (m, 1C), 54.6, 51.9, 42.8, 32.5-31.9 (m, 1C), 23.0-20.2 (m, 4C); m/z calculée pour C₂₄H₃₆N₁₀O₁₀ [M+H]⁺: 625.26941, SM trouvée: 625.7, SMHR trouvée: 625.27005.



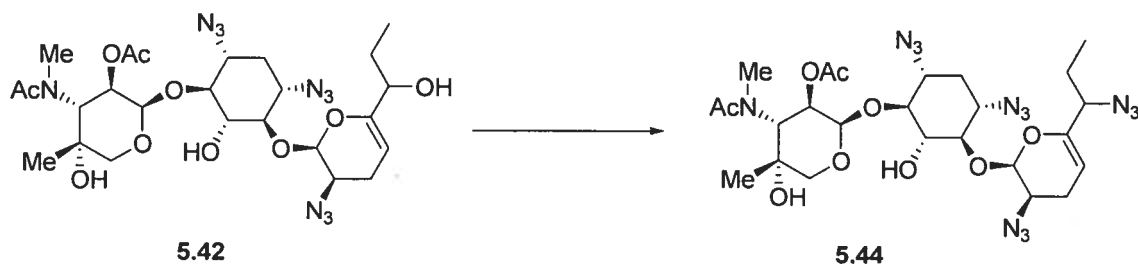
4-O-[[2-Azido-6-(*S*)-*C*-méthyl-2,3,4-tridésoxy- α -D-glycéro-hex-4-ènopyranosyl]-6-O-[[3-*N*-acétyl-2-*O*-acétyl-3-amino-3-*N*-méthyl-4-*C*-méthyl-3-désoxy- β -L-arabinopyranosyl]-1,3-diazido-1,3-désamino-2-désoxystreptamine (5.29). $[\alpha]_D^{+21.5^\circ}$ (c 1.0, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.01-5.77 (m, 1H), 5.42 (d, $J = 3.65$ Hz, 1H), 5.21-4.88 (m, 1H), 4.73-4.47 (m, 1H), 4.22 (s, 1H), 3.89-3.61 (m, 4H), 3.58-3.39 (m, 4H), 3.35-3.23 (m, 1H), 3.05 (t, $J = 33.90$ Hz, 2H), 2.54-2.38 (m, 1H), 2.38-2.24 (m, 2H), 2.24-2.01 (m, 6H), 1.96-1.74 (m, 1H), 1.44-1.31 (m, 4H), 1.29-1.11 (m, 3H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 174.2-169.4 (m, 2C), 151.7, 98.2, 97.4, 96.0, 93.6, 87.5, 84.8, 79.3, 78.5, 75.2, 74.2, 72.6, 69.6-69.3 (m, 1C), 67.5, 66.9-66.1 (m, 1C), 59.8-59.2 (m, 1C), 54.7, 51.9, 42.8, 32.5-31.8 (m, 1C), 23.1-20.0 (m, 4C); m/z calculée pour C₂₄H₃₆N₁₀O₁₀ [M+H]⁺: 625.26941, SM trouvée: 625.7, SMHR trouvée: 625.26811.



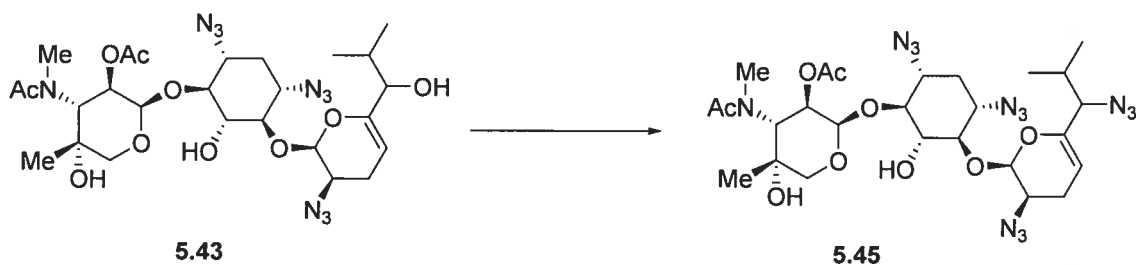
4-*O*-[2-Azido-6-*C*-éthyl-2,3,4-tridésoxy- α -D-glycéro-hex-4-énopyranosyl]-6-*O*-[3-*N*-acétyl-2-*O*-acétyl-3-amino-3-*N*-méthyl-4-*C*-méthyl-3-désoxy- β -L-arabinopyranosyl]-1,3-diazido-1,3-désamino-2-désoxystreptamine (5.42). Le composé **5.26** (750 mg, 1.23 mmol) a été dissout dans THF anhydre (15 mL) puis la solution a été refroidie à $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Une solution d'EtMgBr 3.0 M dans l'éther (1.64 mL, 4.93 mmol) a été ajoutée suivie, 15 min. plus tard, d'une solution saturée de NH_4Cl . La phase organique a été séparée et séchée sur Na_2SO_4 . Le solvant a été évaporé et le résidu dissout dans un minimum de CH_2Cl_2 a été purifié par chromatographie éclair (2% de MeOH dans CH_2Cl_2) pour donner le composé **5.42** (532 mg, 70%) probablement sous forme d'épimères en C6' inséparables dont le ratio n'a pas été déterminé. $[\alpha]_{\text{D}} +38.4^{\circ}$ (c 1.0, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 6.02-5.74 (m, 1H), 5.42 (d, $J = 3.67$ Hz, 1H), 4.94 (s, 1H), 4.74-4.35 (m, 1H), 4.32-3.97 (m, 1H), 3.98-3.86 (m, 1H), 3.86-3.61 (m, 2H), 3.56-3.28 (m, 5H), 3.04 (t, $J = 34.07$ Hz, 3H), 2.60-2.37 (m, 1H), 2.37-2.23 (m, 2H), 2.23-2.05 (m, 6H), 2.05-1.82 (m, 1H), 1.75-1.61 (m, 2H), 1.48-1.31 (m, 1H), 1.19 (d, $J = 38.99$ Hz, 3H), 1.07-0.82 (m, 3H); m/z calculée pour $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{N}_{10}\text{O}_{10}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 639.28506, SM trouvée: 639.5, SMHR trouvée: 639.28423.



4-O-[[2-Azido-6-C-isopropyl-2,3,4-tridésoxy- α -D-glycéro-hex-4-énopyranosyl]-6-O-[[3-N-acétyl-2-O-acétyl-3-amino-3-N-méthyl-4-C-méthyl-3-désoxy- β -L-arabinopyranosyl]-1,3-diazido-1,3-désamino-2-désoxystreptamine (5.43). Le composé **5.26** (750 mg, 1.23 mmol) a été dissout dans THF anhydre (15 mL) puis la solution a été refroidie à $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Une solution d' $^i\text{PrMgBr}$ 2.0 M dans l'éther (2.46 mL, 4.93 mmol) a été ajoutée suivie, 15 min. plus tard, d'une solution saturée de NH_4Cl . La phase organique a été séparée et séchée sur Na_2SO_4 . Le solvant a été évaporé et le résidu dissout dans un minimum de CH_2Cl_2 a été purifié par chromatographie éclair (2% de MeOH dans CH_2Cl_2) pour donner le composé **5.43** probablement sous forme d'épimères en C6' inséparables dont le ratio n'a pas été déterminé (428 mg, 55%). $[\alpha]_{\text{D}} +27.9^{\circ}$ (c 0.6, CHCl_3). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 6.03-5.67 (m, 1H), 5.56-5.29 (m, 1H), 5.17-4.84 (m, 2H), 4.71-4.00 (m, 1H), 3.86-3.61 (m, 3H), 3.60-3.34 (s, 5H), 3.34-3.23 (m, 1H), 3.21-2.91 (m, 3H), 2.60-2.40 (m, 1H), 2.40-2.25 (m, 1H), 2.25-2.02 (m, 6H), 2.02-1.85 (m, 1H), 1.85-1.64 (m, 1H), 1.59-1.34 (m, 1H), 1.20 (d, $J = 36.89\text{ Hz}$, 3H), 1.12-0.77 (m, 6H); m/z calculée pour $\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_{10}\text{O}_{10}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 653.30071, SM trouvée: 653.6, SMHR trouvée: 653.30137.

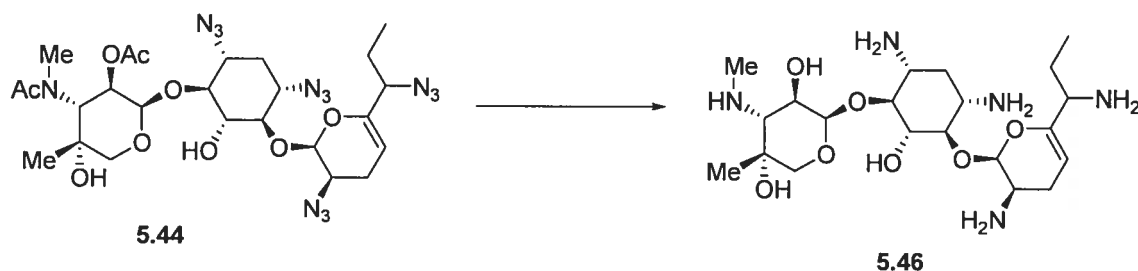


4-O-[[2,6-Diazido-6-C-éthyl-2,3,4,6-tétradésoxy- α -D-glycéro-hex-4-énopyranosyl]-6-O-[[3-N-acétyl-2-O-acétyl-3-amino-3-N-méthyl-4-C-méthyl-3-désoxy- β -L-arabinopyranosyl]-1,3-diazido-1,3-désamino-2-déoxystreptamine (5.44). Le composé **5.40** (530 mg, 0.830 mmol) a été dissout dans CH_2Cl_2 (20 mL), puis de la pyridine (200 μL , 2.50 mmol) a été ajoutée suivie de Ms-Cl (97.0 μL , 1.24 mmol). Trois jours plus tard, de l'eau (5 mL) a été ajoutée et la phase organique a été séparée et lavée avec une solution de HCl 0.5 M, puis avec une solution saturée de NaHCO_3 . La phase organique a ensuite été séchée sur Na_2SO_4 puis évaporée sous pression réduite. Le résidu a été dissout dans DMF (10 mL) et NaN_3 (270 mg, 4.1 mmol) a été ajouté et la solution a été chauffée à 80 °C. 16 h plus tard, le solvant a été évaporé puis le résidu a été dissout dans AcOEt . La phase organique a été lavée avec de l'eau, séchée sur Na_2SO_4 et évaporée sous pression réduite. Le résidu a été dissout dans un minimum de CH_2Cl_2 et purifié par chromatographie éclair (2% de MeOH dans CH_2Cl_2) pour donner le composé **5.44** (240 mg, 45%) probablement sous forme d'épimères en C6' inséparables dont le ratio n'a pas été déterminé. $[\alpha]_D +41.6^\circ$ (c 1.0, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 6.05-5.80 (m, 1H), 5.56-5.05 (m, 2H), 5.00-4.59 (m, 1H), 4.45-3.97 (m, 1H), 3.87-3.63 (m, 3H), 3.61-3.34 (m, 4H), 3.32-3.20 (m, 1H), 3.05 (t, $J = 34.08$ Hz, 3H), 2.57-2.40 (m, 1H), 2.40-2.21 (m, 2H), 2.21-2.05 (m, 6H), 1.91-1.60 (m, 2H), 1.54-1.30 (m, 1H), 1.29-1.11 (m, 3H), 1.08-0.91 (m, 3H); m/z calculée pour $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{N}_{13}\text{O}_9$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 664.29154, SM trouvée: 664.6, SMHR trouvée: 664.29048.

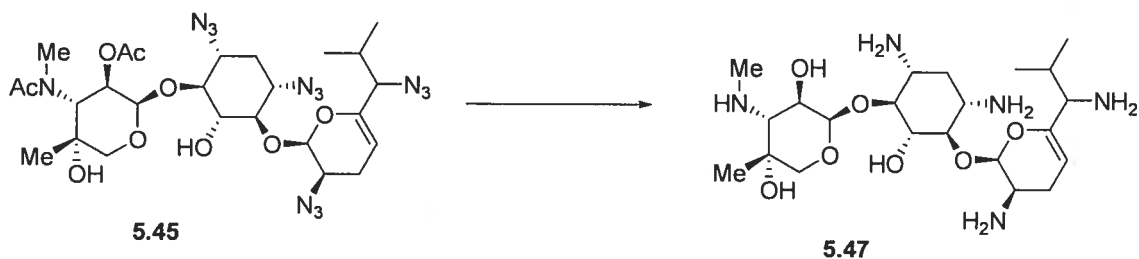


**4-*O*-[2,6-Diazido-6-*C*-isopropyl-2,3,4,6-tétradésoxy- α -*D*-glycéro-hex-4-
énopyranosyl]-6-*O*-[3-*N*-acétyl-2-*O*-acétyl-3-amino-3-*N*-méthyl-4-*C*-méthyl-3-
désoxy- β -*L*-arabinopyranosyl]-1,3-diazido-1,3-désamino-2-désoxystreptamine**

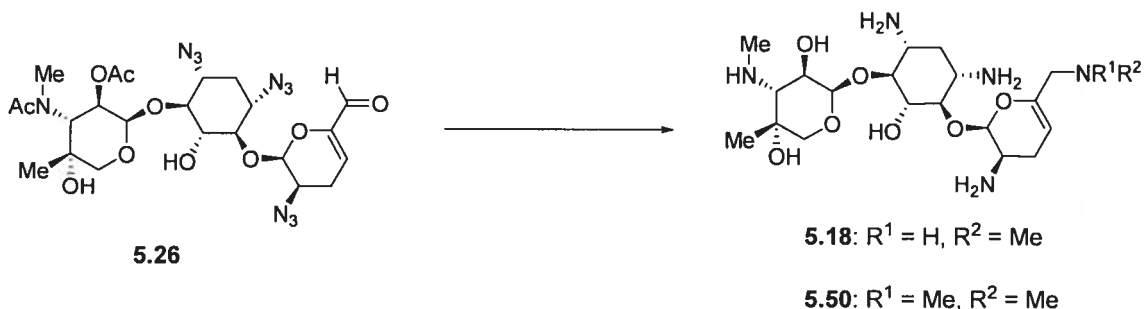
(5.45). Le composé 5.43 (420 mg, 0.640 mmol) a été dissout dans CH₂Cl₂ (20 mL), puis de la pyridine (156 μ L, 1.93 mmol) a été ajoutée suivie de Ms-Cl (75.0 μ L, 0.970 mmol). Trois jours plus tard, de l'eau (5 mL) a été ajoutée et la phase organique a été séparée et lavée avec une solution de HCl 0.5 M, puis avec une solution saturée de NaHCO₃. La phase organique a ensuite été séchée sur Na₂SO₄ puis évaporée sous pression réduite. Le résidu a été dissout dans DMF (10 mL). NaN₃ (209 mg, 3.2 mmol) a été ajouté et la solution a été chauffée à 80 °C. 16 h plus tard, le solvant a été évaporé puis le résidu a été dissout dans AcOEt. La phase organique a été lavée avec de l'eau, séchée sur Na₂SO₄ et évaporée sous pression réduite. Le résidu a été dissout dans un minimum de CH₂Cl₂ et purifié par chromatographie éclair (2% de MeOH dans CH₂Cl₂) pour donner le composé 5.45 (171 mg, 40%) probablement sous forme d'épimères en C6' inséparables dont le ratio n'a pas été déterminé. $[\alpha]_D +34.2^\circ$ (c 0.5, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.03-5.81 (m, 1H), 5.57-5.06 (m, 2H), 5.04-4.59 (m, 1H), 4.39-4.01 (m, 1H), 3.91-3.63 (m, 4H), 3.70-3.36 (m, 5H), 3.34-3.21 (m, 1H), 3.05 (m, 3H), 2.61-2.46 (m, 3H), 2.24-2.03 (m, 6H), 1.95-1.62 (m, 2H), 1.57-1.31 (m, 1H), 1.08-0.91 (m, 6H); *m/z* calculée pour C₂₆H₃₉N₁₃O₉ [M+H]⁺: 678.30719, SM trouvée: 679.5, SMHR trouvée: 678.30627.



4-O-[[2,6-Diamino-6-C-éthyl-2,3,4,6-tétradésoxy- α -D-glycéro-hex-4-énopyranosyl]-2-O-[[3-amino-3-N-méthyl-4-C-méthyl-3-désoxy- β -L-arabinopyranosyl]-2-désoxystreptamine (5.46). Le composé **5.44** (100 mg, 0.150 mmol) a été dissout dans MeOH (20 mL) et une solution fraîchement préparée de MeONa dans MeOH a été ajoutée jusqu'à ce que le pH atteigne 12. La solution a été chauffée à reflux pour 18 h et un spectre de masse a indiqué que la réaction était terminée. m/z calculée pour $C_{21}H_{34}N_{13}O_7$ $[M+H]^+$: 580.3, SM trouvée: 581.0. À ce moment, le solvant a été évaporé sous pression réduite et le résidu a été mis en suspension dans THF (10 mL). De l'eau (2 mL), suivi d'une solution 1.0 M de la triméthylphosphine dans THF (4.62 mL, 4.62 mmol) ont été ajoutés. 1 h plus tard, les solvants ont été évaporés et le résidu dissout dans 1 mL NH_4OH 1M dans H_2O a été purifié par HPLC préparative pour donner le composé **5.46** (20.1 mg, 28%) probablement sous forme d'épimères en C6' inséparables dont le ratio n'a pas été déterminé. Conditions pour la purification préparative: colonne Waters X-bridge Prep Shield RP18 (19x150mm, 5 μ); phase mobile : 0 à 20% solvant B dans solvant A sur 60 min (solvant A: 10 mM NH_4OH dans H_2O , solvant B: 10 mM NH_4OH dans CH_3CN). $[\alpha]_D^{+42.5^\circ}$ (c 0.8, $CHCl_3$). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 5.07 (s, 1H), 4.99-4.85 (m, 1H), 5.26 (s, 1H), 4.12-3.97 (m, 1H), 3.79 (s, 1H), 3.65-3.37 (m, 2H), 3.37-3.18 (m, 3H), 3.18-3.04 (m, 1H), 2.96-2.75 (m, 3H), 2.69-2.57 (m, 1H), 2.53 (d, $J = 2.68$ Hz, 3H), 2.33-2.14 (m, 1H), 1.98 (s, 2H), 1.74-1.48 (m, 2H), 1.21 (s, 3H), 0.87 (m, 3H); ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 149.8, 101.4, 98.0, 87.5, 86.7, 80.4, 75.0, 73.0, 69.9, 68.4, 64.2, 55.2, 51.6, 50.2, 47.3, 37.6, 36.0, 26.5, 26.0, 22.3, 10.3; m/z calculée pour $C_{21}H_{41}N_5O_7$ $[M+H]^+$: 476.30842, SM trouvée: 476.9, SMHR trouvée: 476.30791.

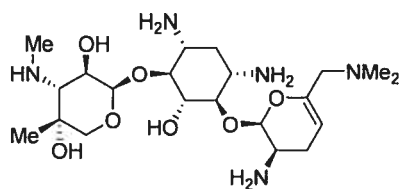


**4-*O*-[2,6-Diamino-6-*C*-isopropyl-2,3,4,6-tétradésoxy- α -D-glycéro-hex-4-
 ènopyranosyl]-6-*O*-[3-amino-3-*N*-méthyl-4-*C*-méthyl-3-désoxy- β -L-
 arabinopyranosyl]-2-désoxystreptamine (5.47).** Le composé **5.45** (100 mg, 0.150 mmol) a été dissout dans MeOH (20 mL) et une solution fraîchement préparée de MeONa dans MeOH a été ajoutée jusqu'à ce que le pH atteigne 12. La solution a été chauffée à reflux pour 18 h et un spectre de masse a indiqué que la réaction était terminée. m/z calculée pour $C_{22}H_{36}N_{13}O_7$ $[M+H]^+$: 594.3, SM trouvée: 594.9. À ce moment, le solvant a été évaporé sous pression réduite et le résidu a été mis en suspension dans THF (10 mL). De l'eau (2 mL), suivi d'une solution 1.0 M de la triméthylphosphine dans THF (4.62 mL, 4.62 mmol) ont été ajoutés. 1 h plus tard, les solvants ont été évaporés et le résidu dissout dans 1 mL NH_4OH 1M dans H_2O a été purifié par HPLC préparative pour donner le composé **5.47** (13.5 mg, 19%) probablement sous forme d'épimères en C6' inséparables dont le ratio n'a pas été déterminé. Conditions pour la purification préparative: colonne Waters X-bridge Prep Shield RP18 (19x150mm, 5 μ); phase mobile : 0 à 20% solvant B dans solvant A sur 60 min (solvant A: 10 mM NH_4OH dans H_2O , solvant B: 10 mM NH_4OH dans CH_3CN). $[\alpha]_D^{25} +34.7^\circ$ (c 0.5, $CHCl_3$). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 5.23 (m, 1H), 5.07 (s, 1H), 5.00-4.84 (m, 1H), 4.10-3.98 (m, 1H), 3.89-3.76 (m, 1H), 3.68-3.37 (m, 2H), 3.37-3.21 (m, 2H), 3.21-3.02 (m, 2H), 2.85 (s, 3H), 2.74-2.61 (m, 1H), 2.56 (d, $J = 5.83$ Hz, 3H), 2.39-2.14 (m, 1H), 2.09-1.81 (m, 3H), 1.21 (s, 3H), 0.93 (m, 6H); ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$), δ (ppm): 149.1, 101.7, 101.3, 87.4, 86.8, 80.3, 75.0, 72.9, 69.8, 68.4, 64.2, 60.0, 51.6, 50.2, 47.2, 37.4, 35.8, 30.5, 26.3, 22.2, 19.8, 18.2; m/z calculée pour $C_{22}H_{43}N_5O_7$ $[M+H]^+$: 490.32407, SM trouvée: 491.6, SMHR trouvée: 490.32356.



Procédure générale pour les aminations réductrices suivies des déprotections finales (composés 5.18 et 5.48) :

L'aldéhyde **5.26** (80 mg, 0.13 mmol) ainsi que l'amine appropriée (0.40 mmol) ont été dissouts dans du MeOH (3 mL). Par la suite, AcOH (0.1 mL) suivi d'une solution 1.0 M de NaBH₃CN dans THF (0.26 mL, 0.26 mmol) ont été ajoutés. Le lendemain matin, une CCM a indiquée que l'aldéhyde était complètement consommé et une solution fraîchement préparée de MeONa dans MeOH a été ajoutée jusqu'à ce que le pH atteigne 12. La solution a été chauffée à reflux pour 18 h et un spectre de masse a indiqué que la réaction était terminée. À ce moment, le solvant a été évaporé sous pression réduite et le résidu a été mis en suspension dans THF (10 mL). De l'eau (2 mL), suivi d'une solution 1.0 M de la triméthylphosphine dans THF (4.6 mL, 4.6 mmol) ont été ajoutés. 1 h plus tard, les solvants ont été évaporés et le résidu dissout dans 1 mL NH₄OH 1M dans H₂O a été purifié par HPLC préparative pour donner l'antibiotique G-52 (**5.18**) (23.6 mg, 24%) dont les propriétés spectroscopiques ont été en accord avec celles déjà publiées⁹ et le composé **5.50** (16.2 mg, 27%). Conditions pour la purification préparative: colonne Waters X-bridge Prep Shield RP18 (19x150mm, 5 μ); phase mobile : 0 à 20% solvant B dans solvant A sur 60 min (solvant A: 10 mM NH₄OH dans H₂O, solvant B: 10 mM NH₄OH dans CH₃CN).



5.50

**4-O-{{2,6-Diamino-6,6-N-diméthyl-2,3,4,6-tétradésoxy- α -D-glycéro-hex-4-
 ènopyranosyl}}-6-O-{{3-amino-3-N-méthyl-4-C-méthyl-3-déoxy- β -L-
 arabinopyranosyl}}-2-déoxystreptamine (5.50). $[\alpha]_D +85.7^\circ$ (c 0.6, CHCl_3) ^1H NMR
 (400 MHz, D_2O), δ (ppm): 5.32 (m, 1H), 5.07 (m, 1H), 4.89 (m, 1H), 4.05 (m, 1H), 3.79
 (m, 1H), 3.55-3.31 (m, 2H), 3.27-3.25 (m, 4H), 3.08 (m, 1H), 2.88 (m, 1H), 2.73 (m,
 1H), 2.58 (m, 1H), 2.52 (s, 3H), 2.21 (s, 6H), 1.95 (m, 2H), 1.241.17 (m, 4H); ^{13}C NMR
 (101 MHz, D_2O), δ (ppm): 145.4, 101.4, 100.7, 100.3, 87.4, 85.0, 74.9, 72.8, 69.8, 68.2,
 63.9, 60.6, 51.3, 50.7, 46.8, 44.6 (2C), 37.3, 35.8, 25.1, 21.9; m/z calculée pour
 $\text{C}_{21}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 476.30842, SM trouvée: 476.4, SMHR trouvée: 476.30598.**

6.6 Références pour le Chapitre 6.

- 1) Hanessian, S.; Takamoto, T.; Massé, R.; Patil, G. Aminoglycoside Antibiotics: Chemical Conversion of Neomycin B, Paromomycin, and Lividomycin B into Bioactive Pseudosaccharides. *Can. J. Chem.* **1978**, *56*, 1482-1491.
- 2) Umezawa, S.; Koto, S.; Tatsuta, K., Tsumura, T. Studies of Aminosugars XXI. Total Synthesis of Kanamycin C. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1969**, *42*, 529-533.
- 3) Haskell, T. H.; French, J. C.; Bartz, Q. R. Paromomycin. II. Paromobiosamine, a Diaminohexosyl-D-ribose. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 3481-3481.
- 4) McKay, G. A.; Thompson, P. R.; Wright, G. D. Broad Spectrum Aminoglycoside Phosphotransferase Type III from *Enterococcus*: Overexpression, Purification, and Substrate Specificity. *Biochemistry* **1994**, *33*, 6936-6944.
- 5) Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.
- 6) (a) Heller, D. N.; Clark, S. B.; Righter, H. F. Confirmation of Gentamicin and Neomycin in Milk by Weak Cation-Exchange Extraction and Electrospray Ionization/Ion Trap Tandem Mass Spectrometry. *J. Mass. Spectrom.* **2000**, *35*, 39-49; (b) Kalinkevich, A. N.; Sukhodub, L. F. Interactions Between Aminoglycoside Antibiotics and Carbohydrates Studied by ²⁵²Cf Plasma Desorption Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 2370-2372; (c) Kotretsou, S. I.; Constantinou-Kokotou, V. Mass Spectrometric Studies on the Fragmentation and Structural Characterization of Aminoacyl Derivatives of Kanamycin A. *Carbohydrate Research* **1998**, *310*, 121-127.

- 7) Thompson, P. R.; Hughes, D. W.; Wright, G. D. Regiospecificity of Aminoglycoside Phosphotransferase from Enterococci and Staphylococci APH(3')-IIIa. *Biochemistry* **1996**, *35*, 8686-8695.
- 8) Dubost, C.; Leroy, B.; Marko, I. E.; Tinant, B.; Declercq, J.; Bryans, J. Stereoselective Synthesis of Functionalized Triol Units by SnCl₄ Promoted Allylation of α -benzyloxyaldehydes: Crucial Role of the Stoichiometry of the Lewis Acid. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 7693-7704.
- 9) Daniels, P. J. L.; Jaret, R. S.; Nagabhushan, T. L.; Turner, W. N. The Structure of Antibiotic G-52, a New Aminocyclitol Aminoglycoside Antibiotic Produced by *Micromonospora zionensis*. *J. Antibiot.* **1976**, *29*, 488-491.

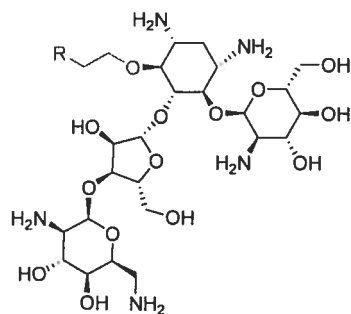
Annexe A

L'analyse HPLC-MS des composés **2.45-2.50**, **2.94-2.131**, **2.137-2.139**, **2.141**, **2.144**, **2.146**, **2.152-2.154**, **3.1-3.2**, **3.38**, **3.39**, **3.42**, **3.48**, **3.49** et **3.51** a été réalisée selon un protocole standard.¹ Un système HPLC Gilson NEBULAtm connecté à un spectromètre de masse Surveyor MSQ de Thermo finnigan a été utilisé. La chromatographie par pairage d'ion a été réalisée avec une colonne Waters XBridgetm C18 2.5 μ 2.1x50mm. Des aliquots de 50 μ L des échantillons préparés à une concentration d'environ 0.5 mg/mL ont été injectés et le débit de la phase mobile a été de 300 μ L/min. Le gradient utilisé pour la phase mobile est présenté au Tableau A1 alors que les temps de rétention observés sont présentés aux Tableaux A2 à A7.

Temps (min)	Durée (min)	0.1% HFBA ^a dans H ₂ O (%)	0.1% HFBA ^a dans CH ₃ CN (%)
0	3	100	0
3	4	60	40
7	4	15	85
11	1	10	90
12	10	100	0
22			

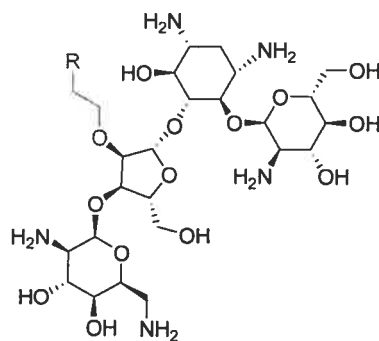
^a HFBA = acide heptafluorobutanoïque.

Tableau A1. Gradient utilisé pour la phase mobile lors de l'analyse HPLC des aminoglycosides semi-synthétiques.



Composé	R	RT min
2.45		11.04
2.46		11.09
2.47		10.98
2.48		11.07
2.49		10.79
2.50		10.94

Tableau A2. Temps de rétention des composés 2.45-2.50.



Composé	R	TR min	Composé	R	TR min
2.94	NH ₂	10.97	2.113		11.10
2.95	NMe ₂	10.96	2.114		11.11
2.96		11.14	2.115		11.21
2.97		11.59	2.116		11.00
2.98		10.50	2.117		13.78
2.99		11.14	2.118		11.37
2.100		10.99	2.119		12.32
2.101		10.93	2.120		11.30
2.102		11.11	2.121		11.48
2.103		11.18	2.122		11.53
2.104		11.09	2.123		11.70
2.105		11.11	2.124		11.51

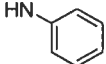
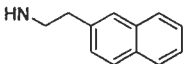
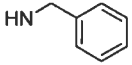
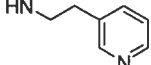
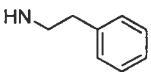
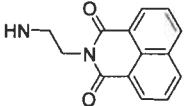
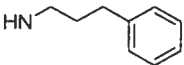
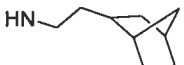
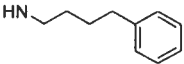
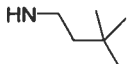

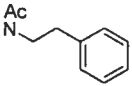
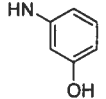
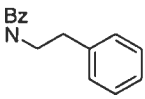
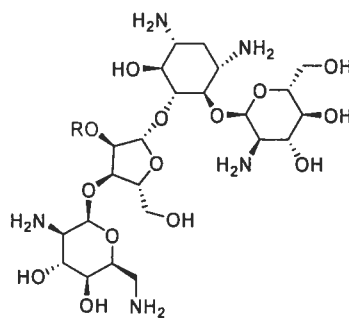
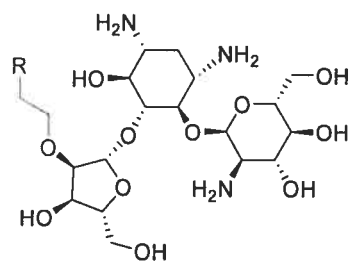
2.106		11.06	2.125		11.49
2.107		11.17	2.126		11.13
2.108		11.28	2.127		10.99
2.109		11.42	2.128		11.41
2.110		11.45	2.129		11.25
2.111		11.09	2.130		11.09
2.112		10.97	2.131		11.17

Tableau A3. Temps de rétention des composés 2.94-2.131.



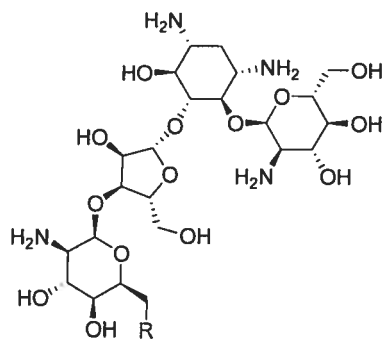
Composé	R	RT min
2.137		10.81
2.138		10.92
2.139		11.23
2.141		10.99
2.144		11.04
2.146	H	10.47

Tableau A4. Temps de rétention des composés 2.137-2.139, 2.141, 2.144 et 2.146.



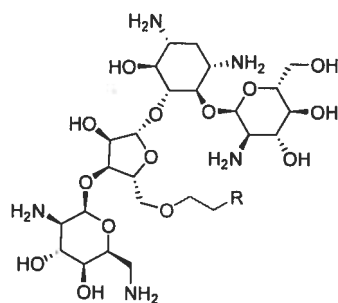
Composé	R	RT
		min
2.152	NH ₂	10.27
2.153	HN—CH ₂ —CH ₂ —CH ₂ —NH ₂	10.58
2.154	HN—CH ₂ —C ₆ H ₅	10.76

Tableau A5. Temps de rétention des composés 2.152-2.154.



Composé	R	RT min
3.38		11.48
3.39		11.63
3.42		11.92

Tableau A6. Temps de rétention des composés 3.38, 3.39 et 3.42.



Composé	R	RT min
3.48	NMe ₂	11.03
3.49		11.68
3.51		11.15

Tableau A7. Temps de rétention des composés **3.48**, **3.49** et **3.51**.

- 1) Löffler, D.; Ternes, T. A. Analytical Method for the Determination of the Aminoglycoside Gentamicin in Hospital Wastewater via Liquid Chromatography–Electrospray-Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2003**, *1000*, 583–588.

Annexe B

Les spectres RMN ^1H pour les composés **2.56**, **2.57**, **2.58**, **2.96** et **2.97** sont présentés à titre d'exemple aux Figures B1, B2, B3, B4 et B5 respectivement.

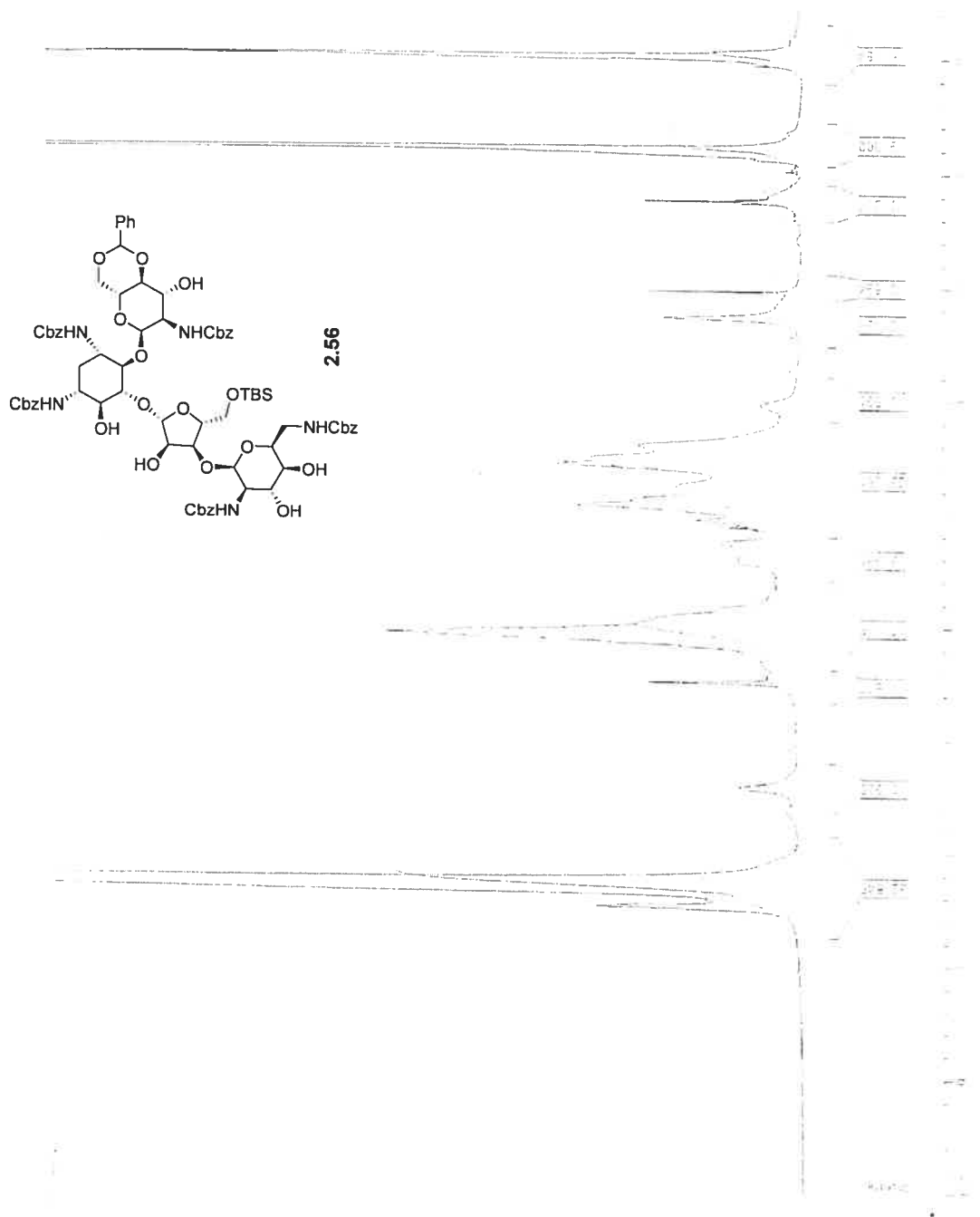


Figure B1. Spectre RMN ^1H pour le composé **2.56**.

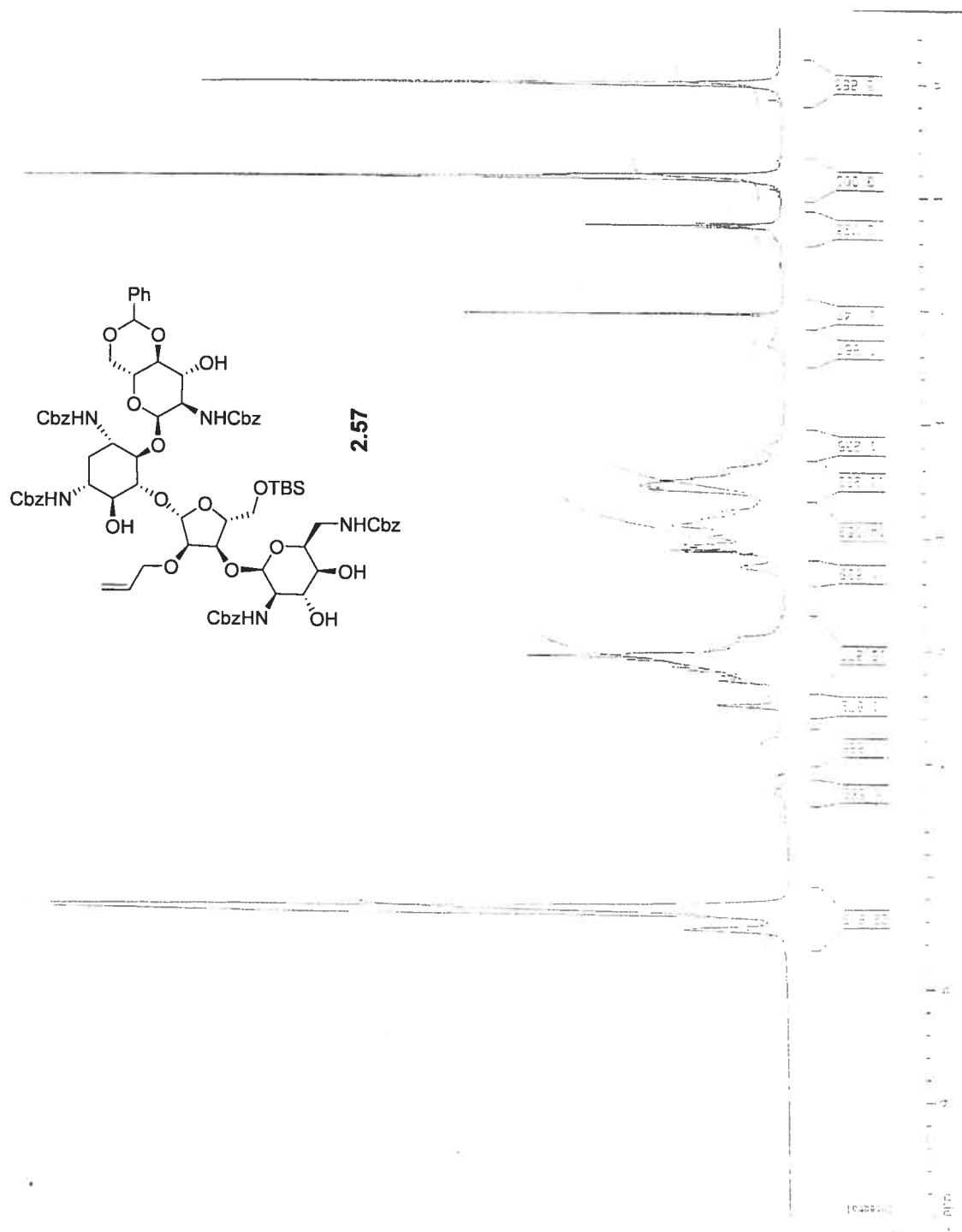


Figure B2. Spectre RMN ^1H pour le composé 2.57.

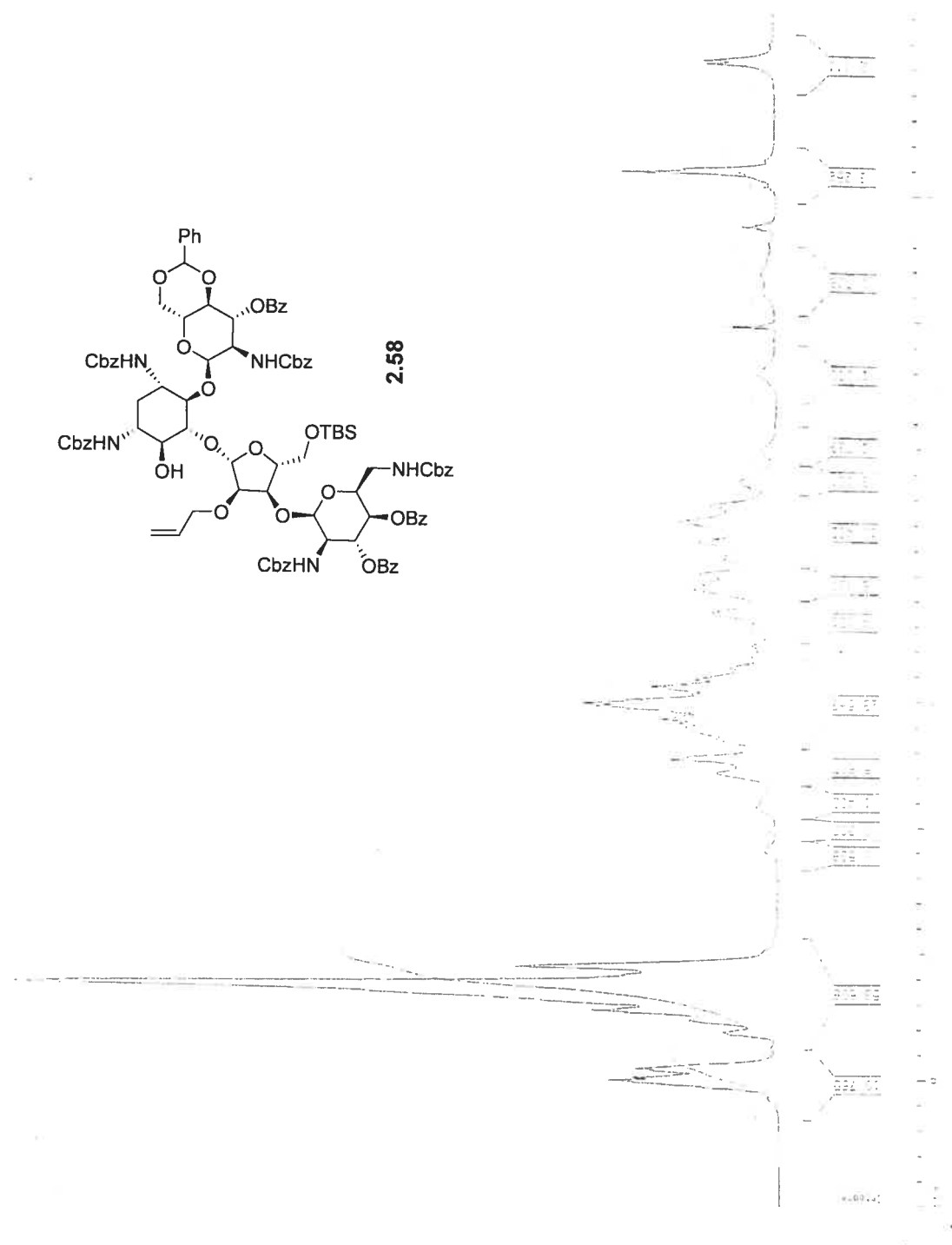


Figure B3. Spectre RMN ^1H pour le composé 2.58.

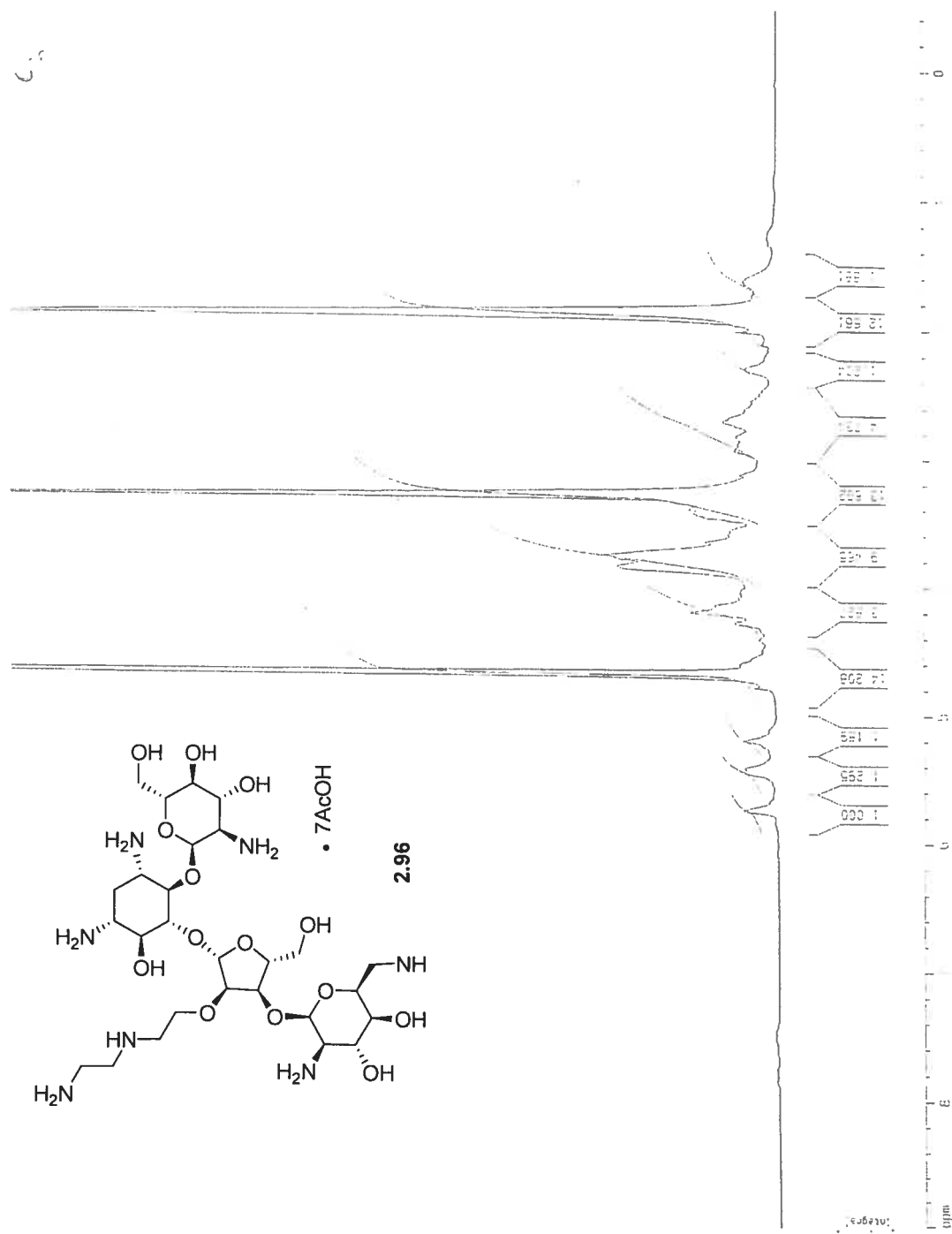


Figure B4. Spectre RMN ^1H pour le composé 2.96.

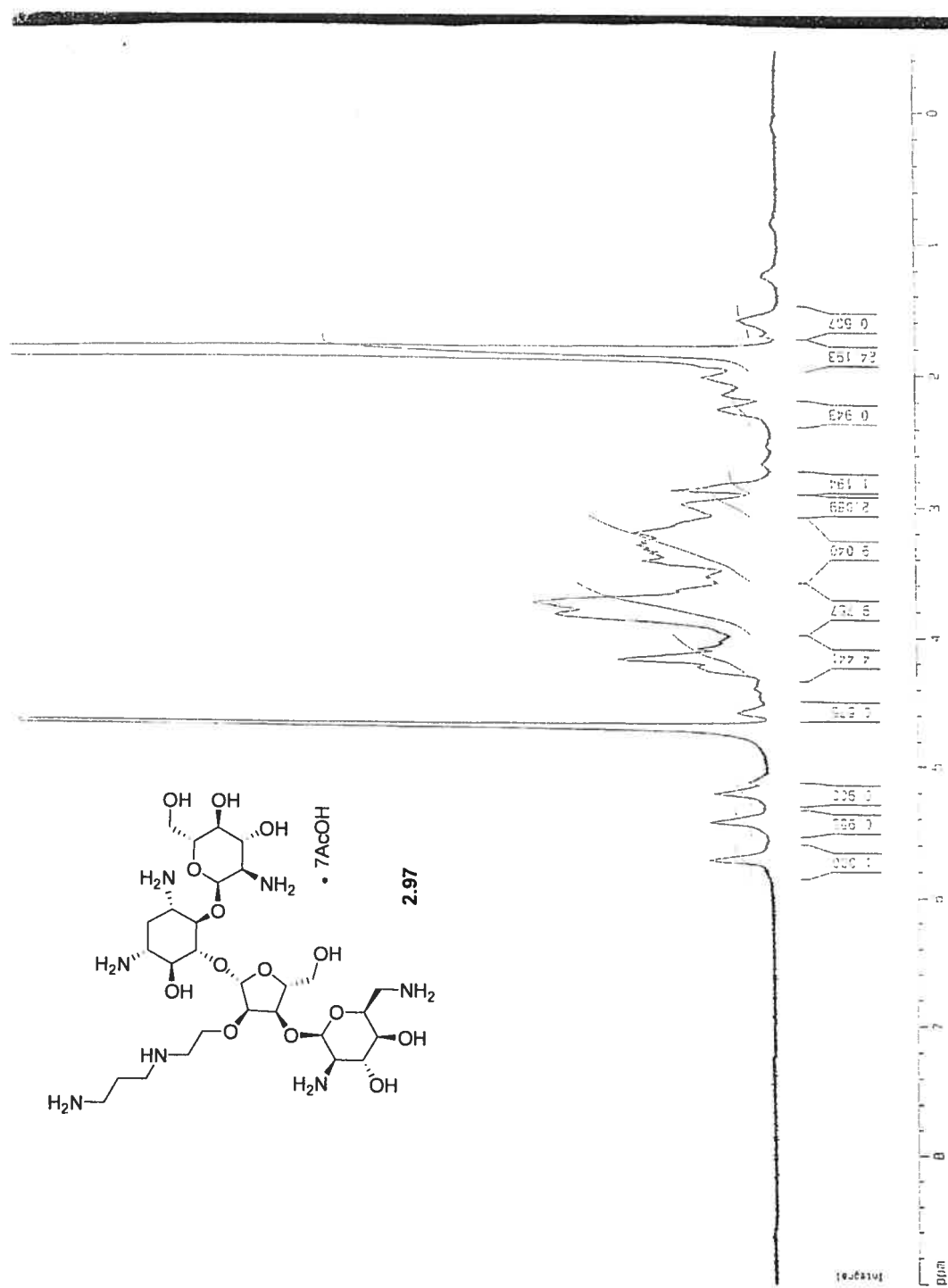


Figure B5. Spectre RMN ^1H pour le composé 2.97.



Depot des livres