

Université de Montréal

Conception et synthèse d'aminoglycosides semi-synthétiques

par
Alexandre Giguère

Département de chimie
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise ès Sciences (M.Sc.) en chimie

Janvier, 2012

© Alexandre Giguère, 2012

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé:

Conception et synthèses d'aminoglycosides semi-synthétiques

présenté par
Alexandre Giguère

est présenté à un jury composé des personnes suivantes:

Président-rapporteur	Hélène Lebel
Directeur de Recherche	Stephen Hanessian
Membre du Jury	Richard Giasson

À Mélisa,

Résumé

Plusieurs aminoglycosides font partie d'une famille d'antibiotiques à large spectre d'action. Les aminoglycosides ayant une activité antibiotique viennent interférer dans la synthèse protéique effectuée par les bactéries. Les protéines mal codées entraîneront la mort cellulaire. Au fil des années, de nombreux cas de résistance ont émergé après une utilisation soutenue des aminoglycosides. De nombreux aminoglycosides semi-synthétiques ont été synthétisés avec comme objectif de restaurer leur activité antimicrobienne. Parmi les modifications ayant connu du succès, notons la didésoxygénation d'un diol et l'introduction de la chaîne latérale HABA. Des études précédentes ont montré l'efficacité de ces modifications sur les aminoglycosides. Les présents travaux portent sur l'installation de la chaîne latérale HABA et la didésoxygénation d'un diol sur la paromomycine et la néomycine.

La didésoxygénation sélective des diols a été effectuée en utilisant la méthodologie développée par Garegg et Samuelsson, une variation de la réaction de Tipson-Cohen. Cette méthode a permis l'obtention du motif didésoxygéné sur les cycles A et D dans des rendements jamais égalés pour ce motif synthétique. La chaîne latérale a été introduite en tirant profit de la réactivité et de la sélectivité d'un carbamate cyclique. Ces méthodes combinées ont permis la synthèse efficace de nombreux analogues semi-synthétiques nouveaux. La 3',4'-didéhydro-*N*-1-HABA-néomycine et la 3',4',3'',4''-tétradésoxy-*N*-1-HABA-néomycine montrent une activité impressionnante contre des souches de bactéries résistantes aux aminoglycosides. Des tests de toxicité effectués en collaboration avec *Achaogen Inc.* ont démontré que ces composés sont relativement toxiques sur les cellules rénales de type H2K, ce qui réduit de façon importante leur index thérapeutique.

Afin d'abaisser la toxicité des composés, la relation entre toxicité et basicité a été explorée. Des substitutions de l'amine en 6'' ont été effectuées afin d'abaisser la basicité de l'amine. Les résultats de toxicité et d'activité antimicrobienne démontrent une corrélation importante entre la basicité des amines et la toxicité/activité des aminoglycosides antibiotiques. L'effet d'une modulation du pKa a aussi été exploré en

installant des chaînes fluorées sur l'amine en 6'' de la paromomycine et de la néomycine. Une séquence synthétique pour isoler l'amine en 6'' de la néomycine a aussi été développée.

Mots-Clés

aminoglycoside, antibiotique, néomycine, paromomycine, désoxygénation, réaction de Garegg-Samuelsson, HABA, carbamate cyclique, N6'', basicité, toxicité

Resume

Some aminoglycosides are part of a broad-spectrum family of antibiotics used in the clinic. They interfere in protein synthesis in bacterium cell by interfering with the transcription of proteins leading to cellular death. After an intense usage of aminoglycosides in the clinic, numerous cases of resistance have been encountered which render aminoglycosides less effective. Semi-synthetic aminoglycosides have been synthesized with the objective of restoring their original antimicrobial activity. Deoxygenation of the diol on ring A and introduction of the lateral chain HABA at *N*-1 had a significant impact on their antimicrobial activity against resistant strains. The present work will focus on deoxygenation of the diol at 3', 4' and on the introduction of the lateral HABA chain on aminoglycoside, more specifically on paromomycin and neomycin.

The selective dideoxygenation of the A ring diol was done using a methodology developed by Garegg and Samuelsson, which is a modification of the original Tipson-Cohen reaction. This method allows the dideoxygenation on ring A and D with unprecedented yields. The lateral HABA chain was introduced *via* the ring opening of a cyclic carbamate. These methods were combined to produce very potent analogs such as 3',4'-didehydro-*N*-1-HABA-neomycin and 3',4',3''',4'''-tetradeoxy-*N*-1-HABA-neomycin. Toxicity tests done in collaboration with *Achaogen Inc.* showed that these analogs were toxic to H2K renal cells, which reduced significantly their therapeutic index.

In order to lower the toxicity of those compounds, the relation between toxicity and basicity was explored. Substitution of the amine at 6''' was done in order to lower the basicity of this amine. The results showed a strong correlation between the basicity of this amine and toxicity/activity. The pKa of this amine was modulated by installing fluorinated alkyl chain on the amine at 6''' in order to see the effect of the pKa on the activity/toxicity on paromomycin and neomycin. A synthetic sequence was also developed to allow the 6''' amine on neomycin to be modified selectively.

Keywords

aminoglycoside, antibiotic, neomycin, paromomycin, deoxygenation, Garegg-Samuelsson reaction, HABA, cyclic carbamate, N6", basicity, toxicity

Table des matières

Page titre	i
Identification du jury	ii
Résumé	iv
Mots-clés	v
Resume.....	vi
Keywords.....	vii
Table des matières	viii
Liste des chapitres et sous-chapitres	ix
Liste des figures	xi
Liste des schémas	xii
Liste des tableaux	xiii
Liste des abréviations.....	xiv
Remerciements.....	xviii
Chapitre 1 : Introduction aux antibiotiques et aux aminoglycosides.....	1
Chapitre 2 : Synthèses d'hybrides de la néomycine et de la paromomycine.....	36
Chapitre 3 : Partie expérimentale	67
Chapitre 4 : Références	118
Chapitre 5 : Annexes	130

Liste des chapitres et sous-chapitres

Chapitre 1 – Introduction aux antibiotiques et aux aminoglycosides	1
1.1 – Tuberculose et streptomycine	2
1.2 – La grande famille des aminoglycosides	3
1.3 – Utilisation clinique des aminoglycosides et apparition du phénomène de la résistance	4
1.4 – Mode d'action	6
1.5 – Les enjeux de la résistance bactérienne.....	11
1.6 – Mécanismes de résistance aux aminoglycosides	13
1.7 – Toxicité	16
1.8 – Aminoglycosides semi-synthétiques.....	17
1.9 – Synthèse de la 3',4'-didésoxy- <i>N</i> -1-HABA-néomycine (1.58)	30
1.10 – Conclusion	35
Chapitre 2 – Synthèses d'hybrides de la néomycine et de la paromomycine.....	36
2.1 – Didésoxygénation <i>via</i> la méthode de Garegg-Samuelsson.....	37
2.2 – Didésoxygénation d'aminoglycosides 4,5-disubstitués	38
2.3 – Toxicité	50
2.4 – Modulation de la toxicité en effectuant des modifications sur le cycle D	54
2.5 – Conclusion.....	66
Chapitre 3 – Partie expérimentale.....	67
3.1 – Procédures générales.....	68
3.2 – Liste des molécules.....	69
3.3 – Partie expérimentale.....	71
Chapitre 4 – Références.....	118
Chapitre 5 – Annexes	130

Liste des Figures

Figure 1.1 Pénicilline G (1.1) et streptomycine (1.2).....	2
Figure 1.2 Aminoglycosides naturels atypiques	6
Figure 1.3 Structure cristalline de la sous-unité ribosomale 30 S obtenue par Ramakrishnan <i>et al.</i>	7
Figure 1.4 Synthèse protéique et étape d'élongation	8
Figure 1.5 Conformation du fragment 16S ARNr avec ou sans paromomycine (en jaune) (A et B) et lors d'une reconnaissance codon-anticodon parfaite (C) et quasiparfaite en présence de paromomycine (D) (PAR)	10
Figure 1.6 Structure cristallographique d'un complexe du site A et de la paromomycine	11
Figure 1.7 Modification enzymatique de la kanamycine A par un enzyme phosphotransférase (APH (3')), adénylotransférase (ANT (4')) et acétyltransférase (AAC (6'))	15
Figure 1.8 Aminoglycosides naturels possédant le groupement HABA et la didesoxygénation et leur relation structure/substrat enzymatique	18
Figure 1.9 Relation structures/substrats enzymatiques d'aminoglycosides semi- synthétiques.....	19
Figure 1.10 Liste non-exhaustive des aminoglycosides semi-synthétiques	20
Figure 2.1 Paromomycine (rouge) liée au Site A du ribosome (le groupement éthyle (vert) est ajouté grâce à Pymol).....	58
Figure 2.2 Modulation du pKa de l'amine en 6'''	58

Liste des Schémas

Schéma 1.1 Synthèse de la 3', 4'-didésoxy-kanamycine B par Umezawa <i>et al.</i> (1.33)	20
Schéma 1.2 Réaction de Tipson-Cohen	21
Schéma 1.3 Synthèse de la 3'-désoxy-kanamycine B par Umezawa <i>et al.</i> (1.37).....	22
Schéma 1.4 Synthèse de la 4'-désoxy-kanamycine B par Kamagushi <i>et al.</i> (1.40).....	23
Schéma 1.5 Synthèse de la 3',4'-didésoxy-néamine par Chang <i>et al.</i> (1.42).....	24
Schéma 1.6 Synthèse d'un analogue de la 3',4'-didésoxy-kanamycine B (1.44)	24
Schéma 1.7 Synthèse d'hybride de type pyranmycine par Chang <i>et al.</i> (1.45)	25
Schéma 1.8 Synthèse de la 3',4'-didésoxy-paromomycine par Battistini <i>et al.</i> (1.48)	26
Schéma 1.9 Synthèse de l'amikacine par Kamagushi <i>et al.</i> (1.25)	27
Schéma 1.10 Synthèse de l'arbakacine par Umezawa <i>et al.</i> (1.26).....	27
Schéma 1.11 Synthèse de l'amikacine via une chélation au zinc par Umezawa <i>et al.</i> (1.25).....	28
Schéma 1.12 Isolation de l'amine en N-1 via les carbamates par Pan <i>et al.</i> (1.25)	29
Schéma 1.13 Isolation de l'amine en N-1 <i>via</i> une réaction de Staudinger sélective par Chang <i>et al.</i>	29
Schéma 1.14 Synthèse de la 3',4'-didésoxy-N-1-HABA-néomycine (1.58)	32
Schéma 2.1 Didésoxygénation de la Méthyl 4,6-O-benzylidène- α -D-glucopyranoside dans les conditions de Garegg-Samuelsson.....	37
Schéma 2.2 Synthèse de la 3', 4', 3''', 4'''-tétradésoxy-paromomycine (2.7)	39
Schéma 2.3 Formation d'un sous-produit (2.9) lors de la réaction de Garegg-Samuelsson.....	39
Schéma 2.4 Synthèse de la 3', 4', 3''', 4'''-tétradésoxy-néomycine (2.13)	40
Schéma 2.5 Hydrolyse du carbamate cyclique formé à partir du carbamate de benzyl en N-6'''.	41
Schéma 2.6 Synthèse de la 3',4'-didéhydro-néomycine (2.18)	42
Schéma 2.7 Synthèse de 3',4',3''',4'''-tétradésoxy-N-1-HABA-paromomycine (2.20)	44
Schéma 2.8 Synthèse de 3',4',3''',4'''-tétradésoxy-N-1-HABA-néomycine (2.23)	45

Schéma 2.9 Synthèse de la 3',4'-didéhydro- <i>N</i> -1-HABA-néomycin (2.26)	45
Schéma 2.10 Synthèse de 6'''- <i>N</i> -carbométhoxy-paromomycine (2.29) et de 6''', 4'''- <i>N,O</i> -carbonyl-paromomycine (2.31).....	55
Schéma 2.11 Synthèse de 6'''- <i>N</i> -trifluoro-tétra- <i>N</i> -Cbz-paromomycine (2.32 a) et 6'''- <i>N</i> -difluoroéthyle-tétra- <i>N</i> -Cbz-paromomycine (2.32b)	59
Schéma 2.12 Synthèse de 6'''- <i>N</i> -(éthyle)-paromomycine (2.33).....	59
Schéma 2.13 Hydrogénation des analogues alkylés en N6''' de la paromomycine (2.34 a-b)	60
Schéma 2.14 Isolation de l'amine en 6''' sur la néomycine (2.35).....	61
Schéma 2.15 Synthèse de 6'''- <i>N</i> -(2,2,2-trifluoroéthyle)-néomycine (2.36a) et de 6'''- <i>N</i> -(2,2-Difluoroéthyle)-néomycine (2.36b)	61
Schéma 2.16 Synthèse de 6'''- <i>N</i> -(éthyle)-néomycine (2.37).....	62

Liste des tableaux

Tableau 1.1 Structure et origine des aminoglycosides naturels substitués de façon 4,5	4
Tableau 1.2 Structure et origine des aminoglycosides naturels substitués de façon 4,6	5
Tableau 1.3 Concentration inhibitrice minimale <i>in vitro</i> de 3',4'-Didésoxy- <i>N</i> -1-HABA-néomycine (1.58) sur diverses bactéries résistantes.....	34
Tableau 2.1 Concentration inhibitrice minimale de 3',4',3'',4''-tétradésoxy-paromomycine (2.7) et de 3',4',3'',4''-tétradésoxy-néomycine (2.13) sur diverses bactéries résistantes.....	47
Tableau 2.2 Concentration inhibitrice minimale 3',4'-didéhydro-néomycine (2.18) sur diverses bactéries résistantes.....	48
Tableau 2.3 Concentration inhibitrice minimale de 3',4',3'',4''-tétradésoxy- <i>N</i> -1-HABA- paromomycine (2.20), 3',4',3'',4''-tétradésoxy- <i>N</i> -1-HABA-néomycine (2.23) et de 3',4'-didéhydro- <i>N</i> -1-HABA-néomycine (2.26) sur diverses bactéries résistantes..	49
Tableau 2.4 LD ₅₀ pour divers aminoglycosides adapté de Fujisawa <i>et al.</i>	51
Tableau 2.5 Corrélation entre en la LD ₅₀ et le pKa de l'amine en 2' adaptée de Baasov <i>et al.</i>	52
Tableau 2.6 Concentration inhibitrice minimale 6''- <i>N</i> -carbométhoxy-paromomycine (2.29) et de 6'',4''- <i>N,O</i> -carbonyl-paromomycine (2.31) sur diverses bactéries résistantes.	57
Tableau 2.7 Concentration inhibitrice minimale de 6''- <i>N</i> -(2,2,2-trifluoroéthyle)-paromomycine (2.33a), 6''- <i>N</i> -(2,2-difluoroéthyle)-paromomycine (2.33b) et 6''- <i>N</i> -(éthyle)-paromomycine (2.34) sur diverses bactéries résistantes.....	64
Tableau 2.8 Concentration inhibitrice minimale de 6''- <i>N</i> -(2,2,2-trifluoroéthyle)-paromomycine (2.36a), 6''- <i>N</i> -(2,2-difluoroéthyle)-paromomycine (2.36b) et 6''- <i>N</i> -(éthyle)-néomycine (2.37) sur diverses bactéries résistantes.....	65

Liste des abréviations

δ :	Déplacement chimique en ppm
α :	Alpha
$^{\circ}\text{C}$:	Degré Celcius
AAC :	Aminoglycoside acétyle transférase
Ac :	Acétyle
AcOH :	Acide acétique
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADP :	Adénosine diphosphate
AG :	Aminoglycoside
Aq. :	Solution aqueuse
ANT :	Aminoglycoside nucléotidyle transférase
APH :	Aminoglycoside phosphotransférase
Arc :	Contrôle redox anoxie
Arma	Méthylation du ribosome par l'enzyme méthyltransférase
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
β :	Bêta
Bn :	Benzyle
Bz :	Benzoyle
Boc :	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyle
Bs :	Singulet large
cat :	Catalytique
Cbe :	Éthyloxycarbonyle
Cbz :	Benzyloxycarbonyle

CCM :	Chromatographie sur couche mince
CDX :	Facteur de transcription caudal relié à l'homéodomaine
CoA :	Co-Enzyme A
CIM :	Concentration inhibitrice minimale
DCC:	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimide
DCM:	Dichlorométhane
DHP:	Dihydropyrane
DIPEA:	<i>N,N</i> -Diisopropyléthylamine
DMAP :	Diméthylaminopyridine
DME:	1,2-diméthoxyéthane
DMF :	<i>N,N</i> -Diméthylformamide
DMSO:	Diméthylsulfoxyde
D:	Doublet
DD:	Doublet de doublet
EDC :	Hydrochlorure de 1-Éthyl-3-(3-diméthyllaminopropyl)carbodiimide
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EF-Tu :	facteur d'élongation de type Tu
Et :	Éthyle
GDP :	Guanosine diphosphate
GTP :	Guanosine triphosphate
GTPase :	Enzyme hydrolysant la GTP en GDP
h :	Heure
H2K :	Cellule rénale tubulaire proximale humaine
HABA :	Acide (<i>S</i>)-2-hydroxy-4-aminobutyrique
HPLC :	chromatographie liquide haute performance
HRMS :	Spectrométrie de masse à haute résolution
Hz :	Hertz
IC ₅₀ :	Concentration inhibitrice à 50%
KHMDS :	<i>N,N</i> -Bis(triméthylsilyl)amidure de potassium
LC-MSD :	Spectromètres de masse à piège ionique
LLC-PK1:	Lignée de cellules rénales tubulaires proximales de porc

LD ₅₀ :	Dose létale 50
M :	Molaire
M :	Multiplet (RMN)
Me :	Méthyle
Met-ARNt ^{Met}	Méthionyl ARNt méthylée
min :	Minute
mmol :	Millimole
mol :	Mole
Ms :	Méthanesulfonyle
LRMS :	Spectrométrie de masse (basse résolution)
NIS :	<i>N</i> -Iodosuccinimide
Ph :	Phényle
Pyr :	Pyridine
PTSA :	Acide paratoluènesulfonique
Ra-Ni :	Nickel de Raney
RMN :	Résonance magnétique nucléaire (ou rmn)
SAR :	Relation structure-activité
SARM :	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthycilline
SARV:	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la vancomycine
SDS:	Système d'alimentation en solvant
Su :	Succinimide
T :	Triplet
TT :	Triplet de triplet
TBAF :	Fluorure de tétrabutylammonium
TBS :	tert-Butyldiméthylsilyle
TB MDR:	<i>Tuberculosis</i> résistante à plusieurs drogues
Tf :	Trifluorométhanesulfonyle
TFA :	Acide trifluoroacétique
THF :	Tétrahydrofurane
TMS :	Triméthylsilyle
TOF :	Temps de vol

Tr : Trityle
Ts : Toluènesulfonyle

Remerciements

D'abord, j'aimerais remercier sincèrement le professeur Stephen Hanessian pour m'avoir accueilli dans son laboratoire pour effectuer mes études graduées. J'aimerais aussi le remercier pour son encadrement et sa patience pendant toutes ces années passées dans son laboratoire.

J'aimerais aussi remercier mes collègues contemporains et passés pour leur support, leur amitié et pour les échanges enrichissant. Merci milles fois, je n'y serais pas arrivé sans vous. J'aimerais plus particulièrement remercier l'équipe des aminoglycosides pour leur créativité, curiosité et amitié. Merci à Pablo, Justyna, Oscar, Ellen, Muthu et Jérémie. J'aimerais plus particulièrement remercier Janek Szychowski qui m'a introduit aux aminoglycosides lors d'un stage effectué durant mon baccalauréat et qui a su insuffler en moi la passion pour les aminoglycosides.

J'aimerais remercier le personnel du laboratoire de résonance magnétique, Phan viet Minh Tan, Sylvie Bilodeau et Cédric Malveau, pour l'acquisition des spectres RMN 700 MHz. J'aimerais aussi remercier le personnel du laboratoire régional de spectrométrie de masse, Alexandra Furtos, Marie-Christine Tang et Karine Venne pour l'acquisition des spectres de masse haute résolution.

J'aimerais remercier le personnel de soutien du laboratoire Hanessian, Michèle Ursula Ammouche, Éleine Fournelle, Carol St-Vincent Major et Dalbir Sekhon Sing, pour leur aide qui m'a été très précieuse durant toute la durée de mes études graduées.

J'aimerais aussi remercier Thomas Jennequin, Mélisa Guajardo Allaire et Stéphane Dorich pour la révision de mon mémoire.

Finalement, j'aimerais remercier ma famille pour leur support indéfectible pendant mes études, plus particulièrement Mélisa à qui je dédie le présent travail.

Merci à tous.

Chapitre 1

Introduction aux antibiotiques et aux aminoglycosides antibiotiques

1.1 Tuberculose et streptomycine

La tuberculose, aussi connue sous le nom de peste blanche, a tué à elle seule, près d'un milliard d'êtres humains entre les années 1850 et 1950.¹ Hippocrate, le père de la médecine moderne, en décrit les symptômes dès l'antiquité. La *Mycobacterium tuberculosis* (bactérie à Gram négatif) infecte principalement les voies respiratoires et se répand ensuite dans le reste de l'organisme, la mort s'en suivant habituellement par septicémie et défaillance de plusieurs organes essentiels. On estime que pendant la dernière grande pandémie, la tuberculose a eu raison de près d'une personne sur cinq.¹ Avant l'apparition des antibiotiques, aucun traitement ne permettait de traiter cet horrible fléau. On ne pouvait que supporter le patient pendant que son corps combattait à lui seul l'infection.

La découverte, en 1928, par Sir Alexander Fleming des effets de la pénicilline G sur les colonies de bactéries a permis à la médecine moderne de faire un bond de géant. Il a remarqué qu'une moisissure du nom de *Penicillium notatum* empêchait la croissance de cultures bactériennes.² On a alors démontré qu'un composé organique pouvait inhiber, voir anéantir, la croissance de la colonie de bactéries à Gram positif. Avec Flory et Chain qui ont raffiné la production et l'isolation de la pénicilline, il a alors été possible de commencer à utiliser de façon massive cet antibiotique.³ Ces travaux ont mérité à Flory, Chain et Fleming le prix Nobel de médecine de 1945.⁴

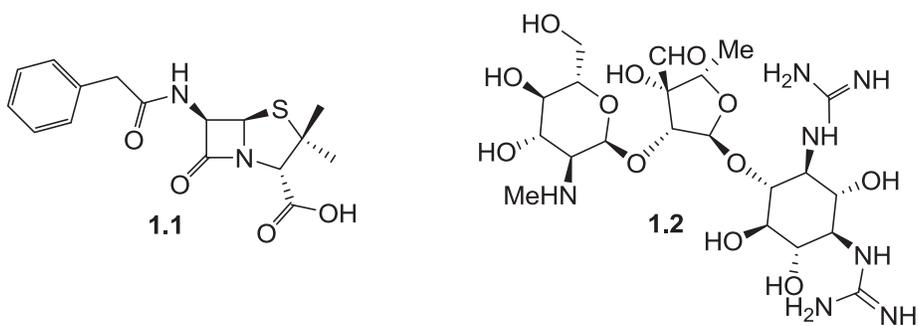


Figure 1.1 pénicilline G (1.1) et streptomycine (1.2)

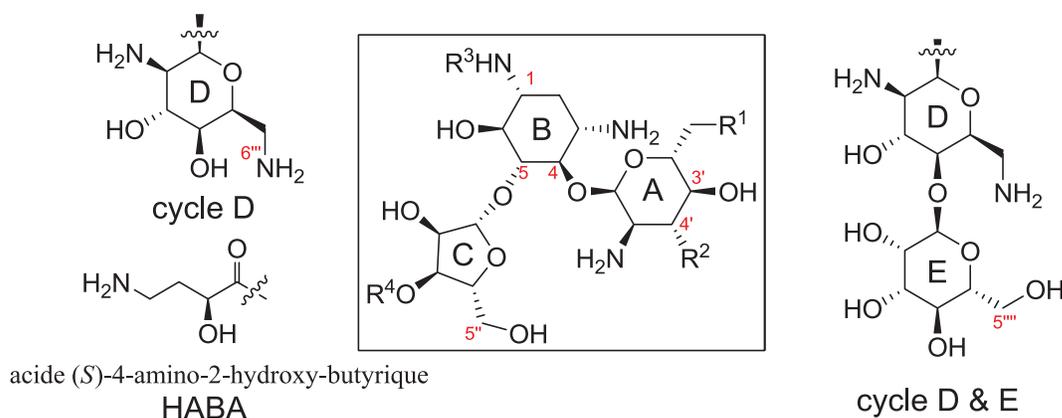
La pénicilline G (1.1) est inhibitrice de l'enzyme en charge d'effectuer les liaisons entre les unités peptidiques et glycosidiques formant le peptidoglycane, composant essentiel de la paroi cellulaire bactérienne.⁵ Cette inhibition entraîne un affaiblissement de la paroi,

qui finit par induire la lyse cellulaire. Il est important de noter que cet antibiotique est actif seulement contre les bactéries à Gram positif.³ La tuberculose et plusieurs autres infections causées par des bactéries à Gram négatif sont alors restées sans remède. De nombreux laboratoires, influencés par les travaux de Fleming, se sont donc lancés à la recherche de nouveaux composés organiques aux effets antibiotiques. Selman Waskman, alors professeur en microbiologie des sols à l'université Rutgers, a réussi à identifier plusieurs antibiotiques, parmi lesquels on retrouve l'actinomycine (agent antimétabolique) et la streptothricine F (inhibiteur de la synthèse protéique).³ Ces composés se sont avérés toxiques pour les cellules eucaryotes. Ce n'est qu'en 1943, avec la découverte du premier aminoglycoside antibiotique, soit la streptomycine (**1.2**), qu'il a été possible de décimer les colonies de la redoutable et virulente *Mycobacterium tuberculosis homonius*.⁶ Non seulement la streptomycine était active contre le bacille de la tuberculose, mais elle avait aussi une activité remarquable contre plusieurs bactéries à Gram positif et contre des bactéries résistantes à la pénicilline. La découverte du premier remède contre la tuberculose a valu à Waskman le prix Nobel de médecine de 1952.⁷

1.2 La grande famille des aminoglycosides antibiotiques

Waskman a continué d'effectuer des recherches dans les sols et est parvenu à isoler la néomycine **1.3** en 1949 (voir Tableau 1).⁸ De nombreux autres chercheurs ont suivi les pas de Waskman et ont découvert plus d'une dizaine d'autres aminoglycosides produits par des *Streptomyces* et autres micro-organismes (voir Tableau 1). Les aminoglycosides ont en commun plusieurs caractéristiques structurales, dont la présence d'une unité 2-déoxystreptamine en leur cœur. Ils ont été séparés en trois classes, la première étant composée de ceux qui sont liés à l'unité 2-déoxystreptamine de façon 4,5 par des unités saccharides (Tableau 1). La deuxième classe est celle composée de ceux qui sont liés de façon 4,6 à ladite unité 2-déoxystreptamine (Tableau 2) et finalement les aminoglycosides considérés comme atypiques (voir Figure 2) constituent la troisième classe.

Une nomenclature particulière a été développée pour pouvoir décrire efficacement les aminoglycosides. D'abord, les positions du cycle A portent la mention prime,



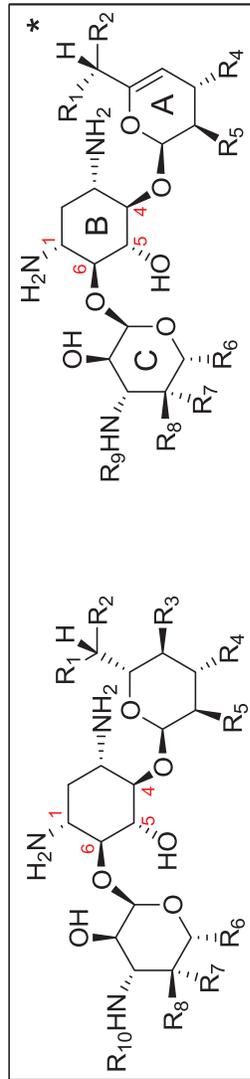
	Année d'isolation	Souche	Entrée	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
néomycine B ⁸	1949	<i>Streptomyces fradiae</i>	1.3	NH ₂	OH	H	Cycle D
paromomycine ⁹	1956	<i>Streptomyces rimosus</i> var. <i>paromomycinus</i>	1.4	OH	OH	H	Cycle D
butirosine ¹⁰	1971	<i>Bacillus circulans</i>	1.5	NH ₂	OH	HABA	H
ribostamycine ¹¹	1970	<i>Streptomyces ribosidificus</i>	1.6	NH ₂	OH	H	H
lividomycine A ¹²	1972	<i>Streptomyces lividus</i>	1.7	OH	H	H	Cycle D&E
lividomycine B ¹²	1971	<i>Streptomyces lividus</i>	1.8	OH	H	H	Cycle D

Tableau 1. Structure et origine des aminoglycosides naturels substitués de façon 4,5

tandis que celle de l'unité 2-déoxystreptamine ne portent aucune mention. Les positions du cycle C attachées à l'unité 2-déoxystreptamine portent la mention double prime et ainsi de suite. Le carbone anomérique de chacune des unités saccharides est le carbone numéro un lors de la numérotation des carbones du cycle.

1.3. Utilisation clinique des aminoglycosides antibiotiques et apparition du phénomène de la résistance

Les aminoglycosides sont utilisés dans un contexte clinique depuis le début des années 1950; ils sont à la fois bactériostatiques et bactéricides. Ils agissent comme antibiotiques à large spectre d'action qui sont actifs autant contre les bactéries à Gram négatif que celles à Gram positif, bien qu'ils soient nettement plus efficaces sur les Gram négatifs.¹³



	Année d'isolation	Souche	Entrée	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸	R ⁹
kanamycine A ¹⁵	1957	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	1.9	H	NH ₂	OH	OH	OH	CH ₂ OH	H	OH	H
kanamycine B	1957	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	1.10	H	NH ₂	OH	OH	NH ₂	CH ₂ OH	H	OH	H
kanamycine C	1957	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>	1.11	H	OH	OH	OH	NH ₂	CH ₂ OH	H	OH	H
tobramycine ¹⁶	1970	<i>Streptomyces Tenebrarius</i>	1.12	H	NH ₂	OH	H	NH ₂	CH ₂ OH	H	OH	H
gentamicine C1 ^{17,18}	1963	<i>Micromonospora purpurea</i>	1.13	Me	NHMe	H	H	NH ₂	H	OH	Me	Me
gentamicine C1a	1963	<i>Micromonospora purpurea</i>	1.14	H	NH ₂	H	H	NH ₂	H	OH	Me	Me
gentamicine C2	1963	<i>Micromonospora purpurea</i>	1.15	Me	NH ₂	H	H	NH ₂	H	OH	Me	Me
gentamicine C2a	1963	<i>Micromonospora purpurea</i>	1.6	NH ₂	Me	H	H	NH ₂	H	OH	Me	Me
gentamicine C2b	1963	<i>Micromonospora purpurea</i>	1.17	H	NHMe	H	H	NH ₂	H	OH	Me	Me
sisomicine* ¹⁹	1971	<i>Micromonospora inyoensis</i>	1.18	H	NH ₂	X		H	H	OH	Me	Me
verdamicine* ²⁰	1973	<i>Streptomyces ribosidifiscus</i>	1.19	Me	NH ₂			H	H	NH ₂	H	OH
verdamicine C2a* ²⁰	1973	<i>Streptomyces ribosidifiscus</i>	1.20	NH ₂	Me	H	H	NH ₂	H	OH	Me	Me

Tableau 2. Structure et origine des aminoglycosides naturels substitués de façon 4,6

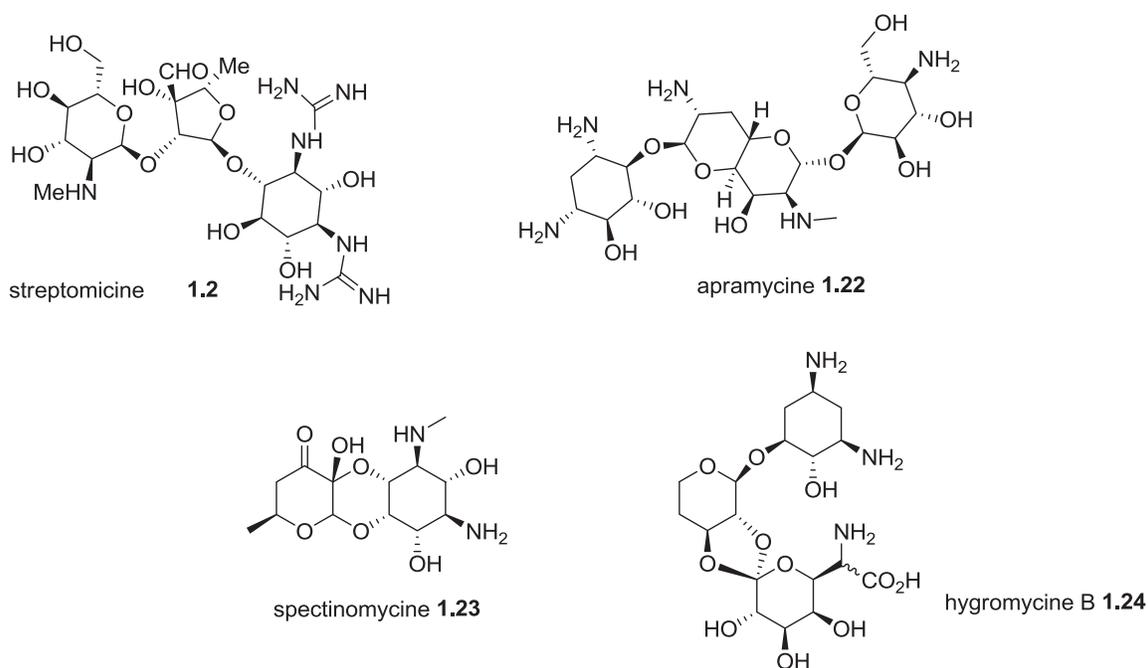


Figure 1.2 Aminoglycosides naturels atypiques²¹

Ils doivent être administrés par voie intraveineuse ou parentérale sous supervision médicale, car à de fortes doses, ils sont ototoxiques et néphrotoxiques.¹⁴ De nos jours, il y a peu d'aminoglycosides naturels qui sont réellement utilisés dans le milieu hospitalier. Le complexe des gentamicines et de la tobramycine sont les seuls aminoglycosides antibiotiques naturels aujourd'hui utilisés en clinique et ce avec plusieurs autres analogues semi-synthétiques.¹⁴ Ils sont souvent utilisés en combinaison avec des antibiotiques de type β -lactame afin d'avoir une efficacité optimale.²²

1.4 Mode d'action

L'effet bactéricide des aminoglycosides antibiotiques est dû à plusieurs mécanismes distincts dont certains œuvrent en synergie. En effet, les aminoglycosides se lient fortement et spécifiquement au ribosome, organelle chargée de la synthèse protéique.²⁴³ De nombreuses études biochimiques et cristallographiques ont contribué à la compréhension des mécanismes sous-jacents à leur action sur le ribosome bactérien et la synthèse protéique.²⁴ La synthèse protéique des bactéries est effectuée par un ribosome de type 70 S, tandis que la synthèse protéique chez les cellules eucaryotes est accomplie par un ribosome de type 80 S.²⁵ Le *Svedberg* (S) est une unité du taux de sédimentation

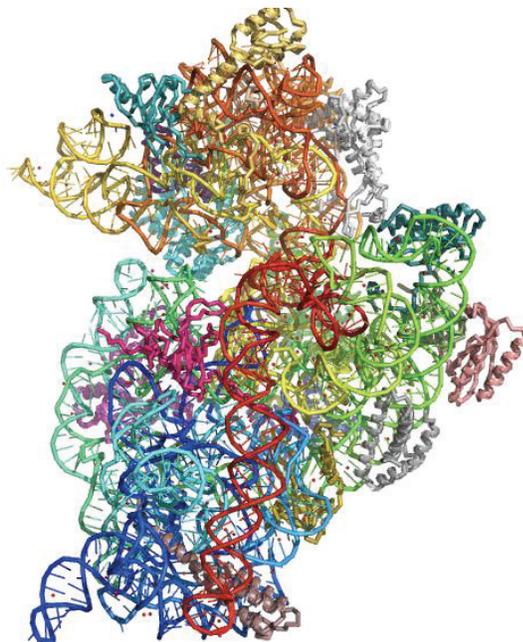


Figure 1.3 Structure cristalline de la sous-unité ribosomale 30 S obtenue par Ramakrishnan *et al.*²⁷

qui est directement proportionnelle à la masse molaire des acides nucléiques présents dans la sous-unité ribosomale. Ces différences dans les structures ribosomales eucaryote et procaryote expliquent la sélectivité des aminoglycosides antibiotiques qui se lient spécifiquement à l'unité 30 S (Figure 1.3) du ribosome procaryote.²⁶ Les aminoglycosides antibiotiques induisent de nombreuses erreurs de transcriptions qui auront un impact sur la structure tertiaire des protéines transcrites. L'introduction de ces protéines mal codées à la membrane peut aussi expliquer l'augmentation notoire de la perméabilité de la membrane peu après le début d'un traitement aux aminoglycosides.²⁶

Une introduction sommaire à la synthèse protéique par le ribosome bactérien^{5,28} est nécessaire afin de comprendre la nature de l'effet des aminoglycosides antibiotiques sur ce dernier. La synthèse protéique s'effectue à partir de l'ARNm produit lors de l'étape de transcription à partir de l'ADN ou de l'ARN. Par la suite, le ribosome traduit l'ARNm en une protéine. La traduction se fait en trois étapes distinctes soit l'initiation, l'élongation et la terminaison.^{5,28,29} La synthèse protéique (Figure 1.4) commence d'abord avec la liaison de la sous-unité ribosomale 30 S du ribosome avec un brin d'ARNm. Ensuite, l'ARN de transfert Met-ARNt^{Met} se lie à l'ARNm et la sous-unité ribosomale 50 S se lie finalement

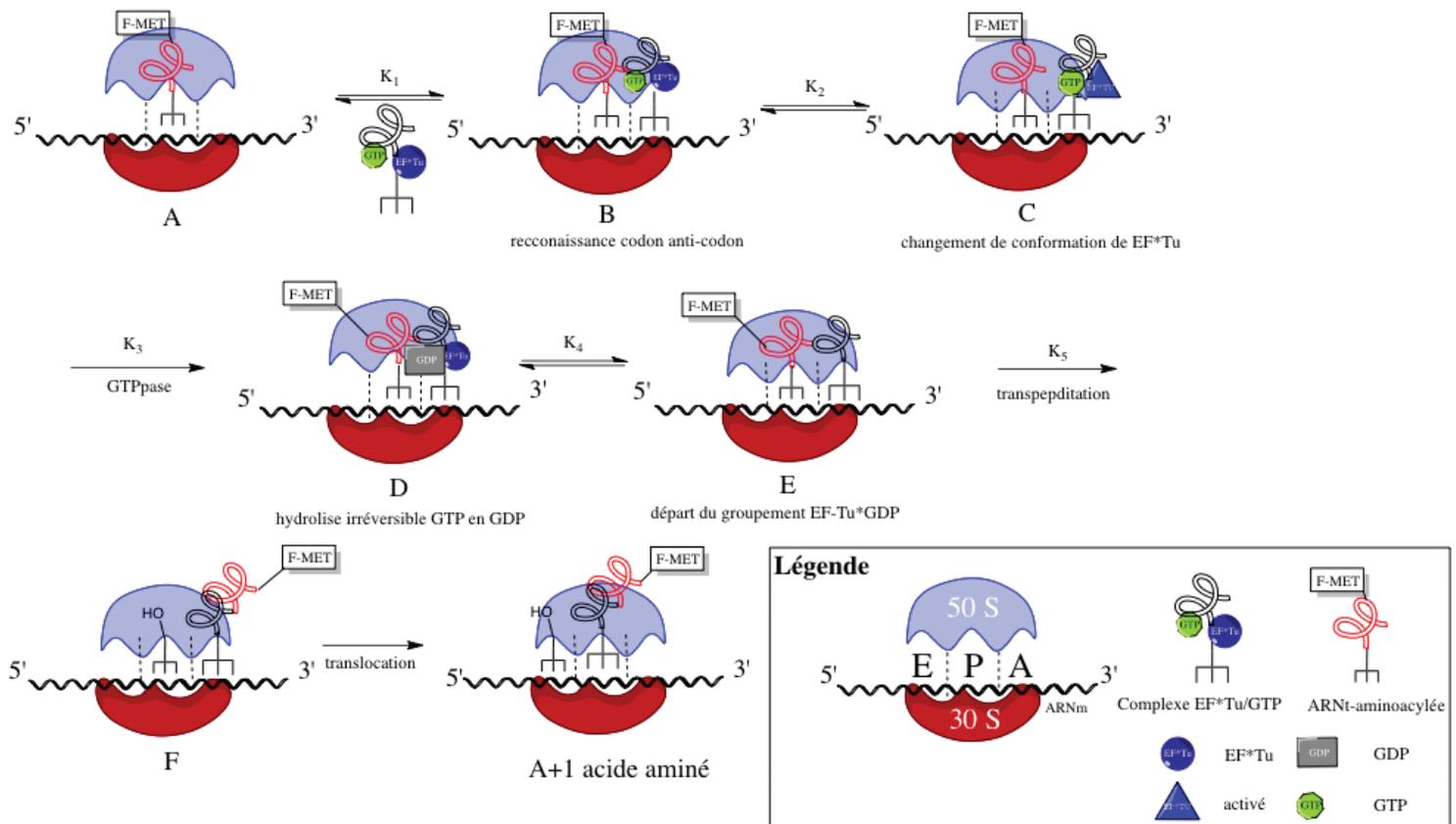


Figure 1.4 Synthèse protéique et étape d'élongation^{5,28,29}

au complexe d'ARNm/sous-unité 30 S/ARNt. Le groupement F-Met-ARNt^{Met} (Figure 1.4, étape A) occupe alors le site P du ribosome, le site A étant vacant pour accepter un aminoacyl-ARNt afin de commencer l'élongation. Celle-ci se fait alors en trois étapes distinctes soit le décodage, la transpeptidation et la translocation (voir Figure 1.4).^{5,28,29} Le ribosome va répéter ce processus d'élongation pour chacun des acides aminés inclus dans la protéine. La première étape du décodage est la liaison d'un complexe d'ARNt approprié dans le site A du ribosome. L'ARNt est donc sous forme trimérique avec un GTP et un complexe d'élongation (EF-Tu). Lorsque la reconnaissance codon-anticodon est parfaite, un groupe ARNt vient s'installer dans le site A (A à B), ce qui entraîne l'activation du facteur EF-Tu (B à C). Une enzyme (GTPase) vient hydrolyser la GTP en GDP (C à D) (si un ARNt polaire occupe le site E, il va quitter au même moment où l'ARNt approprié s'installe dans le site A). Le complexe EF-Tu-GDP se sépare alors de l'ARNt (D à E) et l'étape de transpeptidation commence avec l'attaque nucléophile de

l'amine terminale de l'aminoacyl ARNt sur l'ester du groupement peptidyle de l'ARNt (E à F). Ceci transfère le peptide naissant au site P du ribosome. La translocation va ensuite déplacer l'ARNt du site A au site P (F à A+1 acide aminé) pour que le processus d'élongation puisse recommencer. L'ARNt non polaire est transféré au site E du ribosome, avant d'être éjecté lors de la prochaine élongation. Lorsque l'élongation est terminée et que l'ARNm code pour la terminaison, le ribosome relâche le peptide.^{5,28,29} On estime que le ribosome de *E. coli* effectue le processus global de traduction à la vitesse de 40 acides aminés par seconde.³⁰ Ce processus, en plus d'être extrêmement rapide, se fait avec une grande fidélité. Il est estimé que l'erreur de traduction est de 10^{-3} à 10^{-4} par codon.³¹ La fidélité de la traduction est assurée par un mécanisme de double vérification.^{5,29a,31} D'abord, lorsque le complexe trimérique de l'ARNt*EF-Tu-GTP s'installe dans le site A, il faut que la reconnaissance soit parfaite ou presque parfaite pour que le complexe EF*Tu s'active. Une fois le complexe EF*Tu activé, l'étape irréversible d'hydrolyse de la GTP se produit.^{5,29a,31} Ensuite, le complexe EF-Tu*GDP*ARNt est à nouveau l'objet d'une reconnaissance codon-anticodon. Si l'appariement est parfait, l'étape de transpeptidation peut avoir lieu, sinon l'ARNt est simplement rejeté.^{5,29a,31}

Les aminoglycosides antibiotiques viennent influencer le processus de double vérification essentiel à la fidélité de la transcription en se liant sélectivement au fragment 16S de la sous-unité ribosomale 30S.³² Il a été démontré par Pape *et al.*, à l'aide d'expériences cinétiques, qu'avec un de ces aminoglycosides antibiotiques, la paromomycine, le ribosome accepte des ARNt qui n'ont pas un agencement parfait codon-anticodon.³³ Ceci a pour effet d'augmenter significativement le nombre d'erreurs lors de la synthèse protéique. La paromomycine vient interférer dans les deux processus de vérification, soit l'activation du complexe EF-Tu et son hydrolyse par la GTPase et le transfert peptidique. La paromomycine vient donc augmenter les constantes de vitesse de ces étapes lors d'un mauvais agencement codon-anticodon au même niveau que lorsqu'il y a un agencement parfait.³⁴ Ces observations cinétiques ont pu être rationalisées et observées lorsqu'en 2000, Ramakrishnan *et al.* ont publié les structures rayon X de la sous-unité 30 S (Figure 1.3 et 1.5) du ribosome avec et sans paromomycine (Figure 1.5 (A) et (B)) dans son site A.³⁵ La paromomycine se lie dans la sous-unité ribosomale 30 S, plus spécifiquement à la

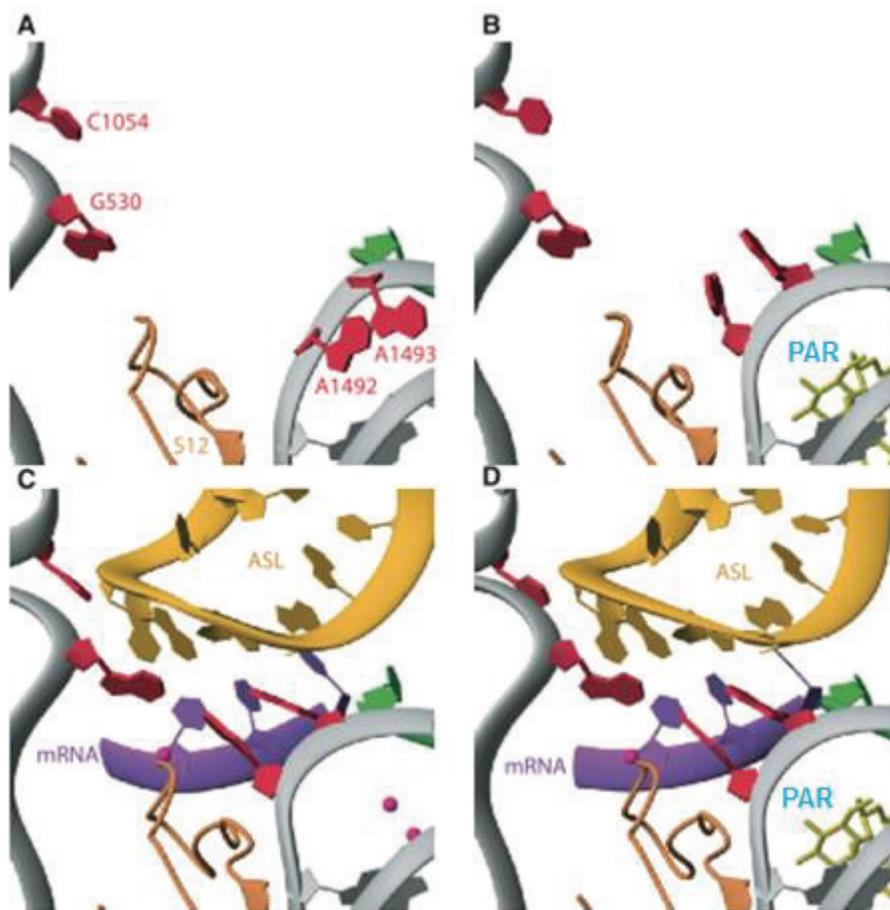


Figure 1.5 Conformation du fragment 16S ARNr avec ou sans paromomycine (jaune - PAR) (A et B) et lors d'une reconnaissance codon-anticodon parfaite (C) et imparfaite en présence de paromomycine (D) (PAR).³⁴

macromolécule d'ARN ribosomale 16S. Cette section du ribosome est responsable de la catalyse de la formation de liens peptidiques et de la sélection des bons ARNt dans le processus de synthèse protéique.³⁶ La Figure 1.5 est éloquent sur les similarités conformationnelles entre une reconnaissance parfaite codon-anticodon (Figure 1.5 (C)) de l'ARNt et de l'ARNm et une reconnaissance imparfaite codon-anticodon entre l'ARNt et l'ARNm avec la paromomycine en jaune (Figure 1.5 (D)).³⁴

Essentiellement, la paromomycine vient pousser les unités adényles 1492 et 1493 hors du sillon majeur, ce qui vient mimer le changement conformationnel (avec pour effet d'ouvrir le ribosome) résultant d'un appariement parfait (Figure 1.5 (C)).^{34,35} Ces images sont venues éclairer les pré-requis structuraux nécessaires à la liaison de

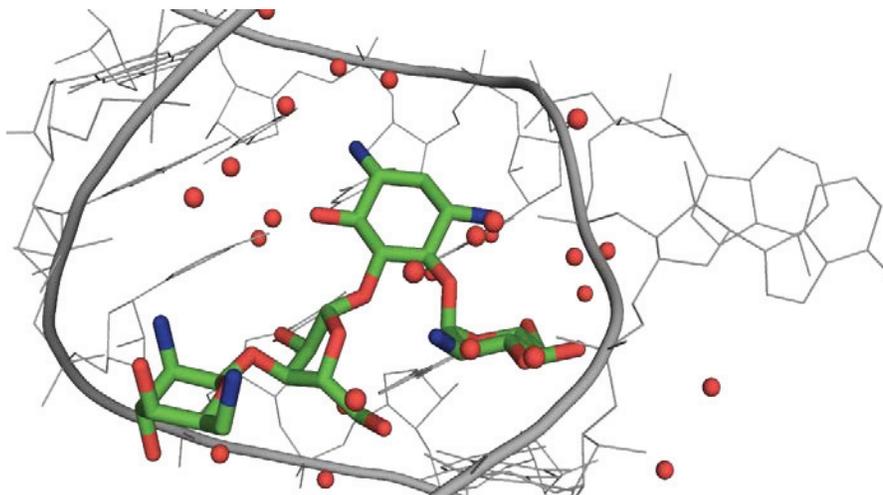


Figure 1.6 Structure cristallographique d'un complexe du site A et de la paromomycine

l'aminoglycoside au site A du ribosome bactérien. La paromomycine effectue douze contacts indirects par l'intermédiaire de l'eau avec les bases azotées du ribosome (voir Figure 1.6).³⁶ Plus de 75% des contacts sont effectués par les cycles A et B communs à la vaste majorité des membres de cette famille d'antibiotiques. Le développement d'un modèle du site de liaison des aminoglycosides par Westhof, a permis de cocristalliser le site A avec de nombreux aminoglycosides.³⁷

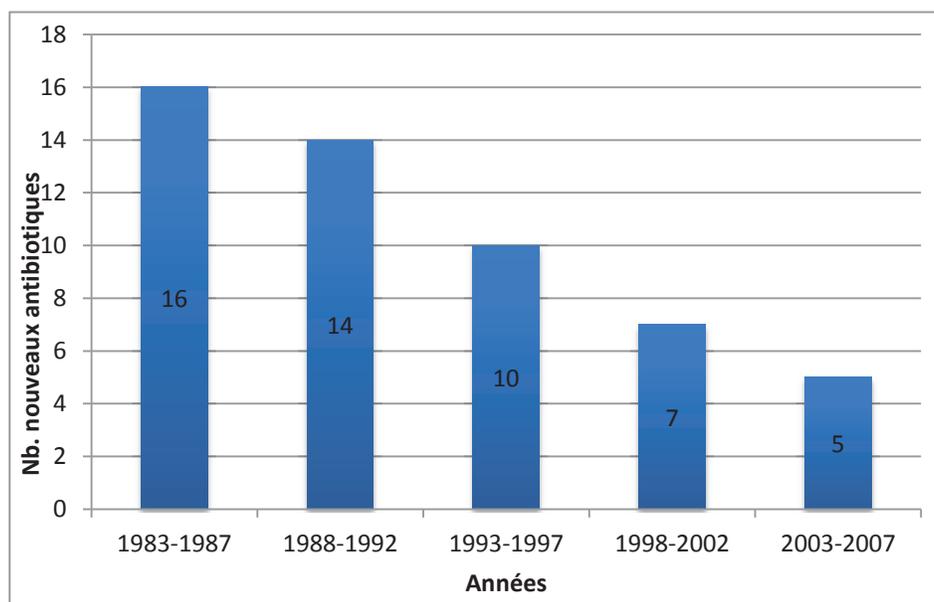
Des preuves récentes mettent en évidence un processus radicalaire contribuant à la mort cellulaire. Bien que les aminoglycosides se lient sélectivement aux ribosomes bactériens, ce sont les protéines mal codées qui engendreront la mort cellulaire. Deux systèmes cellulaires sont responsables de l'intégrité de la membrane cellulaire, le système enveloppe (CDX) et un processus redox (Arc). Ces systèmes seront suractivés lorsque de nombreuses protéines mal codées sont intégrées à la paroi cellulaire.³⁸ L'activation de ces systèmes génère d'importantes concentrations de radicaux hydroxyle dans le cytosol, ce qui entraîne des dommages cellulaires irréversibles.

1.5 Les enjeux de la résistance bactérienne

À la fin des années 1970, le milieu médical croyait avoir trouvé le *magic bullet* contre toutes les infections bactériennes. Le chirurgien en chef de l'armée américaine, le général William Stewart, a affirmé triomphalement au congrès « it was time to close the book on infectious diseases ».³⁹ Cependant, l'utilisation répandue et inadéquate des antibiotiques

a accéléré l'apparition des mécanismes de résistance. La résistance bactérienne est cependant un phénomène inévitable d'adaptation et de sélection naturelle qui ne dépend pas de l'homme. L'analyse génétique de l'évolution d'une bactérie a montré qu'elle a développé l'enzyme de résistance à la pénicilline, β -lactamase, en même temps que la pénicilline et ce il y a deux millions d'années, c'est-à-dire bien avant que l'homme moderne ne commence à l'utiliser comme antibiotique.⁴⁰

La résistance bactérienne entraîne de lourds coûts pour le système de santé en augmentant la durée et le nombre de séjours à l'hôpital, ainsi qu'en rendant nécessaire des traitements de deuxième ligne plus dispendieux.⁴¹ Aux États-Unis, plus de gens meurent d'une infection bactérienne au *Staphylococcus aureus* résistant à la méthycilline (SARM) que du VIH.⁴² Les centres hospitaliers ont fait état de nombreuses bactéries devenues résistantes à plusieurs des meilleurs antibiotiques dans leurs unités de soins intensifs (SARM, SARV, TB MDR).⁴³ Actuellement, les bactéries résistantes rencontrées en clinique sont la *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.* et *Acinetobacter spp.*⁴² Le problème est beaucoup plus grave en milieu hospitalier qu'en milieu communautaire. Le danger réside ici dans la



Graphique 1.1 Nombre de nouveaux antibiotiques introduits sur le marché américain en fonction du temps (adapté de Spellberg *et al.*)⁴⁴

propagation de ces pathogènes dans la communauté. Paradoxalement, le succès et l'intérêt envers la recherche pour de nouvelles familles d'antibiotiques ou de nouveaux antibiotiques ont énormément décliné au cours des deux dernières décennies (voir Graphique 1.1) et ce malgré l'augmentation des infections causées par des bactéries résistantes. On note une diminution drastique du nombre de nouveaux antibiotiques depuis plusieurs années.⁴³

1.6 Mécanismes de résistance aux aminoglycosides

Les bactéries ont développé trois stratégies efficaces leur permettant de résister aux traitements antibiotiques. La première méthode est la modification de la cible biologique, la deuxième est la présence de pompes à efflux qui diminuent la concentration intracellulaire des aminoglycosides antibiotiques et finalement, la modification enzymatique de l'antibiotique.²²

1.6.1 Modification de la cible biologique

Les aminoglycosides antibiotiques interagissent avec le ribosome bactérien lors de la synthèse protéique. La grande majorité d'entre eux se lient spécifiquement à l'unité 16S de l'ARNr. (Voir la discussion sur le mode d'action pour une explication plus détaillée). Certaines bactéries, particulièrement *Mycobacterium tuberculosis*, ont commencé à présenter des mutations dans la séquence de leur ribosome.^{21e} Une mutation du gène *rrs* résulte en une mutation et un changement de conformation du ribosome qui empêche la liaison efficace de la streptomycine à sa cible.^{21e} Cliniquement, ce mode de résistance n'est pertinent que pour la *Mycobacterium tuberculosis*.^{21e} Une autre modification retrouvée plus largement est la méthylation du résidu G-1405 et A-1408 (ArmA modification), ce qui confère une large résistance aux aminoglycosides antibiotiques de types 4,6, tandis que la paromomycine **1.3** et la néomycine **1.4** sont toujours actifs.⁴⁵ La méthylation empêche la formation de ponts hydrogènes entre le cycle C et génère de l'encombrement stérique supplémentaire, ce qui empêche une bonne liaison au site A du ribosome.⁴⁵

1.6.2 Pénétration cellulaire et pompes à efflux

Pour qu'un aminoglycoside antibiotique soit actif, il doit être en mesure de pénétrer efficacement la paroi cellulaire de la bactérie pour aller se lier au ribosome. Pour qu'il traverse la paroi, celle-ci doit avoir un potentiel électrique.⁴⁶ On sait que l'aminoglycoside se lie d'abord à la paroi par contact électrostatique, pour ensuite diffuser *via* un pore cellulaire. Le transport dans le cytosol s'effectue alors selon deux processus dépendants en oxygène qui impliquent un transport d'électrons.⁴⁶ Le potentiel de la paroi cellulaire est généré en grande partie par la respiration cellulaire. Une cellule ayant un faible potentiel transmembranaire ou aucun potentiel est imperméable aux aminoglycosides.⁴⁶ Ceci explique la résistance intrinsèque des bactéries anaérobies aux aminoglycosides.

Les bactéries à Gram négatif possèdent des pompes à efflux qui se chargent de diminuer la concentration intracellulaire. Le groupe de pompes le plus largement répandu est RND et on ne compte que deux pompes différentes dans cette famille. Les pompes de type MexAB-OprM et AcrAB-TolCO (celles-ci ne varient que par la combinaison des gènes qui les expriment) sont très répandues chez les *Pseudomonas aeruginosa*, très souvent associés aux infections nosocomiales.⁴⁷ La présence de pompes leur confère une résistance à plusieurs aminoglycosides. Les aminoglycosides plats et hydrophobes sont de meilleurs substrats pour ces pompes que les aminoglycosides plus polaires.⁴⁷

1.6.3 Modification enzymatique

Les modifications enzymatiques sont principalement responsables du problème de résistance chez les aminoglycosides. Il existe trois familles d'enzymes distinctes agissant sur les aminoglycosides antibiotiques, soit les aminoglycosides phosphotransférases (APH), les aminoglycosides acétylases (AAC) et finalement les aminoglycosides adényltransférases (ANT) (voir Figure 1.7).^{21e,49} Ces enzymes sont codées sur des éléments mobiles des cellules, soit les plasmides et les transposons, ce qui permet leur échange entre les bactéries.⁴⁷ La famille des phosphotransférases (kinases) est une large famille d'isozymes qui est responsable de la *O*-phosphorylation. Il y a sept classes d'isozymes qui catalysent la phosphorylation d'aminoglycosides de toutes catégories, soit l'APH(3'), APH(2''), APH (3''), APH (4), APH (7''), APH (6) et l'APH (9).⁴⁹ Ces

enzymes sont très prévalentes dans des souches de bactéries résistantes retrouvées en milieu hospitalier. Ces protéines dimériques catalysent le transfert catalytique et régiospécifique du groupe γ -phosphate de l'ATP à l'aminoglycoside. L'enzyme la plus étudiée et la mieux comprise de cette famille est l'APH(3') IIIa. Une structure rayon X du complexe aminoglycoside /enzyme/co-facteur a été résolue en 1994 pour l'APH 3' (IIIa) par Hon *et al.*⁵¹ Cette enzyme à elle seule confère à la bactérie qui la produit une

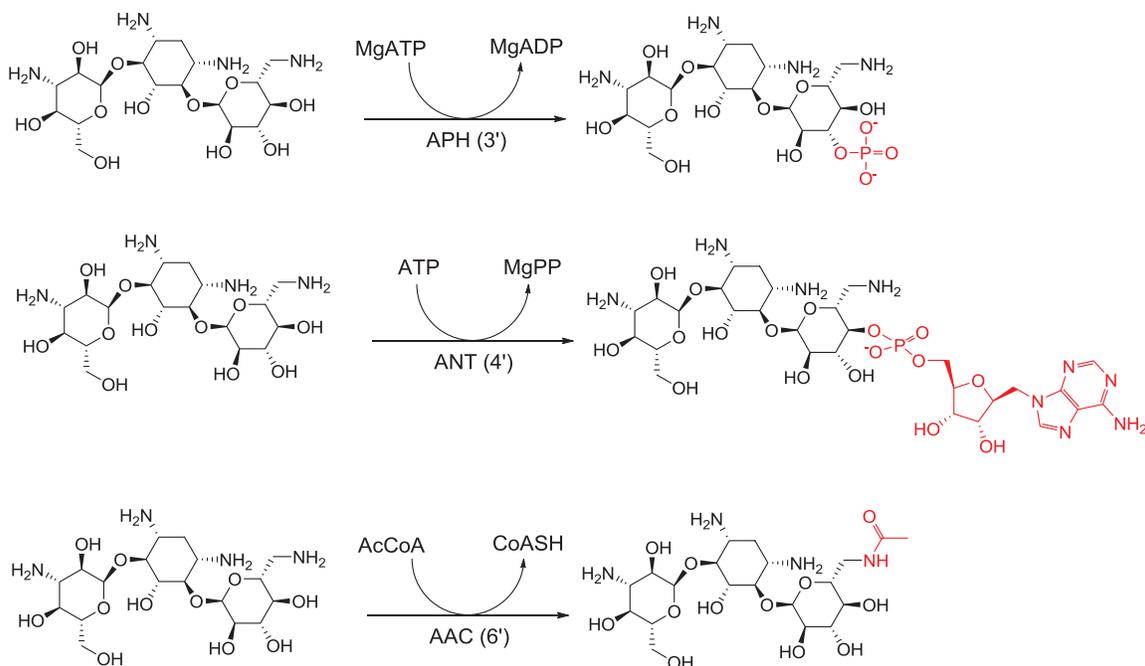


Figure 1.7 Modification enzymatique de la kanamycine A par une enzyme phosphotransférase (APH (3')), adénylotransférase (ANT (4')) et acétyltransférase (AAC (6')).^{21e,49}

résistance à la kanamycine A (**1.9**), la néomycine (**1.3**), la paromomycine (**1.4**), la lividomycine (**1.7**), la butirosine (**1.5**), la ribostamycine (**1.6**) et l'amikacine (**1.27**).^{21e, 50,52}

La famille des aminoglycosides acétyltransférases est constituée de 4 isozymes : soit les AAC (1), AAC (3), AAC (2') et AAC (6').⁵⁰ Ces enzymes catalysent la *N*-acétylation, en utilisant la co-enzyme A, de la majorité des aminoglycosides utilisés en milieu hospitalier. Les informations génétiques de ces enzymes sont codées sur des transposons ou des intégrons.⁴⁸ Une structure rayons X de l'enzyme en complexe avec son cofacteur

et la ribostamycine a été obtenue de l'AAC (6').⁵³ Notons aussi la récente isolation d'une enzyme bifonctionnelle AAC (6')/APH (2"). Cette enzyme est capable de modifier la grande majorité des aminoglycosides connus. Elle peut aussi acétyler les aminoglycosides possédant un hydroxyle en 6'.⁵⁴

La dernière famille d'enzymes, les aminoglycosides adényltransférases (ANT), catalyse le transfert catalytique d'un motif adényle entre le complexe Mg*ATP et l'aminoglycoside.⁵⁰ Le gène codant pour l'ANT (2") est retrouvé dans la majorité des bactéries à Gram négatif. Les informations génétiques pour ces enzymes sont localisées sur des transposons et des intégrons.⁴⁸ Il n'y a que dix isozymes identifiés dans cette famille. Une structure rayon X du complexe de l'ANT4'-1a (4')/cofacteur/aminoglycoside a été résolue par Sakon *et al.* en 1993.⁵⁵

1.7 Toxicité

En plus de la résistance bactérienne, la toxicité des aminoglycosides antibiotiques les rend moins attrayants comme traitement de première ligne. Ils sont néphrotoxiques et ototoxiques à une certaine concentration sanguine, c'est pourquoi on doit les utiliser sous stricte supervision médicale, afin de mesurer leur concentration dans le plasma sanguin.¹⁴

1.7.1 Ototoxicité

Une perte de l'audition (temporaire ou permanente) peut être observée chez 33% des patients suite à un traitement prolongé aux aminoglycosides.⁵⁶ Les aminoglycosides affectent les cellules ciliées de l'oreille externe.⁴⁸ Les raisons précises de cette toxicité ne sont pas connues, mais on soupçonne des radicaux libres d'azotes et d'oxygènes qui ont été observés dans les cellules suite à un traitement aux aminoglycosides.⁵⁶ Ces radicaux sont le résultat d'une réaction redox entre un complexe aminoglycoside/Fe(II) et l'oxygène. Des découvertes récentes tendent à montrer que des dommages induits par les radicaux libres à l'actine du cytosquelette sont responsables de la mort cellulaire.⁵⁶ Il existe aussi des mutations génétiques qui rendent certains patients plus sensibles aux pertes auditives associées aux traitements prolongés aux aminoglycosides. Cette sensibilité découle d'une ressemblance de séquence entre une protéine mitochondriale eucaryote (12S ARNr) et le fragment ribosomal bactérien (16S ARNr).⁵⁶ Plusieurs

composés ont été identifiés qui, co-administrés avec les aminoglycosides, ont des effets chémoprotecteurs sur les cellules ciliées. Par exemple, le leupeptide inhibe la calpaïne, une enzyme essentielle lors de l'apoptose cellulaire.⁵⁷ On observe un taux de survie des cellules ciliées de 50% plus élevé que celui obtenu lorsque les aminoglycosides sont administrés seuls.⁵⁷

1.7.2 Néphrotoxicité

Les premiers symptômes d'un effet néphrotoxique suite aux traitements prolongés par des aminoglycosides sont une augmentation de la clairance de la créatinine dans le sérum sanguin et la production d'une urine hypotonique.⁵⁷ Seule une faible proportion, environ 5 à 10% des aminoglycosides, sont absorbés par les cellules épithéliales du tube proximal suite à la filtration glomérulaire.⁵⁸ À l'intérieur de la cellule eucaryote, ils se concentrent dans les endosomes, les lysosomes et l'appareil de Golgi. Ils pénètrent la cellule en se liant d'abord à la paroi de phospholipides pour se lier par la suite à une protéine transmembranaire, la mégaline.⁵⁷ Cette protéine a une affinité pour les substrats polycationiques et est principalement exprimée dans les reins et les oreilles. Une fois accumulés à l'intérieur du lysosome, les aminoglycosides semblent inhiber des enzymes phospholipidases, une des causes probables de la néphrotoxicité. Une autre hypothèse veut que les aminoglycosides se complexent au Fe(II), comme observé pour la gentamicine, pour former un couple très oxydant capable de faire du dommage à la cellule.⁵⁹ Finalement, la dernière hypothèse veut qu'une faible proportion de l'aminoglycoside non capturée par le lysosome effectue du dommage à la paroi des phospholipides des organelles de la cellule.⁵⁷ La toxicité est un problème multifactoriel et le mécanisme global exact de cette toxicité n'est pas encore déterminé.

1.8 Aminoglycosides semi-synthétiques

1.8.1 Relation structure/substrat enzymatique des aminoglycosides naturels

Les microorganismes producteurs d'aminoglycosides antibiotiques, dans leur lutte acharnée contre leurs congénères, ont développé des molécules capables d'affecter des bactéries productrices d'enzymes de résistance. En 1957, Weinstein *et al.* ont isolé la gentamicine c1a (**1.14**), un analogue de la kanamycine B (**1.9**), qui ne possède pas

d'alcool en position 3' et 4' (Figure 1.8).¹⁷ Cette didésoxygénation vient frustrer chimiquement les enzymes APH (3') et l'ANT (4'), car la molécule ne possède plus les fonctions hydroxyle, la cible de ces enzymes.⁴⁹ Un autre exemple d'adaptation et de sélection naturelle est la découverte de la butirosine (**1.5**) en 1971.¹⁰ Cet aminoglycoside possède une chaîne latérale jusque là jamais vue en position N-1. La chaîne (S)-2-hydroxy-4-aminobutyrique acide (HABA) confère à la butirosine une protection contre l'APH (3') et contre l'ANT (2").⁴⁸

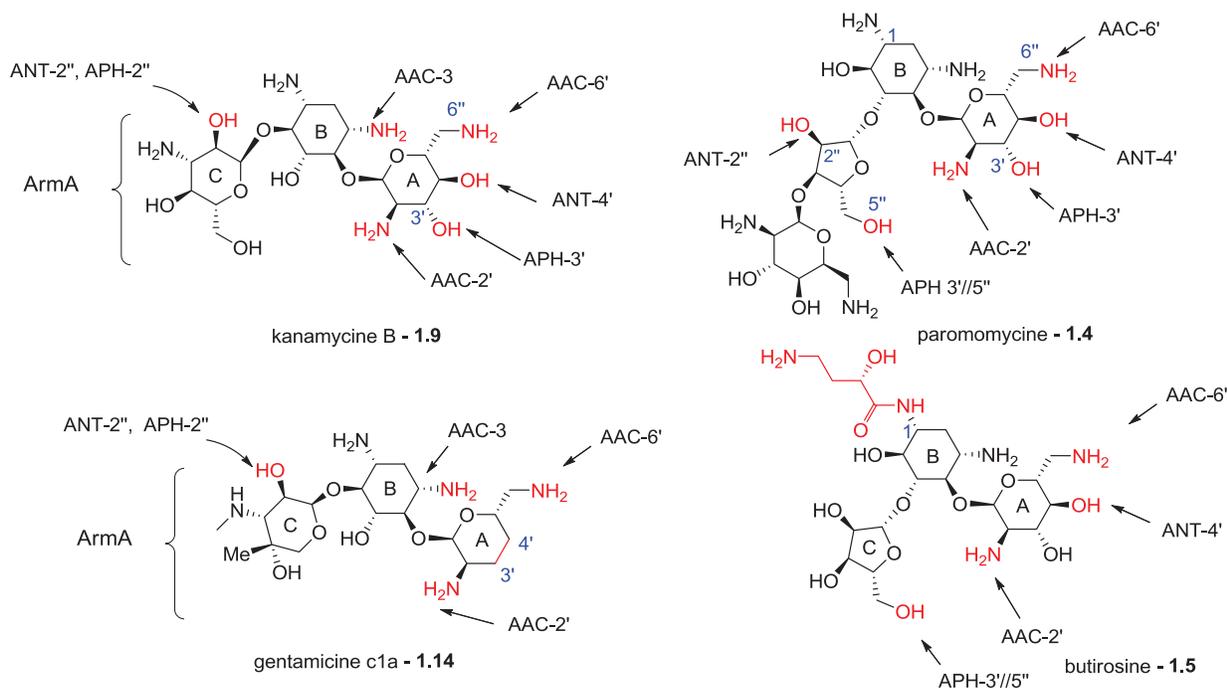


Figure 1.8 Aminoglycosides naturels possédant le groupement HABA et la didésoxygénation et leur relation structure/substrat enzymatique

1.8.2 Aminoglycosides semi-synthétiques

L'isolation de ces deux aminoglycosides antibiotiques a inspiré de nombreux chercheurs à produire des aminoglycosides possédant ces caractéristiques, soit la didésoxygénation et l'incorporation de la chaîne latérale HABA en N-1 (Figure 1.9). L'amikacine (**1.25**), un dérivé de la kanamycine A auquel on a ajouté HABA en position N-1 a été produit semi-synthétiquement en 1972 par Kawaguchi *et al.*⁶⁰ Cet aminoglycoside a été largement utilisé au Japon et a été un succès clinique et commercial important.⁴⁸ Sa large utilisation clinique a cependant montré que l'amikacine est un substrat pour plusieurs autres

enzymes (AAC (6'), APH (3') et (2''), ANT (4', 4'')) et est sensible à la méthylation du ribosome (Arm A).^{48, 61} Un autre antibiotique notoire, développé en 1973 par Umezawa et *al.*, soit l'arbekacine (**1.26**), combine les deux avantages évolutifs qu'ont la gentamicine c1a et la butirosine.⁶² Les chercheurs ont combiné la didésoxygénation et la chaîne latérale HABA (Figure 1.9). Cet antibiotique est actif contre diverses souches bactériennes résistantes aux aminoglycosides. Il est cependant désactivé par les bactéries porteuses de l'AAC (6') et (2') et comme tous les antibiotiques de la classe des 4,6 substitués, l'arbekacine (**1.26**) est aussi affecté par les méthylations du ribosome (Arm A)

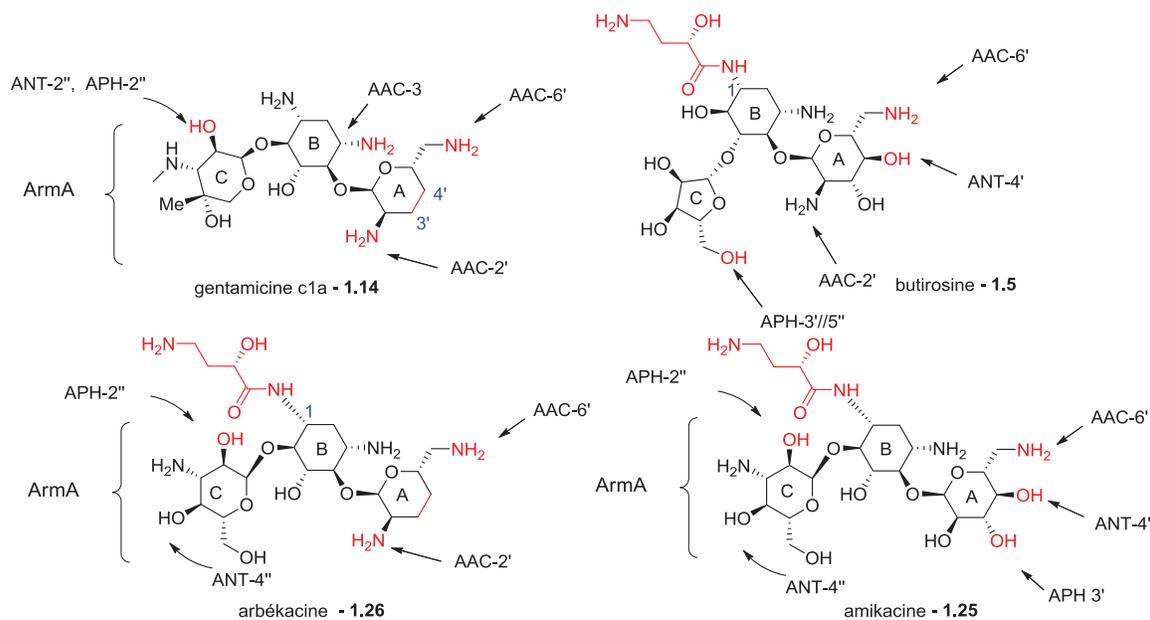


Figure 1.9 Relation structures/substrats enzymatiques d'aminoglycosides semi-synthétiques

(Figure 1.9).⁶³ Au fil des années, de nombreux aminoglycosides semi-synthétiques ont été développés, cependant aucun d'eux n'a connu le succès clinique et commercial des aminoglycosides nommés précédemment (Une liste non-exhaustive des aminoglycosides semi-synthétiques est présentée à la Figure 1.10). Très récemment, la compagnie *Achaogen* a reçu d'importantes subventions de la part du gouvernement Américain pour développer le composé nommé ACHN-490 (**1.28**).^{64, 65} Ce médicament a déjà franchit la première étape de l'étude clinique pour traiter les infections urinaires causées par des bactéries résistantes. Il devrait entrer dans la phase 2 au cours de la présente année.

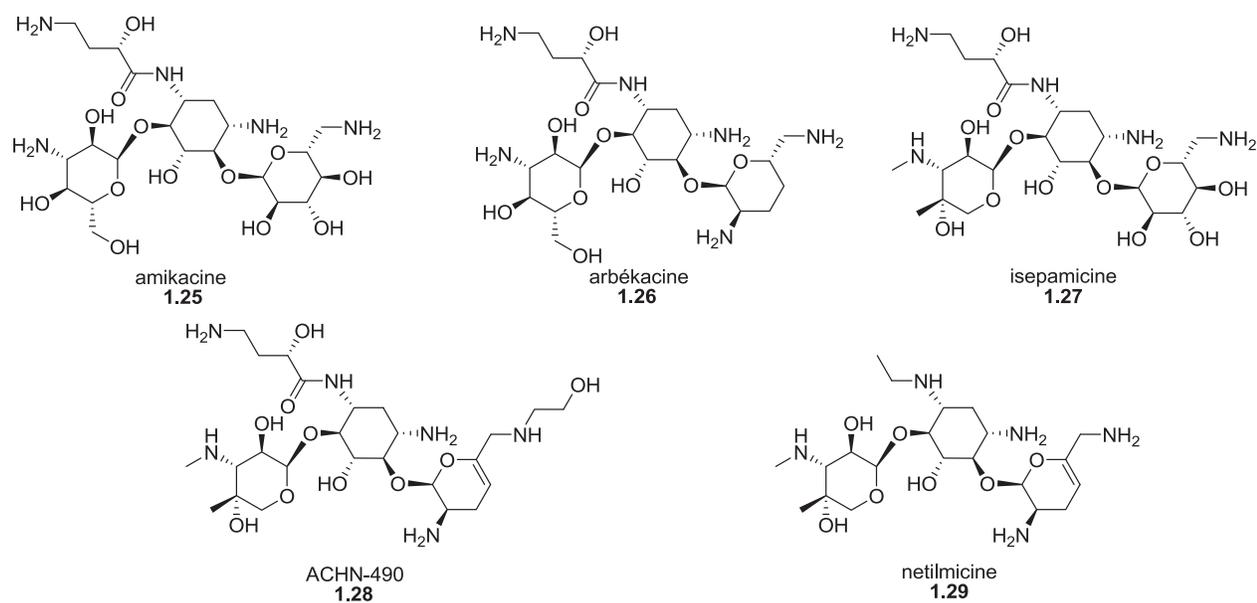


Figure 1.10 Liste non-exhaustive des aminoglycosides semi-synthétiques

1.8.3 Synthèses d'aminoglycosides semi-synthétiques

La désoxygénation en position 3' et/ou 4' du cycle A des aminoglycosides et l'introduction du groupement HABA en *N*-1 se sont avérées des stratégies efficaces pour déjouer et réduire la résistance bactérienne. Ces stratégies ont été abondamment explorées dans les années 1970 et 1980 par les groupes d'Umezawa, Battistini et plus récemment par Chang avec sa synthèse de la pyranmycine.^{62,66,67,73}

1.8.4 Désoxygénation et didésoxygénation sur les aminoglycosides de type 4-6

Les frères Umezawa ont été des pionniers dans la découverte et la synthèse d'aminoglycosides semi-synthétiques ayant une activité supérieure aux composés parents. La stratégie qu'ils ont utilisé pour désoxygéner les positions 3'/4' requière l'isolation du diol, suivi de sa méssylation et puis finalement de l'élimination du groupe partant de façon *trans* diaxiale. Cette méthode nécessite la protection de toutes les fonctions hydroxy et neuf étapes afin d'obtenir l'alcène correspondant à partir du diol de la kanamycine (Schéma 1.11).⁶⁶ La synthèse de la dibékacine (**1.33**, Schéma 1.1), version didésoxygénée de la kanamycine B, commence avec la protection des amines en carbamates d'éthyle, puis la formation d'un acétal de type isopropylidène entre l'alcool

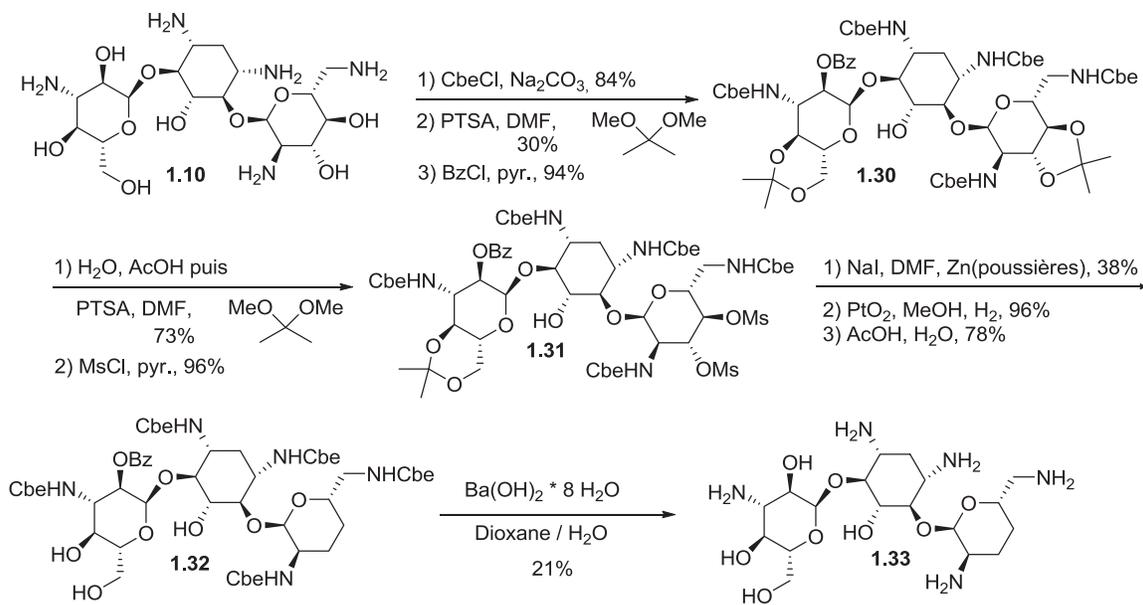


Schéma 1.1 Synthèse de la 3', 4'-didésoxy-kanamycine B par Umezawa *et al.* (**1.33**)⁶⁶

3' et 4', ainsi qu'entre les alcools 6''' et 4'''. Puis, l'alcool 2''' est protégé avec un benzoyle pour obtenir la kanamycine B (**1.30**) complètement protégée avec un rendement de 25% pour trois étapes. Les deux acétals sont ensuite clivés pour reformer sélectivement celui à 6 chainons sur le cycle C. Le diol alors isolé sur le cycle A est méthylé pour obtenir **1.31**.

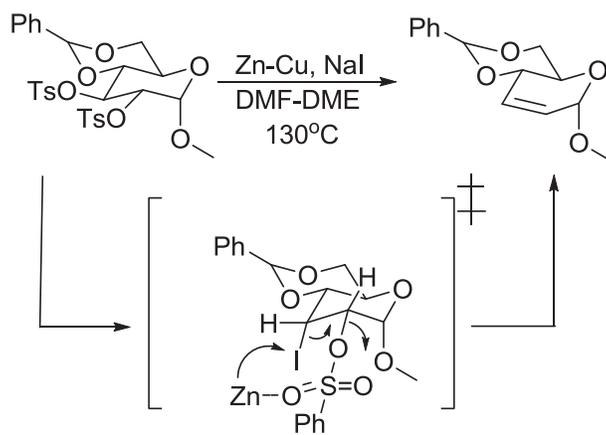


Schéma 1.2 Réaction de Tipson-Cohen⁶⁷

L'intermédiaire **1.31** est traité avec de l'iode et du zinc afin d'éliminer le dimésylate pour isoler l'alcène avec un rendement de 38%. Cette réaction est aussi connue sous le nom de Tipson-Cohen (Schéma 1.2).⁶⁷ L'alcène est ensuite hydrogéné par catalyse hétérogène avec un rendement de 96% et finalement les acétals seront clivés en condition acide pour

obtenir le 2'''-*O*-benzoyl-3',4'-didésosy-penta-*N*-éthoxycarbamate-kanamycine B (**1.32**) avec un rendement de 78%. Les carbamates d'éthyle et les esters sont déprotégés en conditions basiques pour obtenir la 3',4'-didésosy-kanamycine B (**1.33**) avec un faible rendement de 21%. Un rendement global de 1% est obtenu et neuf étapes sont nécessaires pour effectuer cette transformation en apparence simple.⁶⁶

Des stratégies très similaires, utilisant des variantes de la réaction de Tipson-Cohen, ont été employées par Umezawa⁶² pour obtenir avec succès le motif 3',4'-didésosy sur le cycle A de divers aminoglycosides. La nature du groupe partant a été modifiée afin d'obtenir un meilleur rendement.⁶⁸ Il est à noter que cette méthode est compatible avec les carbamates, mais incompatible avec plusieurs groupements protecteurs utilisés en synthèse, notamment les azotures.

Dans le but d'avoir une meilleure compréhension de l'effet de chacune des fonctions hydroxyle sur la désactivation enzymatique, des chercheurs ont préparé et évalué les composés mono-désoxygénés soit en 3' ou en 4'.^{69,70} La synthèse de la kanamycine 3'-désoxygénée (Schéma 1.3, **1.37**) commence avec la protection des amines en carbamates

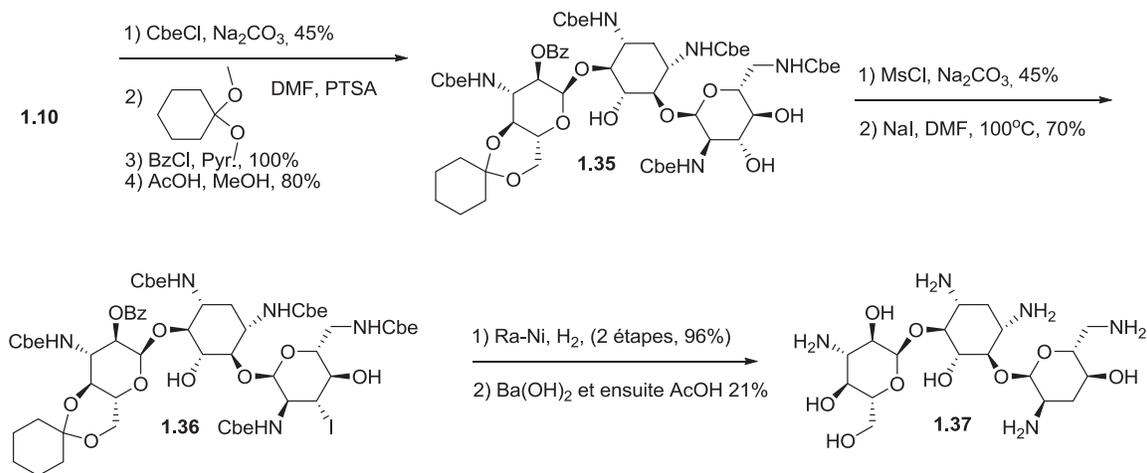


Schéma 1.3 Synthèse de la 3'-désoxy-kanamycine B par Umezawa et *al.* (**1.37**)⁶⁹

d'éthyle, puis les deux diols sont protégés sous forme de cyclohexylidène et l'alcool 2''' est ensuite benzoylé, ce qui permet la déprotection sélective du diol du cycle A en condition acide pour obtenir **1.35**. L'alcool 3' est sélectivement mésylé, pour être

déplacé par un iodure afin d'obtenir **1.36**. L'iodure est réduit à l'aide du nickel de Raney pour obtenir le produit désoxygéné. La déprotection finale est effectuée avec l'hydroxyde de barium pour obtenir le 3'-désoxy-kanamycine B (**1.37**) dans un rendement global de 2%.

Kamagushi propose deux synthèses différentes (Schéma 1.4) pour atteindre le composé 4'-désoxy-kanamycine B, (**1.40**) et ce à partir de la kanamycine B.⁷⁰ La première synthèse repose sur l'isolement de l'alcool en 4' à l'aide d'un carbamate cyclique et ensuite la transformation de cet alcool en groupe partant. Le mésylate est ensuite déplacé par un iodure qui est réduit sur palladium. Les carbamates sont déprotégés en conditions basiques pour obtenir la 4'-désoxy-kanamycine B, (**1.40**). La deuxième synthèse s'effectue en acétylant la 6'-*N*-Cbz-kanamycine B, pour ensuite déprotéger l'amine en 6'. Un transfert *N/O* d'acétyle est ensuite observé, ce qui permet l'isolation de l'alcool en 4' et sa mésylation pour obtenir **1.39**. Le mésylate est déplacé par un thioacétate et réduit à l'aide du nickel de Raney. La déprotection des acétates fournit alors le 4'-didésoxy-kanamycine B. Ces synthèses, bien qu'ayant de faibles rendements globaux (inférieurs à 1%), ont permis une meilleure compréhension des caractéristiques structurales entraînant la résistance bactérienne et ce dès les années 1970.⁷¹

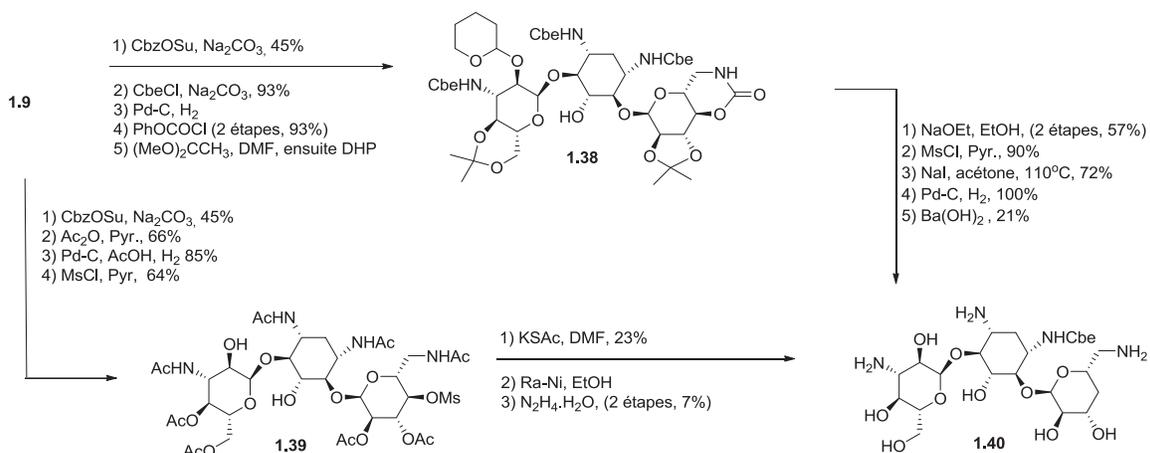


Schéma 1.4 Synthèse de la 4'-désoxy-kanamycine B par Kamagushi et al. (**1.40**)⁶⁹

Chang *et al.* ont développé une synthèse alternative (Schéma 1.5) à l'utilisation du couple NaI/Zn pour effectuer la didésoxygénation des diols *trans*. Le diol est d'abord transformé

en ester triflique pour ensuite les déplacer par des iodures qui seront ensuite éliminés par un autre iodure. L'ajout de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ à ce mélange permet de reconvertir I_2 en I^- .⁷⁰ Ceci permet d'utiliser l'iode en quantité catalytique et ainsi d'avoir une quantité

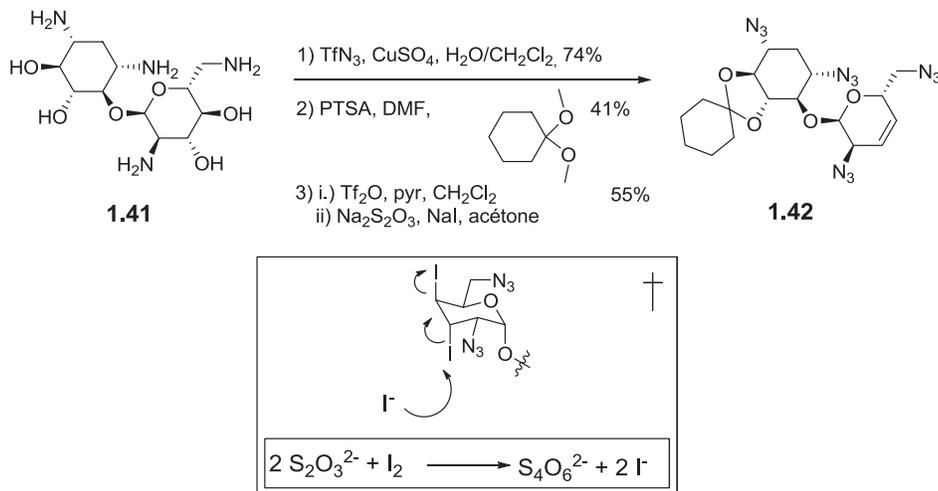


Schéma 1.5 Synthèse de la 3',4'-didésoxy-néamine par Chang *et al.* (**1.42**)⁷³

minimale d'iode en solution. Cela diminue les réactions secondaires associées aux réactions d'additions sur l'alcène.⁷⁰ Cette méthode a l'avantage d'être douce, mais nécessite, comme dans le cas des autres méthodes, une protection complète des autres fonctions hydroxyles de la molécule. Chang *et al.* ont ainsi synthétisé la 3',4'-Didésoxykanamycine A (Schéma 1.6) à partir de la néamine, **1.41**, un produit de la dégradation acide de la néomycine (**1.3**). Les amines ont été protégées en azidures pour ensuite orthogonalement protéger le diol du cycle B en cyclohexylidène. Le diol ainsi isolé est alors transformé en triflate. On expose le composé à l'iode qui effectuera une élimination *trans* diaxiale pour fournir l'alcène (**1.42**). Le groupe de Chang utilise ensuite

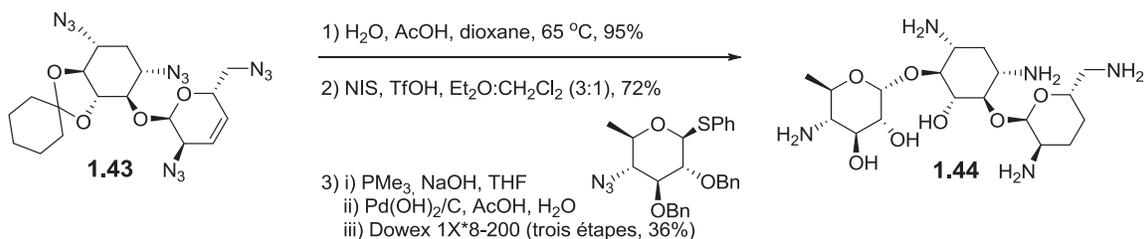


Schéma 1.6 Synthèse d'un analogue de la 3',4'-didésoxy-kanamycine B (**1.44**)⁷²

une réaction de glycosidation avec un analogue du cycle C de la kanamycine B pour obtenir après déprotection le produit final (1.44) (Schéma 1.6). Cette méthode a l'avantage de permettre l'introduction de diversité lors de la glycosidation.⁷² Cette méthode nécessite cependant de nombreuses étapes de protections et de déprotections (9 étapes) et ce avec un faible rendement global de 4%.

1.8.5 Synthèse d'aminoglycosides de type 4,5 désoxygénés en position 3',4'

Bien que le motif 3',4' ait été abondamment exploré sur les aminoglycosides de type 4,6, ce dernier n'a été exploré que de façon limitée sur les aminoglycosides de type 4,5 comme la paromomycine et la néomycine. On dénote l'utilisation de deux stratégies différentes pour atteindre ce motif chez les molécules de type paromomycine/néomycine. Il y a d'abord la glycosidation du cycle C/D à partir de la néamine préalablement désoxygénée⁷³ et l'utilisation de la stratégie de Tipson-Cohen pour désoxygéner directement la néomycine/paromomycine.⁷³

L'approche par glycosidation a certains avantages, car elle permet de travailler sur une molécule plus simple, ce qui facilite l'isolement du diol du cycle A. Elle permet aussi d'introduire de la diversité quant à la nature du cycle glycosidé installé sur la néamine. Le groupe de Chang a connu un certain succès en effectuant la synthèse de nombreux nouveaux hybrides de type 4,5 nommés les pyranmycines (1.45), (Schéma 1.7).⁷² Un nombre d'étapes important qui donne un faible rendement global de 3% sont cependant nécessaires pour accéder à ce type d'aminoglycosides.

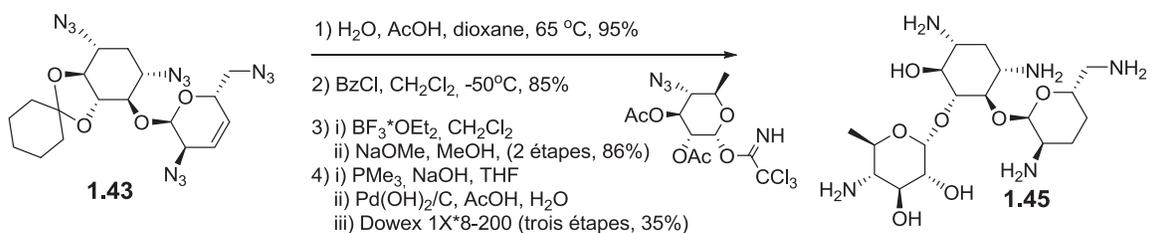


Schéma 1.7 Synthèse d'hybride de type pyranmycine par Chang et al (1.45)⁷²

Battistini *et al.*, ont synthétisé la 3',4'-didésoxy-paromomycine (Schéma 1.8) directement à partir de la paromomycine.⁷³ Leur approche repose sur l'isolation du diol en 3',4' pour l'éliminer via l'iodohydrine. La synthèse commence alors avec la protection

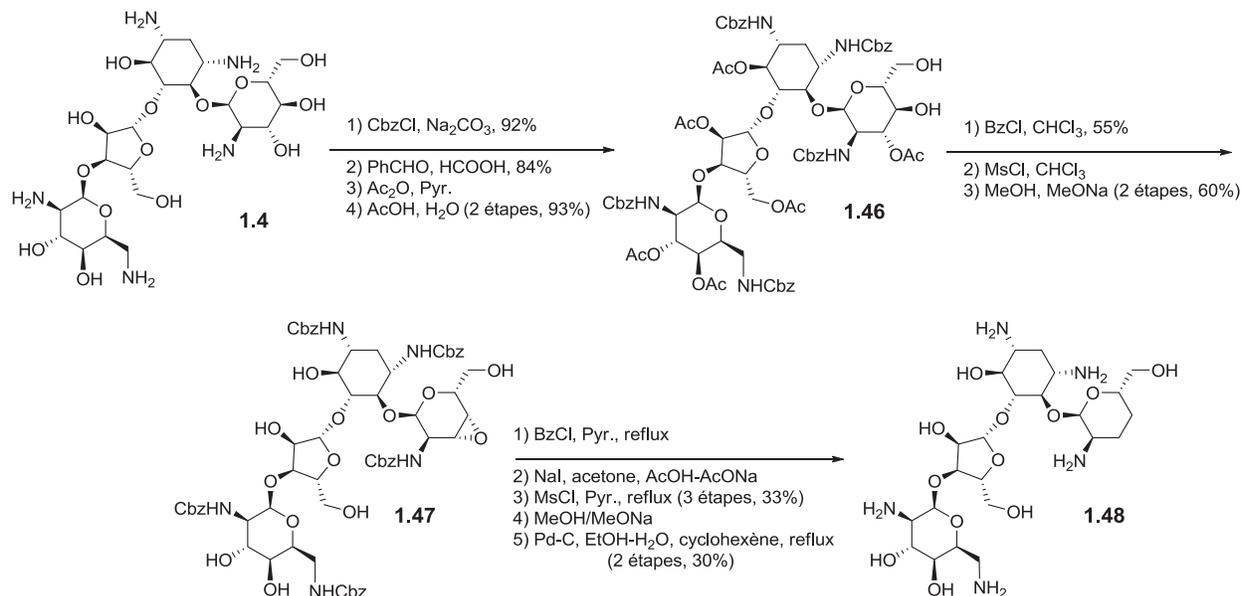


Schéma 1.8 Synthèse de la 3',4' didésoxy-paromomycine par Battistini *et al.*⁷² (**1.48**)

des amines en carbamates, puis la formation d'un benzylidène sur le cycle A entre O-6' et O-4' tel que rapporté par Hanessian *et al.*⁷⁴ Les autres alcools sont alors acétylés à l'aide de l'anhydride acétique. Le benzylidène est déprotégé pour isoler les alcools 6' et 4' (1.46). L'alcool primaire est sélectivement protégé avec le chlorure de benzoyle, puis l'alcool en 4' est mésylé. Lors de la déprotection en condition basique des acétates, l'époxyde entre les carbones 3' et 4' se forme par déplacement du mésylate par l'alcoolate adjacent pour obtenir **1.47**. On protège ensuite tous les alcools à nouveaux, pour ouvrir l'époxyde avec du NaI. L'iodohydrine obtenue est mésylée pour être éliminée afin d'obtenir l'alcène correspondant. Après une déprotection basique des esters et l'hydrogénation des carbamates, on obtient le produit final **1.48**. Cette méthode comporte de nombreuses étapes de protections et de déprotections et donne un faible rendement global de 2%.

1.8.6 Introduction du groupement HABA en position N-1

Le groupement HABA (l'acide (*S*) 4-amino-2-hydroxy-butanoïque) en position N-1 a été découvert sur l'aminoglycoside naturel butirosine (**1.5**). Il a été démontré que cette chaîne latérale confère à la butirosine une protection contre les enzymes du type APH (2'') et l'ANT (4'), AAC (3').⁴⁸ Très rapidement après la découverte de ce groupement, Kamaguchi *et al.* ont installé celui-ci sur la kanamycine A pour obtenir l'amikacine (BB-

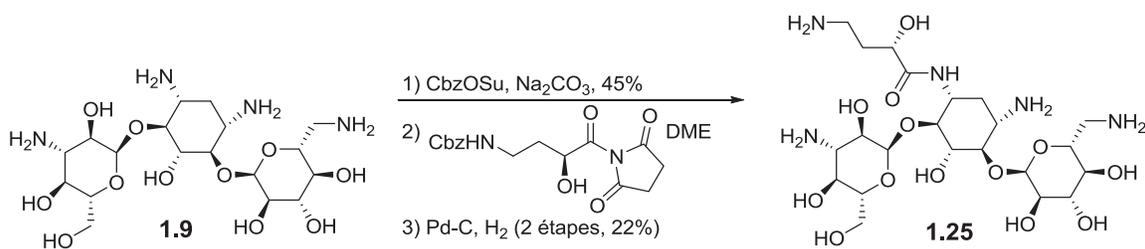


Schéma 1.9 Synthèse de l'amikacine par Kamaguchi *et al.*⁵⁹ (**1.25**)

K8) (**1.25**) (Schéma 1.9).⁵⁹ L'installation de cette chaîne latérale a été effectuée en trois étapes avec un rendement global de 10%. La nouvelle chaîne, tel que prévu, confère une protection contre la désactivation enzymatique attribuée aux enzymes APH (3') I-III, ANT (2'') et AAC (3'). Cet antibiotique a connu un succès commercial retentissant et est toujours utilisé aujourd'hui en clinique.

La combinaison du groupement HABA et de la didésoxygénation en 3',4' s'avère une excellente combinaison pour combattre la résistance enzymatique. Umezawa *et al.* ont synthétisé, en 1973, la 3',4'-didésoxy-N-1-HABA-kanamycine B (arbakine, **1.26**) (Schéma 1.10).⁶² Cet antibiotique a montré une activité contre des souches bactériennes combinant des enzymes de types AAC (3'), APH (3'), ANT (2'') et (4') qui désactivent habituellement la kanamycine B. La synthèse s'effectue de façon analogue à l'amikacine.

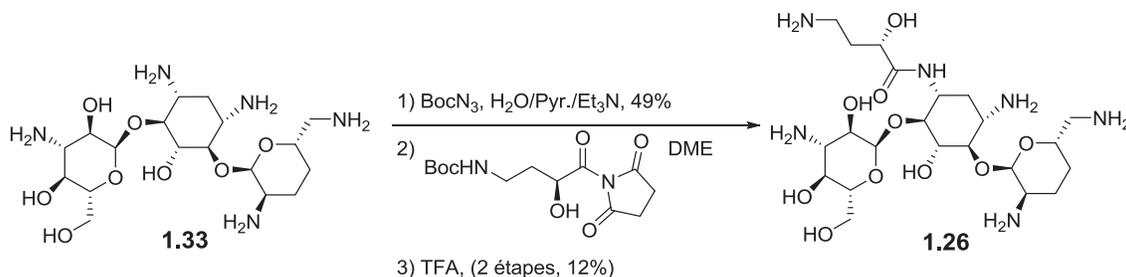


Schéma 1.10 Synthèse de l'arbakine par Umezawa *et al.* (**1.26**)⁶²

On compte treize étapes pour l'effectuer et un faible rendement global inférieur à 1%. Cet analogue a été introduit sur le marché au Japon en 1990 comme traitement de deuxième ligne contre les *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (SARM).⁴⁸

La nécessité de préparer d'importantes quantités d'arbekacine afin de commercialiser cet aminoglycoside semi-synthétique sur le marché nécessite une optimisation de la synthèse initiale. Parmi les nombreuses méthodes novatrices mises de l'avant pour synthétiser l'arbekacine (**1.26**), notons l'introduction sélective en *N*-1 du groupement HABA *via* chélation métallique des amines de la kanamycine (Schéma 1.11).⁷⁶

Bien que de nombreux analogues didésoxygénés portant en *N*-1 la chaîne latérale HABA ont été synthétisés dans la famille des 4,6-disubstitués, bien peu d'analogues de la famille des 4,5-disubstitués avec le groupement HABA et la didésoxygénation ont été synthétisés et aucun d'entre eux n'a été commercialisé. On peut distinguer trois stratégies différentes pour introduire le groupement HABA; soit l'utilisation de carbamates cycliques, la réduction sélective des azotures et l'utilisation d'un ester activé.⁷⁶

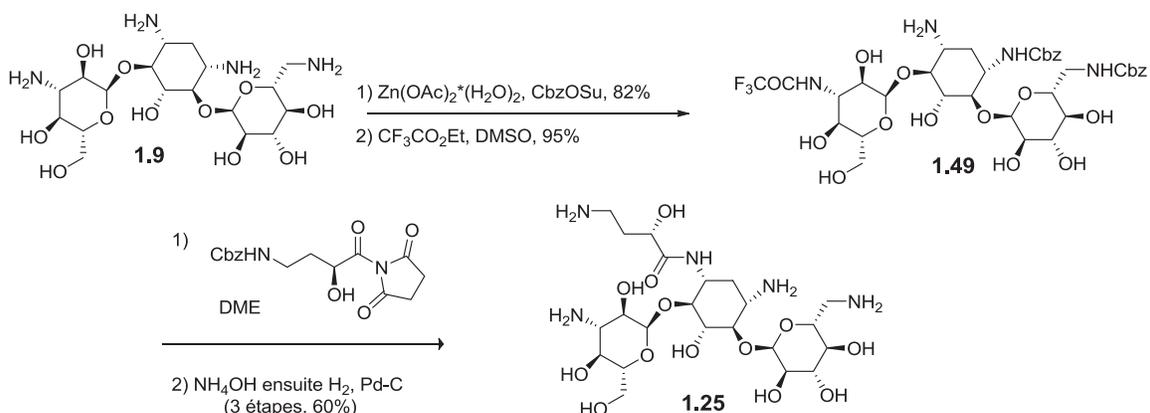


Schéma 1.11 Synthèse de l'amikacine via une chélation au zinc par Umezawa et al.⁷⁶ (**1.25**)

La formation de carbamates cycliques permet d'obtenir l'amine *N*-1 non-protégée sélectivement dans les aminoglycosides 4,5-disubstitués. Par exemple, Pan *et al.* (Schéma 1.12) ont démontré qu'en traitant la tri-*N*-Cbz néamine (Schéma 1.12) avec une base forte, il est possible d'isoler le biscarbamate de la néamine.⁷⁶ Il est alors possible d'hydrolyser sélectivement en condition basique le carbamate à cinq chaînons. Il

s'hydrolyse plus facilement, car il est beaucoup plus tendu que celui à six chaînons. Ceci a pour effet d'obtenir l'amine sur laquelle on désire installer la chaîne latérale (**1.50**). L'utilisation des carbamates cycliques a été abondamment explorée tant comme groupe protecteur que pour obtenir une amine non-protégée importante, notamment par les groupes de Pan,⁷⁷ Umezawa et Hanessian.⁷⁸ Il y a cependant peu d'exemples d'utilisation des carbamates cycliques avec des aminoglycosides de la famille des 4,5-disubstitués contenant 4 ou 5 cycles, *e.g.* paromomycine, néomycine, lividomycine A.

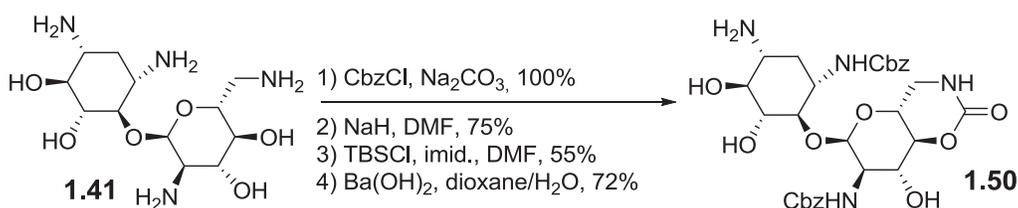


Schéma 1.12 Isolement de l'amine en *N*-1 via les carbamates par Pan *et al.*⁷⁷ (**1.50**)

Une autre stratégie novatrice ayant fait ses preuves pour acycler la position *N*-1 est l'utilisation d'une réaction de Staudinger régiosélective pour réduire l'azidure en *N*-1. Chang *et al.* ont démontré qu'il était possible d'effectuer une réaction de Staudinger de

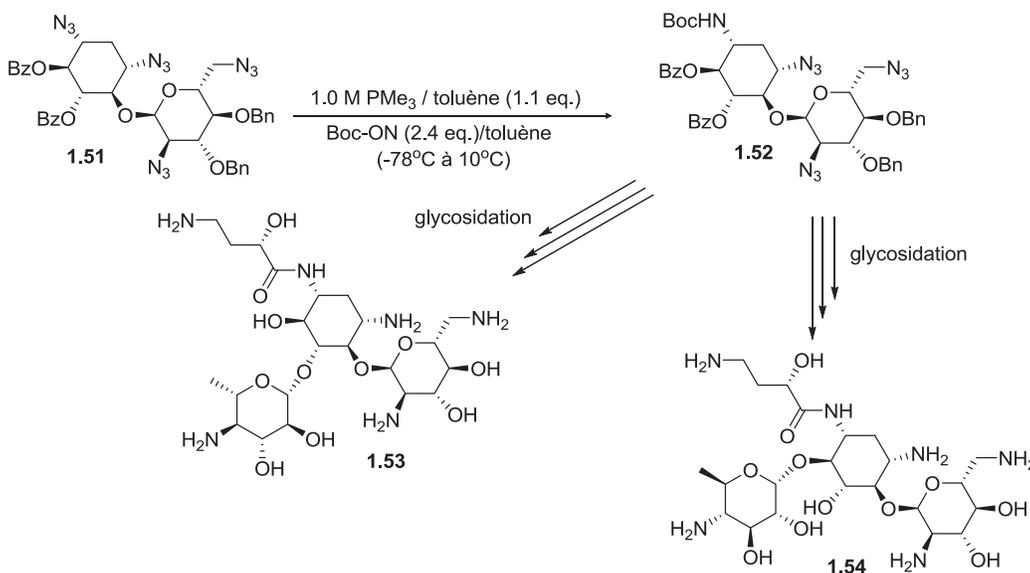


Schéma 1.13 Isolement de l'amine en *N*-1 via une réaction de Staudinger sélective par Chang *et al.*⁷⁹

façon sélective sur la néamine (Schéma 1.13).⁷⁸ Par glycosidation, des analogues semi-synthétiques de la kanamycine portant le groupement HABA en position *N*-1 sont synthétisés, ainsi que les analogues de type pyranmycine (4,6-disubstitués).

1.9 Synthèse de la 3',4'-didésoxy-*N*-1-HABA-néomycine (1.58)

Il n'y a que quelques exemples qui ont combiné la didésoxygénation et le groupement HABA dans les aminoglycosides de types 4,5. Il n'y a aucun exemple qui a combiné ces spécificités directement à la néomycine ou à la paromomycine. Il serait avantageux de pouvoir combiner ces modifications structurales à cette classe d'aminoglycosides, car à l'inverse de l'arbekacine ceux-ci ne sont pas désactivés par la modification du ribosome (Arm A) et ne sont pas touchés par l'enzyme APH (2") qui désactive l'arbekacine. De plus, l'application de cette stratégie a déjà permis d'introduire un aminoglycoside en clinique, *e.g.* arbekacine.

1.9.1 Synthèse de première génération 3',4'-didésoxy-*N*-1-HABA-néomycine (1.58)

Des travaux non-publiés de notre groupe de recherche, plus précisément ceux du Dr. Pachamuthu Kandasamy, permettent de synthétiser en 18 étapes la 3',4'-didésoxy-*N*-1-HABA-néomycine avec un rendement global de 2%.⁸⁰ Cette synthèse combine l'utilisation d'un carbamate cyclique et d'une didésoxygénation de type Tipson-Cohen. Le matériel de départ est la paromomycine (1.4), où les amines sont protégées sous forme de carbamates benzyliques. Un benzylidène est ensuite installé sur les alcools en 6' et 4' tel que rapporté par Hanessian *et al.*⁷⁴ Le manque de réactivité de l'alcool en 6 est utilisé pour protéger tous les alcools à l'exception de celui-ci avec des éthers de silyle (1.55). On forme alors le carbamate cyclique avec l'alcool libre et l'amine adjacente. Ce dernier est hydrolysé en condition basique aqueuse. Un couplage peptidique est ensuite effectué entre l'amine libre et l'acide (*S*)-4-amino-2-hydroxybutanoïque pour obtenir le produit acylé (1.56). Les TBS sont ensuite remplacés par des acétates, afin de pouvoir déprotéger le benzylidène en condition acide. À ce moment, un azoture est installé en 6' *via* le déplacement du groupement partant tosylate, pour obtenir (1.57). Un mésylate est ensuite installé en 4' et on déprotège les acétates sous conditions basiques. Lors du traitement

basique, l'époxyde est formé entre le carbone 3' et 4' via déplacement du mésylate par l'alcoolate adjacent. L'époxyde est ouvert à l'aide d'iodure de sodium pour donner l'iodohydrine correspondant. Un mésylate est installé sur l'alcool puis est éliminé via une élimination de type *trans* diaxiale, ce qui résulte en la formation de l'alcène. Les acétates sont ensuite déprotégés en condition basique et l'azidure et les Cbz sont réduits par hydrogénation à l'aide du Pd(OH)₂. Cette synthèse fournit le produit (**1.58**) avec un faible rendement global (2%) et nécessite une longue séquence synthétique.

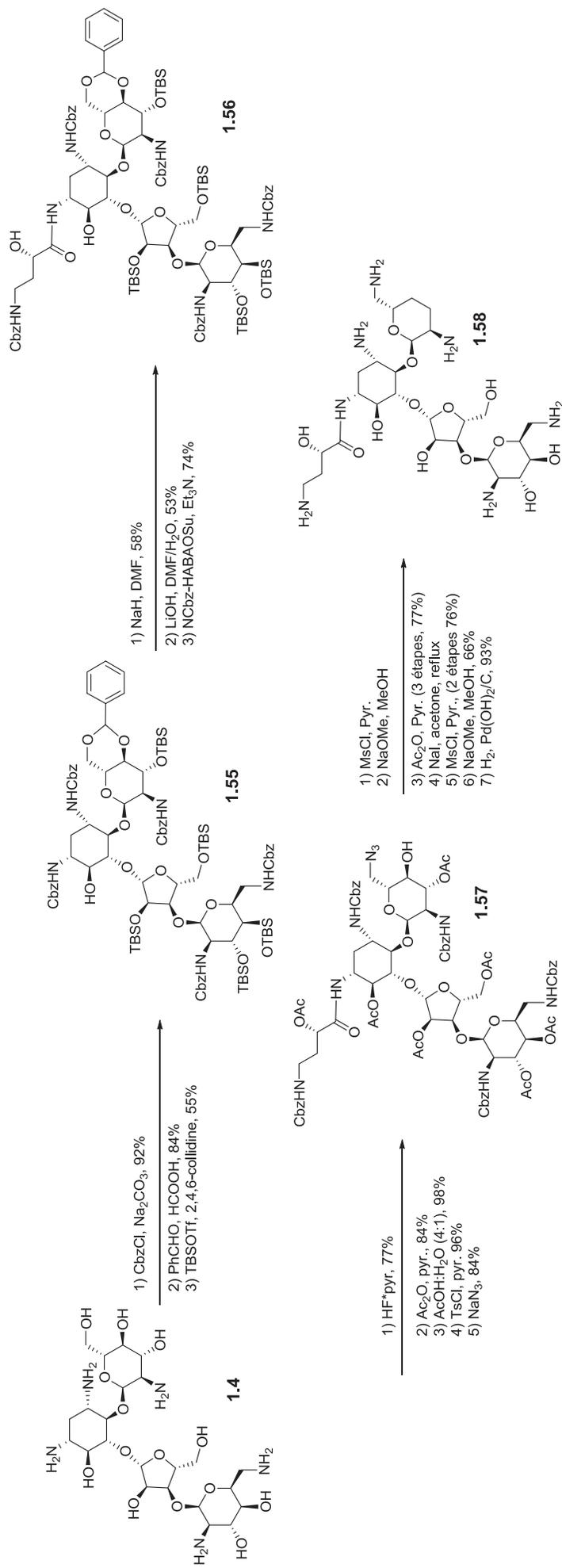


Schéma 1.14 Synthèse de la 3',4'-didésoxy-N-1-HABA-néomycine (**1.58**)

1.9.2 Activité antibactérienne *in-vitro* du composé 3',4'-didésoxy-*N*-1-HABA-néomycine (1.58)

Comme le démontre le Tableau 1.3, ce composé est extrêmement actif contre des souches de bactéries résistantes. Le composé parent à la néomycine **1.58** est nettement plus actif que cette dernière. On note qu'il n'est pas désactivé par les diverses isozymes de l'APH (3'), qu'il est aussi actif contre l'ANT (2") et (4') qu'il désactive entre autres l'amikacine et la gentamicine. Il est aussi actif contre l'AAC (3') qui désactive la gentamicine et la néomycine. De plus, on peut observer qu'à l'inverse des aminoglycosides de type 4,6 (*e.g.* gentamicine et amikacine) ce nouveau composé n'est pas désactivé par la modification ribosomale (Arm A). Ce composé est cependant sensible comme tous les aminoglycosides de sa classe à l'AAC (6'), mais de façon moins prononcée que la néomycine. Le large spectre d'action de cet antibiotique qui s'étend bien au-delà de celui de l'amikacine, actuellement utilisé en clinique, démontre l'efficacité de la combinaison de la didésoxygénation et de l'introduction du groupement HABA en *N*-1 sur des aminoglycosides de la famille 4,6-substitués.

Bactérie	Code	Type	amk. (1.27) (µg/ml)	gen. (1.14- 1.17) (µg/ml)	néo B (1.4) (µg/ml)	1.58 (µg/ml)
<i>S. aureus</i>	ASAU001	ATCC 29213 (QC)	2	1	1	1
<i>E. coli</i>	AECO001	ATCC 25922 (QC)	2	0,5	2	0,5
<i>K. pneumoniae</i>	AKPN002	ATCC 10031	0,5	0,25	0,5	1
<i>P. aeruginosa</i>	APAE001	ATCC 27853 (QC)	1	0,5	32	1
<i>P. aeruginosa</i>	APAE002	Pompe à efflux	2	2	8	1
<i>A. baumannii</i>	AABA106 5	Souche sensible	4	2	2	0,5
<i>P. aeruginosa</i>	APAE010	MexXY up	2	2	16	1
<i>A. baumannii</i>	AABA001	ATCC 19606	16	16	8	4
<i>Providencia stuartii</i>	APST001	AAC(2')-I	4	64	64	16
<i>E. coli</i>	AECO056	APH(3')-Ib	0,5	0,5	64	0,5
<i>Acinetobacter spp.</i>	AASP004	APH(3')-VI	>64	1	32	1
<i>S. aureus</i>	ASAU003	ANT(4')-I	64	0,5	>64	2
<i>P. aeruginosa</i>	APAE037	ANT(4')-II	32	2	8	1
<i>E. coli</i>	AECO037	ANT(2'')-I	4	64	2	2
<i>S. aureus</i>	ASAU008	APH(2'') + AAC(6')	64	>64	>64	4
<i>P. aeruginosa</i>	APAE040	AAC(3)-I	4	32	8	2
<i>E. coli</i>	AECO045	ArmA	>64	>64	1	1

Tableau 1.3 Concentration inhibitrice minimale de 3',4'-didésoxy-N-1-HABA-néomycine (1.58) sur diverses bactéries résistantes.

1.10 Conclusion

L'excellente activité du composé précédent met en lumière l'efficacité de la stratégie combinant la didésoxygénation et la chaîne latérale HABA sur la néomycine. Comme le montrent les résultats précédents, ce composé a une activité à large spectre sur des bactéries résistantes aux aminoglycosides actuellement utilisés en clinique. Le nombre important d'étapes nécessaires à sa synthèse, ainsi que le faible rendement global rendent impossible la réalisation de tests biologiques plus approfondis afin de confirmer les résultats observés *in vitro* rapportés dans le tableau précédent.

Chapitre 2

Synthèses d'hybrides de la néomycine et de la paromomycine

l'alcène **2.2**.⁸¹ Les conditions rapportées dans la publication originale ont été reproduites dans notre laboratoire, sans succès. Ce problème a été noté de façon similaire par Pakulski *et al.*⁸³ qui ont rapporté qu'une augmentation du nombre d'équivalents de réactifs et de la température de la réaction règle ce problème. De meilleurs rendements sont aussi obtenus en utilisant une modification des conditions réactionnelles originales. Garegg *et al.*⁸⁴ rapportent que l'utilisation de 2,4,5-triiodoimidazole à la place de l'iode bimoléculaire diminue le nombre de réactions secondaires en augmentant le rendement.

2.2 Didésoxygénation d'aminoglycosides 4,5-disubstitués

2.2.1 Tétradésoxygénation

La réaction de Garegg-Samuelsson a été appliquée avec succès à la paromomycine et à la néomycine.^{85, 86} Ces travaux ont été effectués en collaboration étroite avec le Dr. Justyna Gryzb, stagiaire postdoctorale présente dans le laboratoire du professeur Hanessian.

La paromomycine (voir Schéma 2.2) est d'abord traitée avec le chloroformate de benzyle pour protéger les amines avec un rendement de 91% pour obtenir l'intermédiaire **2.3**.⁷⁴ Les alcools primaires sont alors protégés sous forme d'ester de benzoyle ou d'éthers silylés avec des rendements moyens de 39% et de 69% respectivement **2.4 a-b**. Ces réactions doivent être effectuées à basse température, afin d'être sélectives envers les alcools primaires de la paromomycine. Les intermédiaires **2.4 a-b** protégés sont alors soumis aux conditions de désoxygénation de Garegg-Samuelsson afin d'obtenir le produit tétradésoxygéné, **2.5 a-b**, avec un rendement moyen de 61%. Cette réaction s'avère être très sélective pour les diols de la molécule. Un sous-produit secondaire de la réaction (10% du rendement) est la formation d'un produit iodovinyl **2.9** (voir Schéma 2.3) qui a déjà été rapporté par Pakulski *et al.*⁸³ Les alcools sont déprotégés soit dans des conditions basiques ou en exposant le composé aux ions fluorures pour obtenir **2.6** avec d'excellents rendements (79% et 81% respectivement). Les carbamates de benzyle sont déprotégés en même temps que les liaisons doubles sont hydrogénées en condition acide pour isoler avec un rendement de 91% le 3',4',3''',4'''-tétradésoxy-paromomycine (**2.7**). Un rendement global de 25% est obtenu pour la synthèse de ce nouveau composé. Une séquence similaire peut être utilisée afin d'obtenir la 3',4',3''',4'''-tétradésoxy-néomycine (**2.13**). Les amines sont d'abord protégées sous formes de carbamates de benzyle (**2.10**)

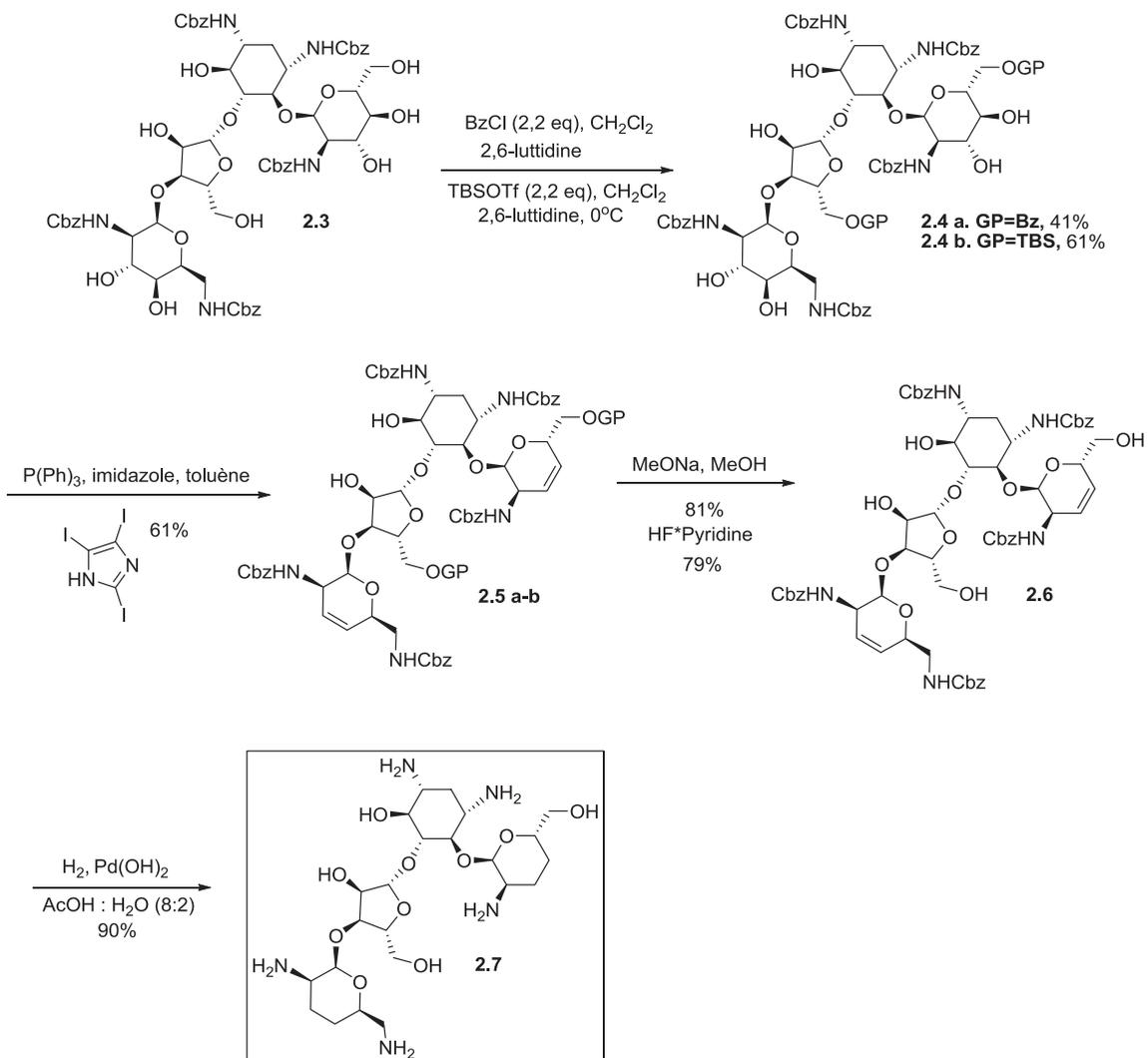


Schéma 2.2 Synthèse de la 3', 4', 3''', 4''''-tétradésoxy-paromomycine (**2.7**)

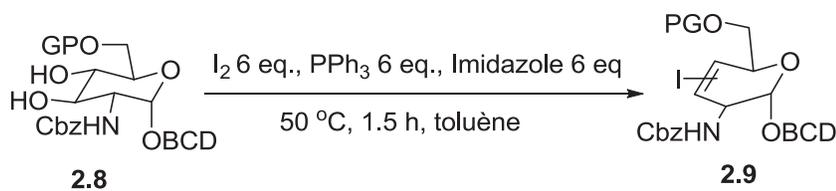


Schéma 2.3 Formation d'un sous-produit (**2.9**) lors de la réaction de Garegg-Samuëlsson

tel que rapporté précédemment par Hanessian *et al.*⁷⁴ L'alcool primaire est protégé sous forme d'éther de trityle avec un rendement de 79%, pour obtenir **2.11**. Les conditions de tétradésoxygénation de Garegg-Samuelsson sont ensuite utilisées pour convertir les deux diols en alcène avec un rendement de 69%. Une déprotection globale est ensuite effectuée en soumettant le composé **2.12** à des conditions d'hydrogénation catalytique dans de l'acide chlorhydrique dilué. Les alcènes sont aussi hydrogénés dans ces conditions pour obtenir 3',4',3''',4'''-tétradésoxy-néomycine (**2.13**) avec un rendement de 90% et avec un rendement global de 26% et ce, en 4 étapes à partir de la néomycine.

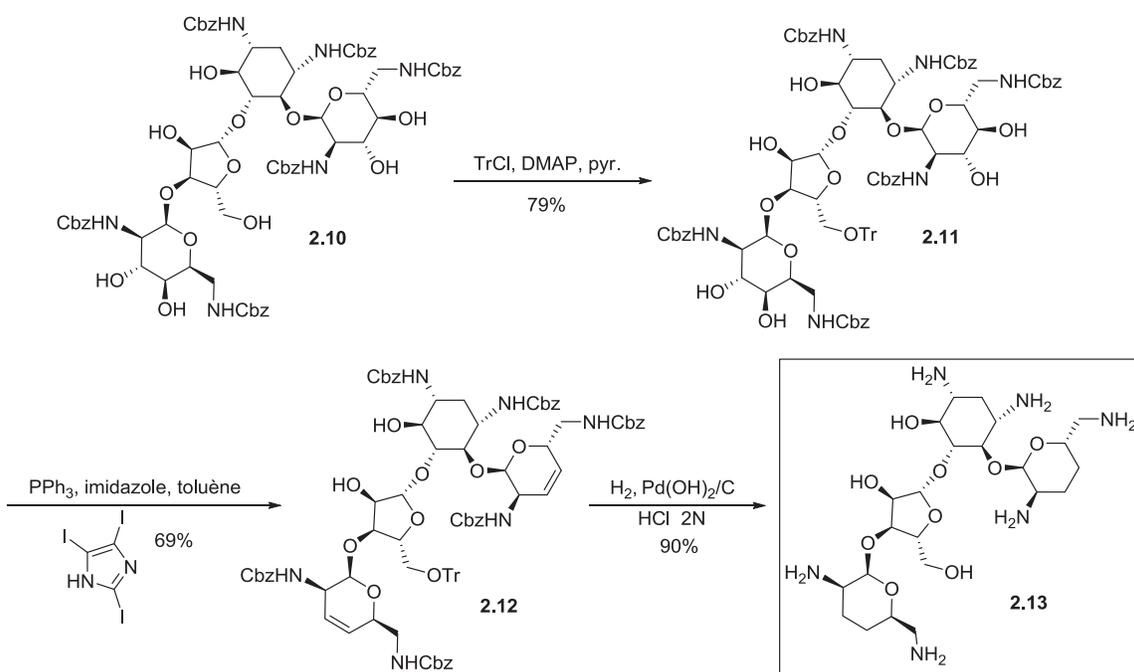


Schéma 2.4 Synthèse de la 3', 4', 3''', 4'''-tétradésoxy-néomycine (**2.13**)

2.2.3 Didéhydroxygénation

Afin d'obtenir le 3',4'-didéhydro-néomycine, il faut empêcher le diol du cycle D de réagir dans les conditions de désoxygénation. Pour ce faire, il est nécessaire de protéger le diol du cycle D (afin de le rendre inerte aux conditions de Garegg-Samuelsson). Hanessian *et al.*⁸⁷ ont montré qu'il était possible de former deux benzylidènes à 6 chaînons sur la paromomycine et la néomycine, soit entre (*O* ou *N*)6' et *O*-4' et *N*-6''' et *O*-4'''. En condition acide, le benzylidène sur le cycle A s'hydrolyse sélectivement avec un

rendement de 79% sans toucher à celui du cycle D. On ne peut cependant utiliser ce groupement protecteur pour obtenir la version saturée de la liaison double, car il a besoin pour être déprotégé de conditions d'hydrogénation catalytique en milieu acide. Ces conditions réduiraient la liaison double que nous désirons conserver afin d'obtenir le 3',4'-didéhydro-néomycine. Une réduction dans les conditions de Birch devrait réduire les carbamates de benzyles tout en conservant l'alcène sur le cycle A. On doit donc exclure l'utilisation du benzylidène pour protéger le diol du cycle D, car sa déprotection nécessite une hydrogénation catalytique en milieu acide.

De nombreux précédents existent déjà dans la littérature quant à l'utilisation des carbamates cycliques formés à partir d'une amine protégée sous forme de carbamate (Cbz, Boc, Cbe) et d'un alcool adjacent.⁸⁹ Il y a cependant peu d'exemples d'utilisations des carbamates cycliques sur la paromomycine et la néomycine. Hanessian *et al.* ont démontré qu'en conditions basiques aqueuses, il était possible de former un carbamate cyclique entre *N*-6''' et *O*-4''' *in situ*, puis de l'hydrolyser pour libérer sélectivement *N*-6''' (Schéma 2.5).⁹⁰ La formation sélective du carbamate cyclique à six chaînons sur le cycle D, sans hydrolyse, permet d'isoler le diol du cycle A, qui pourra ainsi réagir sélectivement aux conditions de didésoxygénation de Garegg-Samuelsson.

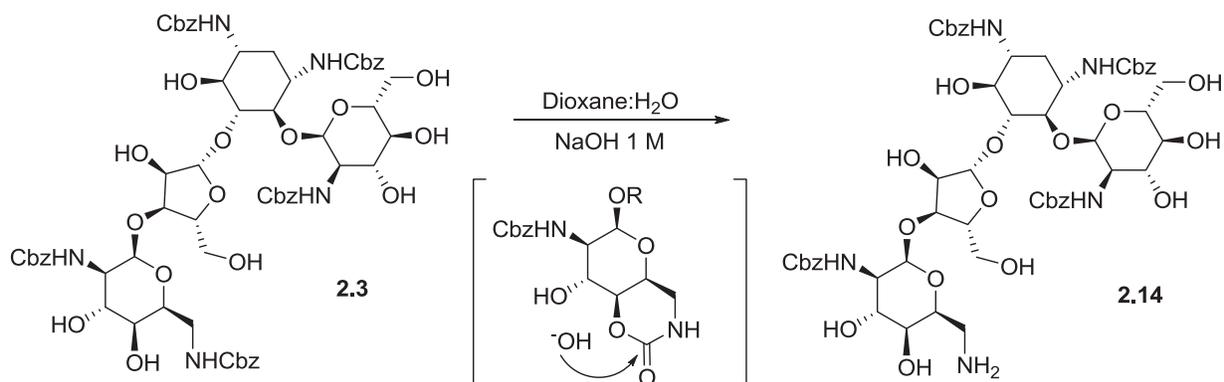


Schéma 2.5 Hydrolyse du carbamate cyclique formé à partir du carbamate de benzyle en *N*-6'''⁹⁰

Une synthèse utilisant un carbamate cyclique comme groupe protecteur peut être effectuée avec la néomycine (Schéma 2.6) pour isoler le nouveau composé 3',4'-didéhydro-néomycine (**2.18**). L'alcool primaire de l'intermédiaire **2.10** est d'abord

protégé sous forme d'éther tritylique avec un rendement de 79% pour obtenir **2.11**. Ce composé est alors soumis aux conditions basiques anhydres afin d'obtenir le carbamate cyclique sur le cycle D. Il y a ici un problème de sélectivité, car la néomycine possède deux carbamates à 6 chaînons pouvant se former, un sur le cycle A et l'autre sur le cycle D. Un mélange des deux produits contenant un carbamate est isolé lorsqu'on traite la 5''-*O*-trityl-hexa-*N*-Cbz-néomycine (**2.11**) avec un équivalent d'une base forte (KHMDS)

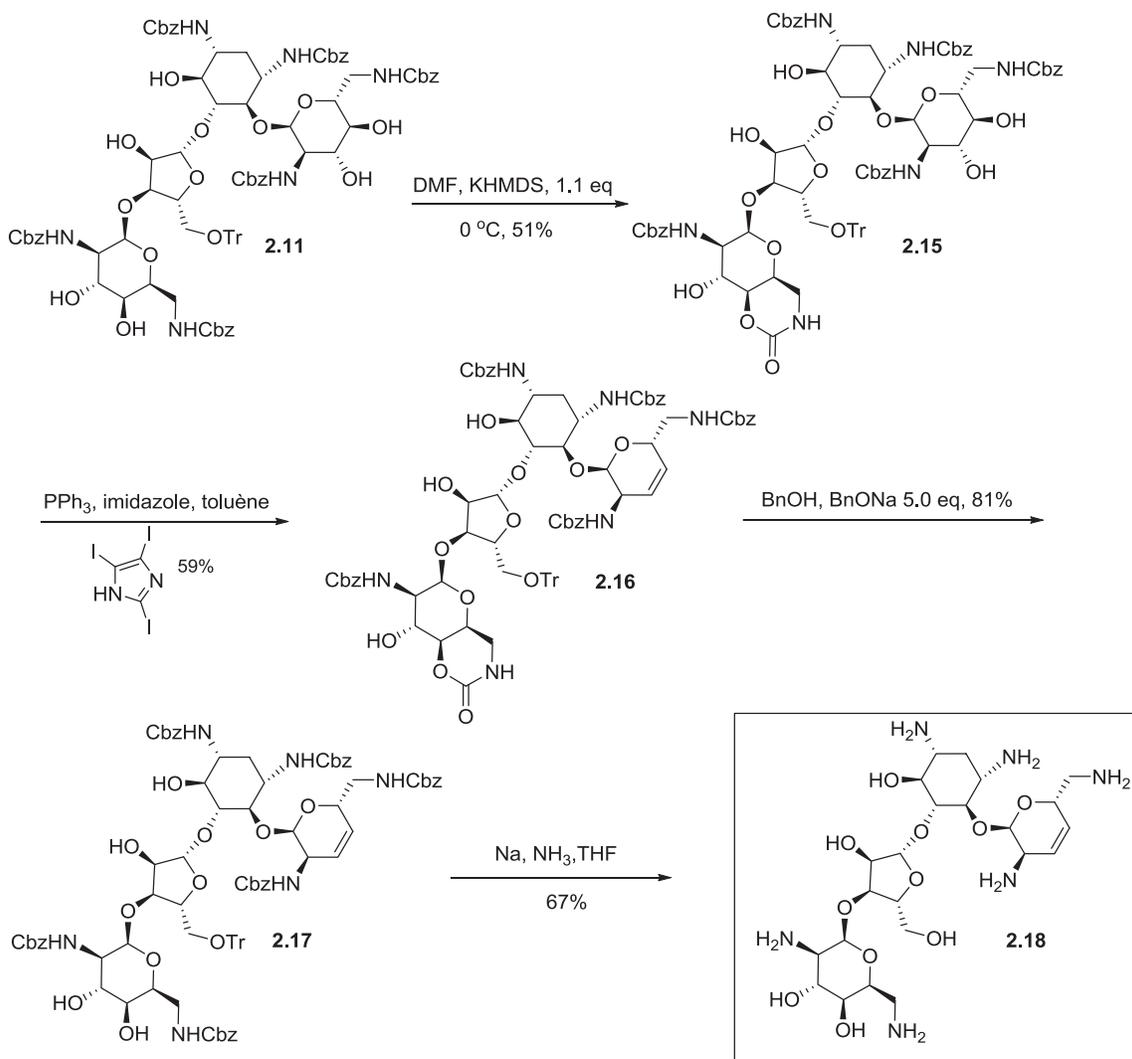


Schéma 2.6 Synthèse de 3',4'-didéhydro-néomycine (**2.18**)

pendant 8 heures à 0°C dans un solvant polaire aprotique (DMF). Il est possible de séparer les deux produits sur gel de silice pour obtenir le produit (**2.15**) dans un

rendement moyen de 51%. Il est à noter que les deux carbamates sont difficilement séparables sur gel de silice. Plusieurs purifications successives seront nécessaires afin d'isoler un produit suffisamment pur. L'emplacement exact du carbamate a été confirmé par l'analyse des fragments obtenus par spectrométrie de masse (voir annexe). Le diol ainsi isolé est soumis aux conditions de Garegg-Samuelson pour obtenir l'alcène avec un rendement moyen de 59%. Le carbamate cyclique est alors retransformé en carbamate benzylique dans un bon rendement de 84%. Une déprotection globale est effectuée dans les conditions de Birch pour obtenir le 3',4'-didéhydro-néomycine (**2.18**) dans un rendement de 67%. On obtient le produit avec un rendement global de 15% et ce en 6 étapes.

L'approche utilisant les conditions de Garegg-Samuelsson pour désoxygéner les aminoglycosides de la famille 4,5-substitués s'avère être la plus performante en terme d'étapes et de rendement à ce jour. Elle surclasse facilement la réaction Tipson-Cohen classique et l'approche de Chang qui nécessitent de nombreuses étapes de protections et de déprotections.⁹¹

2.2.3 Installation de la chaîne latérale HABA sur des intermédiaires didésoxygénés

Les travaux précédents de Umezawa, Chang et ceux de notre groupe (composé **1.58**) ont clairement démontré l'efficacité de combiner la didésoxygénation avec le groupement HABA en *N*-1. Nous avons donc décidé de combiner la tétradésoxygénation et la didéhydrogénation des alcools à la chaîne latérale HABA. Pour introduire la chaîne latérale, nous tirons profit d'un carbamate cyclique à 5 chaînons sur le cycle B pour isoler sélectivement l'amine devant être acylée.

Pour la paromomycine (Schéma 2.7), la synthèse commence à partir de l'intermédiaire **2.6**, qui est exposé à des conditions basiques aqueuses pour former le carbamate cyclique à 5 chaînons entre *O*-6 et *N*-1 et est hydrolysé *in-situ* afin de libérer l'amine en *N*-1. Il n'y a pas ici de problème de régiosélectivité, car les autres amines n'ont plus d'hydroxyle en position α . L'amine ainsi générée est utilisée sans purification dans un couplage peptidique avec l'acide (*S*)-4-amino-2-hydroxybutanoïque pour générer l'amide correspondant. L'amine acylée, **2.19**, est alors isolée avec un rendement de 42% pour deux étapes. Les amines et les liaisons doubles vont par la suite réagir sous conditions

d'hydrogénation catalytique au palladium pour former le nouveau produit, 3',4',3''',4'''-tétradésoxy-*N*-1-HABA-paromomycine, **2.20**, avec un rendement de 66%.

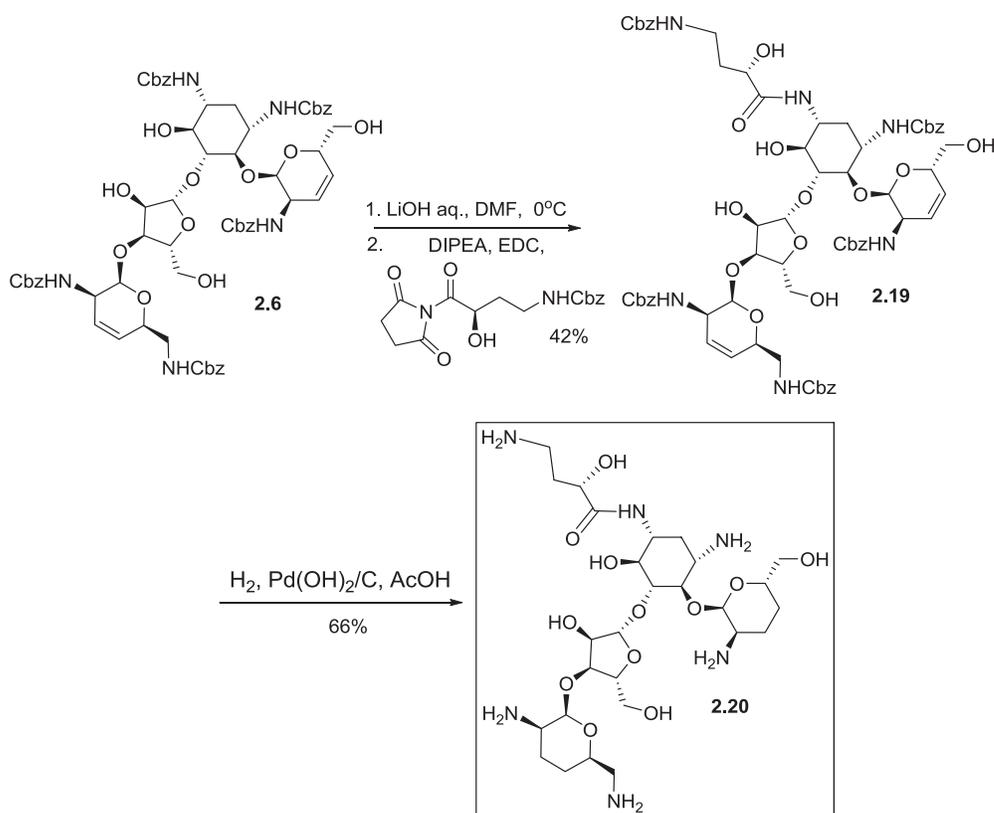


Schéma 2.7 Synthèse de 3',4',3''',4'''-tétradésoxy-*N*-1-HABA-paromomycine (**2.20**)

Une approche similaire peut être utilisée avec la néomycine, à partir de l'intermédiaire **2.12** (Schéma 2.8). Celui-ci est traité dans des conditions basiques aqueuses pour former le carbamate cyclique et l'hydrolyser *in-situ* dans un rendement de 61%. Cet intermédiaire est par la suite acyclé avec le groupement HABA avec un rendement de 81%. L'éther de trityle et les carbamates benzyliques sont alors hydrogénés en conditions acides pour obtenir **2.23** dans un rendement de 88%. Ce nouveau composé de type arbekacine/butirosine est synthétisé dans un excellent rendement global de 25% en neuf étapes seulement.

Finalement, le composé 3',4'-didéhydro-*N*-1-HABA-néomycine (**2.26**) est préparé à partir de l'intermédiaire **2.16** (Schéma 2.9). L'amine est isolée en formant de façon

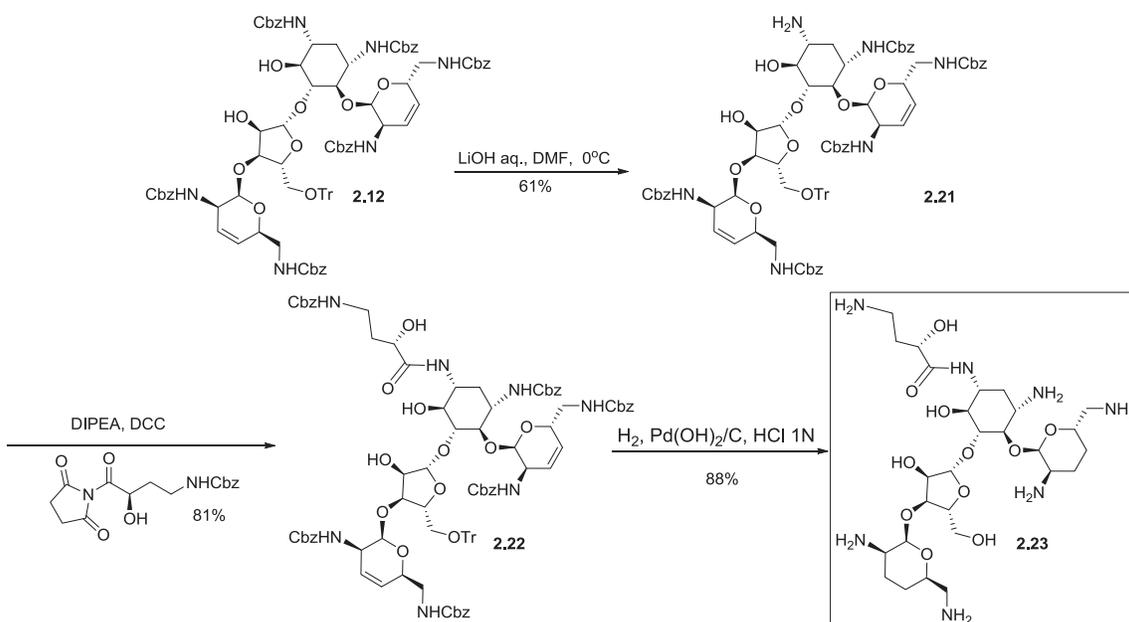


Schéma 2.8 Synthèse de 3',4',3''',4''-tétradésoxy-*N*-1-HABA-néomycine (**2.23**)

régiosélective un carbamate sur le cycle B dans un rendement de 61%. Le carbamate à cinq chaînons est ensuite hydrolysé en présence de celui à six chaînons, afin d'effectuer le couplage peptidique en position *N*-1 dans un rendement de 44% sur deux étapes. Le

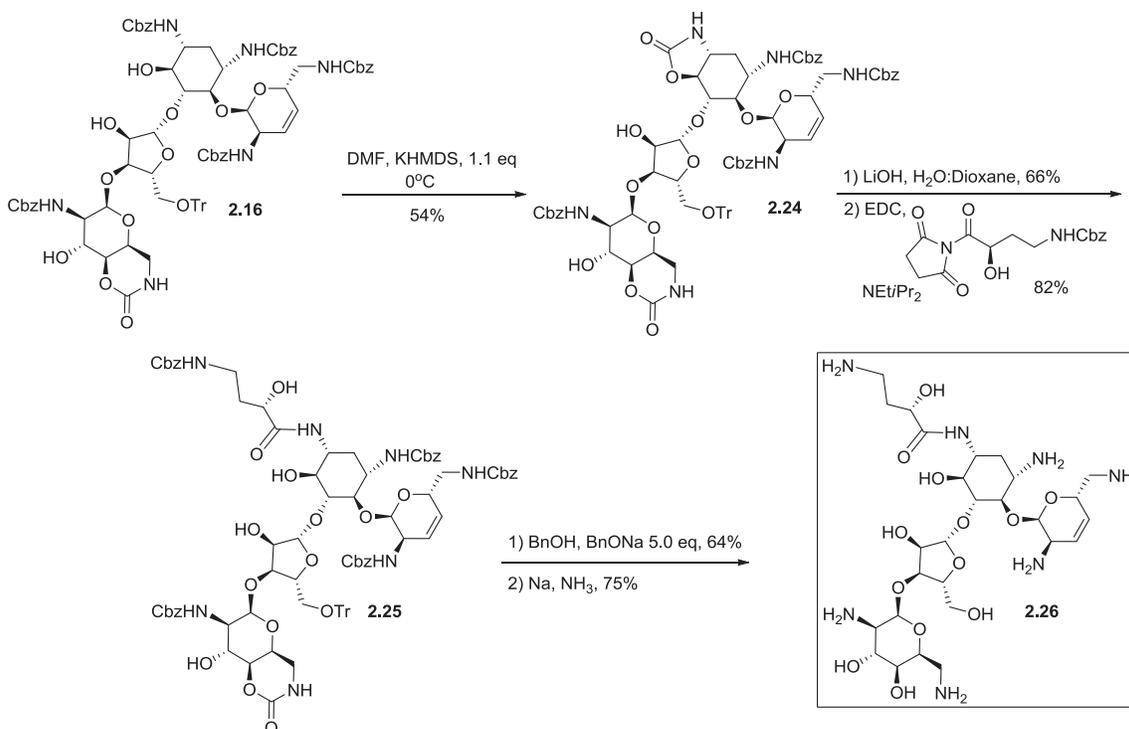


Schéma 2.9 Synthèse de la 3',4'-didéhydro-*N*-1-HABA-néomycine (**2.26**)

carbamate à 6 chaînons est beaucoup plus résistant à l'hydrolyse basique et c'est cette caractéristique qui permet l'hydrolyse sélective du carbamate sur le cycle B. La position du carbamate hydrolysé a été déterminée par spectrométrie de masse (MS/MS) (voir annexe). On déprotège le carbamate cyclique à six chaînons en l'exposant à plusieurs équivalents d'alcoolate de benzyle dans l'alcool benzylique pour isoler le produit avec un rendement de 61%. On déprotège finalement tous les carbamates benzyliques et le trityle en position *O*-5'' par une réduction de Birch pour obtenir le produit final 3',4'-didéhydro-*N*-1-HABA-néomycine (**2.26**) avec un rendement de 75%.

2.2.4 Activité antibactérienne *in vitro* des analogues désoxygénés avec ou sans chaîne HABA⁹²

Comme le démontre le Tableau 2.1, on peut facilement constater la grande différence d'activité entre les analogues de la paromomycine et de la néomycine. La tétradésoxygénation semble protéger la néomycine, mais pas la paromomycine contre l'APH 3'a et l'ANT 4' (Tableau 2.1). La néomycine est active contre des bactéries résistantes, tandis que la paromomycine ne semble bénéficier d'aucune protection relative à la tétradésoxygénation. La combinaison d'HABA aux analogues de la néomycine vient produire des analogues extrêmement actifs contre des bactéries résistantes à l'amikacine et au complexe des gentamicines (Tableau 2.4). La paromomycine démontre encore une fois une activité inférieure aux hybrides de la néomycine. On peut noter que les analogues **2.13** et **2.26** ne sont affectés que légèrement par l'AAC 6' et ce à un niveau inférieur à la néomycine. L'activité antimicrobienne est largement supérieure à l'activité observée pour les aminoglycosides utilisés en clinique (*e.g.* amikacine, gentamicine). La désoxygénation et l'installation du groupement HABA est donc une stratégie efficace pour restaurer l'activité de la néomycine contre des souches multi-résistantes aux antibiotiques.

Bactérie	Code	Type	amk. (1.27) (µg/ml)	gen. (1.14- 1.17) (µg/ml)	néo. B (1.3) (µg/ml)	2.7	2.13
<i>S. aureus</i>	ASAU001	ATCC 29213 (QC)	2	1	1	2	1
<i>E. coli</i>	AECO001	ATCC 25922 (QC)	2	0,5	2	ND	0,5
<i>K. pneumoniae</i>	AKPN002	ATCC 10031	0,5	0,25	0,5	ND	1
<i>P. aeruginosa</i>	APAE001	ATCC 27853 (QC)	1	0,5	32	ND	1
<i>P. aeruginosa</i>	APAE002	Pompe à efflux	2	2	8	ND	1
<i>A. baumannii</i>	AABA106 5	Souche sensible	4	2	2	ND	0,5
<i>P. aeruginosa</i>	APAE010	MexXY up	2	2	16	ND	1
<i>A. baumannii</i>	AABA001	ATCC 19606	16	16	8	ND	4
<i>Providencia stuartii</i>	APST001	AAC(2')-I	4	64	64	ND	16
<i>E. coli</i>	AECO056	APH(3')-Ib	0,5	0,5	64	ND	0,5
<i>Acinetobacter spp.</i>	AASP004	APH(3')-VI	>64	1	32	ND	1
<i>S. aureus</i>	ASAU003	ANT(4')-I	64	0,5	>64	4	2
<i>P. aeruginosa</i>	APAE037	ANT(4')-II	32	2	8	ND	1
<i>E. coli</i>	AECO037	ANT(2'')-I	4	64	2	ND	2
<i>S. aureus</i>	ASAU008	APH(2'')+AAC(6')	64	>64	>64	32	16
<i>P. aeruginosa</i>	APAE040	AAC(3)-I	4	32	8	ND	2
<i>E. coli</i>	AECO045	ArmA	>64	>64	1	ND	1

Tableau 2.1 Concentration inhibitrice minimale de 3',4',3'',4''-tétradésoxy-paromomycine (2.7) et de 3',4',3'',4''-tétradésoxy-néomycine (2.13) sur diverses bactéries résistantes.⁹²

Bactérie	Code	Type	amk. (1.27) (µg/ml)	gen. (1.14- 1.17) (µg/ml)	néo. B (1.4) (µg/ml)	2.18
<i>S. aureus</i>	ASAU001	ATCC 29213 (QC)	2	1	1	1
<i>E. coli</i>	AECO001	ATCC 25922 (QC)	2	0,5	2	0,5
<i>K. pneumoniae</i>	AKPN002	ATCC 10031	0,5	0,25	0,5	1
<i>P. aeruginosa</i>	APAE001	ATCC 27853 (QC)	1	0,5	32	1
<i>P. aeruginosa</i>	APAE002	Pompe à efflux	2	2	8	1
<i>A. baumannii</i>	AABA106 5	Souche sensible	4	2	2	0,5
<i>P. aeruginosa</i>	APAE010	MexXY up	2	2	16	1
<i>A. baumannii</i>	AABA001	ATCC 19606	16	16	8	4
<i>Providencia stuartii</i>	APST001	AAC(2')-I	4	64	64	16
<i>E. coli</i>	AECO056	APH(3')-Ib	0,5	0,5	64	0,5
<i>Acinetobacter spp.</i>	AASP004	APH(3')-VI	>64	1	32	1
<i>S. aureus</i>	ASAU003	ANT(4')-I	64	0,5	>64	2
<i>P. aeruginosa</i>	APAE037	ANT(4')-II	32	2	8	1
<i>E. coli</i>	AECO037	ANT(2'')-I	4	64	2	2
<i>S. aureus</i>	ASAU008	APH(2'')+AAC(6')	64	>64	>64	4
<i>P. aeruginosa</i>	APAE040	AAC(3)-I	4	32	8	2
<i>E. coli</i>	AECO045	ArmA	>64	>64	1	1

Tableau 2.2 Concentration inhibitrice minimale de 3',4'-didéhydro-néomycine (2.18) sur diverses bactéries résistantes.⁹²

Bactérie	Code	Type	amk. (1.27) (µg/ml)	gen. (1.14- 17) (µg/ml)	néo. B (1.3) (µg/ml)	2.20	2.23	2.26
<i>S. aureus</i>	ASAU001	ATCC 29213 (QC)	2	1	1	0,5	0,5	1
<i>E. coli</i>	AECO001	ATCC 25922 (QC)	2	0,5	2	ND	0,5	0,5
<i>K. pneumoniae</i>	AKPN002	ATCC 10031	0,5	0,25	0,5	ND	0,25	1
<i>P. aeruginosa</i>	APAE001	ATCC 27853 (QC)	1	0,5	32	ND	0,5	1
<i>P. aeruginosa</i>	APAE002	Pompe à efflux	2	2	8	ND	0,5	1
<i>A. baumannii</i>	AABA106 5	Souche sensible	4	2	2	ND	0,5	0,5
<i>P. aeruginosa</i>	APAE010	MexXY up	2	2	16	ND	1	1
<i>A. baumannii</i>	AABA001	ATCC 19606	16	16	8	ND	4	4
<i>Providencia stuartii</i>	APST001	AAC(2')-I	4	64	64	ND	16	16
<i>E. coli</i>	AECO056	APH(3')-Ib	0,5	0,5	64	ND	0,25	0,5
<i>Acinetobacter spp.</i>	AASP004	APH(3')-VI	>64	1	32	ND	0,5	1
<i>S. aureus</i>	ASAU003	ANT(4')-I	64	0,5	>64	0.5	1	2
<i>P. aeruginosa</i>	APAE037	ANT(4')-II	32	2	8	ND	1	1
<i>E. coli</i>	AECO037	ANT(2'')-I	4	64	2	ND	2	2
<i>S. aureus</i>	ASAU008	APH(2'')+AAC(6')	64	>64	>64	64	2	4
<i>P. aeruginosa</i>	APAE040	AAC(3)-I	4	32	8	ND	2	2
<i>E. coli</i>	AECO045	ArmA	>64	>64	1	ND	1	1

Tableau 2.3 Concentration inhibitrice minimale de 3',4',3''',4''-tétradésoxy-N-1-HABA-paromomycine (2.20), 3',4',3''',4''-tétradésoxy-N-1-HABA-néomycine (2.23) et de 3',4'-didéhydro-N-1-HABA-néomycine (2.26) sur diverses bactéries résistantes.⁹²

2.3 Toxicité

L'excellente activité des composés 3',4',3''',4'''-tétradésoxy-*N*-1-HABA-néomycine (**2.23**) et 3',4'-didéhydro-*N*-1-HABA-néomycine (**2.26**) font de ceux-ci de potentiels candidats pour les tests cliniques. Afin de déterminer la possibilité d'utiliser ces composés pour guérir d'éventuelles infections causées par des bactéries résistantes, il est nécessaire de déterminer leurs index thérapeutiques.

2.3.1 Relation structure-toxicité des aminoglycosides

La toxicité due aux aminoglycosides est un des obstacles majeurs qui empêche une utilisation plus large de cette famille d'antibiotiques. On rencontre de la néphrotoxicité dans près de 10 à 20% des cas de patients traités pendant plus de 14 jours aux aminoglycosides.¹⁷ La toxicité du complexe des gentamicines et de l'amikacine est actuellement considérée comme la limite acceptable pour une utilisation clinique. Notre nouveau composé se devra donc d'être aussi ou moins toxique que ceux mentionnés précédemment, si on désire l'utiliser dans un contexte clinique.

Le développement de modèles *in vitro* permettant de mesurer, de quantifier et de prédire la néphrotoxicité chez un humain est toujours un sujet de recherche important. La dose létale de nombreux aminoglycosides a été déterminée sur des souris albinos (tableau 2.4).⁹³ Il est à noter ici que les souris ne meurent pas par néphrotoxicité ou ototoxicité, mais plutôt par blocage neuro-musculaire. Il est généralement accepté que les composés ayant une LD₅₀ très élevée ont habituellement moins d'effets néphro et ototoxiques. On peut remarquer plusieurs tendances intéressantes en étudiant les chiffres du Tableau 2.4. D'abord, dans le groupe 1, on peut constater que l'introduction d'un groupement HABA semble diminuer la toxicité (néamine (**1.1**) vs néamine *N*-1-HABA (**1.4**)). On note aussi que la tétradésoxygénation semble doubler la toxicité de la néamine (néamine (**1.1**) vs 3',4',5,6-tétradésoxy-néomycine (**1.3**), alors qu'une mono-désoxygénation en 4' semble avoir très peu d'effet (butirosine A (**2.2**), vs 4'-désoxy-butirosine A (**2.3**)). Les composés du groupe 2 semblent confirmer la diminution de la toxicité lorsqu'on insère le groupement HABA en position *N*-1 (ribostamycine (**2.1**) vs butirosine A (**2.2**)).

Groupe	Entrée	Antibiotique	LD ₅₀ (mg/kg)
1	1.1	néamine	125
	1.2	4'-désoxynéamine	195
	1.3	3',4',5,6-tétradésoxynéamine	60
	1.4	N-1-HABA-néamine	260
	1.5	4'-désoxy-N-1-HABA-néamine	330
2	2.1	ribostamycine	260
	2.2	butirosine A	520
	2.3	4'-désoxybutirosine A	520
3	3.1	néomycine B	24
	3.2	néomycine C	44
	3.3	paromomycine I	160
	3.4	lividomycine B	140
	3.5	lividomycine A	280
4	4.1	kanamycine A	280
	4.2	kanamycine B	132
	4.3	kanamycine C	225
	4.4	tobramycine	79
	4.5	3',4'-didésoxy-kanamycine B	71
	4.6	gentamicine C1	88
	4.7	gentamicine C1a	70
	4.8	gentamicine C2	70
	4.9	amikacine	300

Tableau 2.4 LD₅₀ pour divers aminoglycosides adapté de Fujisawa *et al.*⁹³

Lorsqu'on compare la paromomycine (**3.3**) à la néomycine (**3.1**), on constate que le fait d'avoir une amine chargée de plus en 6', augmente significativement la toxicité du composé. Cet effet de charge peut aussi être observé dans le groupe 4 entre la kanamycine B (**4.2**) et la kanamycine C (**4.3**) qui s'avère beaucoup moins toxique. Une

didésoxygénation sur le cycle A semble aussi augmenter significativement la toxicité (dibékacine (4.5) vs kanamycine A (4.1)). On constate une augmentation de la toxicité lorsqu'on retire l'hydroxyle en 3'. Par exemple kanamycine B (4.2) est bien moins toxique que la tobramycine (4.4) qui n'a pas d'oxygène en 3'. Ces résultats mettent en relief deux effets importants. D'abord, les aminoglycosides ayant plus d'amines chargées positivement sont plus toxiques (par exemple néomycine vs paromomycine). Puis, plus une amine est basique (pKa élevé), plus le composé est toxique (par exemple kanamycine B vs tobramycine).

La famille des inosamycines a été découverte à la fin des années 1980. Ces composés très similaires à la néomycine ne possèdent pas d'amine en position 2, ils ont à la place un groupement hydroxyle. Il a été mesuré que la inosamycine B est trois fois moins toxique que la néomycine.⁹⁴ Ce résultat est en accord avec l'hypothèse voulant que plus un aminoglycoside possède d'amines chargées positivement, plus il est toxique. Plusieurs analogues semi-synthétiques ont été préparés pour tenter de relier le problème de la toxicité au pKa de certaines amines. Par exemple, des études récentes ont démontré que le pKa de l'amine en 2' corrèle avec la toxicité du composé. Baasov *et al.* ont synthétisé divers analogues de la néamine et de la gentamicine, notamment le composé **2.27** qui a été testé sur des souris afin de déterminer son LD₅₀ (Tableau 2.5).⁹⁵ Ils ont aussi déterminé par RMN de l'azote le pKa des amines. Dans le cas de l'amine en 2', il existe bel et bien une corrélation entre la basicité et la toxicité (Tableau 2.5). Les composés n'étant cependant pas actifs, l'auteur suggère que les modifications du cycle A empêcheraient une liaison efficace avec le site A du ribosome. Shitara *et al.* ont démontré

	LD ₅₀	CIM (μg/ml)	pKa 2'
néamine	161±5	384	6.02
2.27	303±10	96	9.30

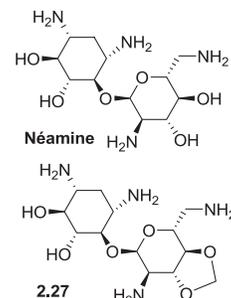


Tableau 2.5 Corrélation entre la LD₅₀ et le pKa de l'amine en 2' adaptée de Baasov *et al.*⁹⁵

qu'en introduisant un fluorure en position 5 de l'unité 2-désoxystreptamine, on diminue le pKa de l'amine en 3.⁹⁶ Ce changement de basicité a pour effet de diminuer la toxicité du composé de façon notable.⁹⁶ Ces observations vont dans le même sens que les observations effectuées par Baasov et Fujisawa.^{95,96}

2.3.2 Modèle *in vitro* pour évaluer la néphrotoxicité

Afin d'étudier la toxicité des aminoglycosides, plusieurs systèmes ont été développés au cours des années. La mégaline est une glycoprotéine importante en ce qui a trait à la néphrotoxicité et l'ototoxicité. Une preuve de cette importance est que les souris n'exprimant pas la mégaline ont démontré un très faible niveau d'accumulation de gentamicine dans les cellules rénales.⁹⁷ Des cellules rénales exprimant la mégaline de façon constante ont été le premier modèle cellulaire de toxicité des aminoglycosides.¹⁷ Les avantages d'un modèle cellulaire sont nombreux ; d'abord une plus faible quantité de matériel est nécessaire et ce sont des tests qui demandent bien moins de ressources que les tests *in vivo*. De plus, à l'inverse du LD₅₀, c'est la nécrose de la cellule rénale qui est étudiée et non la mort par blocage musculaire d'une souris (LD₅₀). Par exemple, Takamoto *et al.* ont développé une lignée de cellules rénales porcines, LLC-PK1 avec laquelle il a été possible, à partir d'observations microscopiques, d'établir une corrélation entre l'apparence des cellules lorsque traitées par des aminoglycosides et la toxicité de ceux-ci.⁹⁸ Cette méthode s'avère cependant très laborieuse et nécessite l'observation au microscope de toutes les cellules. Nos collaborateurs chez *Achaogen Inc.*, ont développé et breveté un modèle de criblage à haut débit *in vitro*.¹⁰⁰ Leur méthode utilise des lignées de cellules rénales humaines de type H2K. Cette méthode étudie indirectement l'apoptose en mesurant la luminescence d'une luciférase recombinante.¹⁰¹ La luminescence de la luciférase est proportionnelle à l'activité de l'enzyme caspase qui, elle, est impliquée directement dans l'apoptose cellulaire induite par les composés. Leur méthode a été validée en comparant la toxicité prédite par leur modèle avec la clairance en créatinine chez un rat soumis aux aminoglycosides. L'évaluation de la clairance en créatinine chez le rat est une méthode reconnue pour estimer les dommages subis aux reins. La lignée de cellules de type H2K corrèle donc très bien avec le modèle *in vivo* utilisé pour déterminer la néphrotoxicité des aminoglycosides.⁹⁹

2.3.3 Toxicité de 3',4',3'',4''-tétradésoxy-*N*-1-HABA-néomycine (2.23) et 3',4'-didésoxy-*N*-1-HABA-néomycine (2.26)

Des tests de toxicité effectués par nos collaborateurs chez *Achaogen Inc.*, ont montré que nos deux candidats (2.23 et 2.26) sont toxiques, ce qui réduit de façon importante leur index thérapeutique. La toxicité importante de ces composés s'explique assez facilement. De nombreuses désoxygénations ont augmenté le pKa de l'amine en 2' et 2''. Ces résultats biologiques sont en accord avec les tendances observées précédemment dans la littérature. Afin d'augmenter leur index thérapeutique, il est nécessaire d'abaisser significativement la toxicité tout en maintenant l'activité antimicrobienne de ces analogues.

2.4 Modulation de la toxicité en effectuant des modifications sur le cycle D

Étant donné que près de 75% des contacts avec le ribosome sont effectués par les cycles A et B, il a été décidé de ne pas modifier ces cycles afin de maintenir l'excellente activité observée chez nos candidats. Une étude attentive des structures rayons X (Figure 1.6) montre que le cycle D fait bien peu de contacts directs ou indirects avec le ribosome.¹⁰² Plusieurs aminoglycosides, notamment la butirosine A et la ribostamicine n'ont pas de cycle D et sont toujours actifs. Il a alors été décidé de modifier/substituer l'amine en 6'' afin d'abaisser son pKa et ainsi de diminuer la toxicité de l'aminoglycoside.

2.4.1 Synthèse de carbamate cyclique et linéaire en *N*-6''

Afin de confirmer l'importance de la basicité de l'amine en 6'' sur l'activité antimicrobienne, l'amine en 6'' a été transformée en carbamate cyclique et linéaire (voir Schéma 2.10). L'intermédiaire, 2.10, a été traité en condition basique anhydre pour obtenir le carbamate cyclique (2.30) sur le cycle D. On obtient le produit final par hydrogénation catalytique pour obtenir le produit final (2.31) dans un rendement de 94%. Pour obtenir le carbamate non cyclique, l'intermédiaire 2.10 a été exposé à une solution de méthanolate de sodium, afin d'ouvrir le carbamate cyclique avec un rendement de 78% pour obtenir le composé 2.28. Celui-ci a été hydrogéné dans des conditions d'hydrogénation catalytique pour isoler 6''-*N*-carbométhoxy-paromomycine (2.29) dans un rendement de 88%.¹⁰³

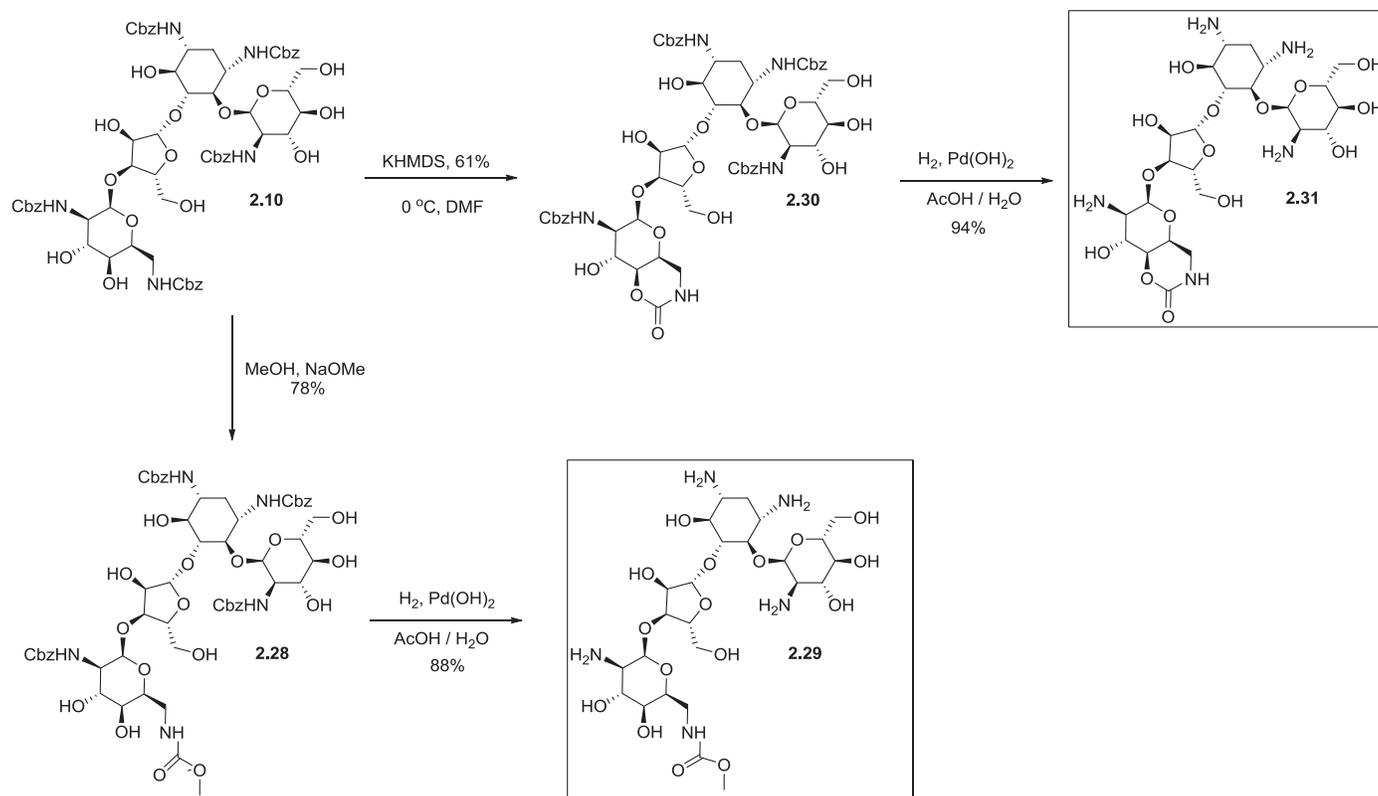


Schéma 2.10 Synthèse de 6'''-*N*-carbométhoxy-paromomycine (**2.29**) et de 6''', 4'''-*N,O*-carbonyl-paromomycine (**2.31**)

Comme anticipé, ces dérivés de la paromomycine sont moins toxiques sur les cellules H2K (Graphique 2.2) que le composé mère (paromomycine). À notre grande surprise, l'absence de basicité sur l'amine en *N*-6''' vient enlever toute activité antimicrobienne à ces composés. Ce manque d'activité ne peut être attribué à des problèmes de liaison au ribosome, car il y a, selon les rayons X, suffisamment d'espace pour accueillir les carbamates formés sans empêcher la liaison efficace des cycles A et B. De plus, des analogues précédemment testés par notre groupe ayant un groupement phénylaminé en 6''' ont montré une activité antimicrobienne *in vitro*.¹⁰⁵ Ceci laisse supposer qu'une substitution à cette position n'empêche pas la liaison efficace à la cible biologique. Ces résultats biologiques mettent en relief l'importance insoupçonnée de la basicité de cette amine sur l'activité de la paromomycine. Un problème de pénétration cellulaire peut peut-être expliquer l'absence d'activité des deux composés précédents, mais une telle affirmation nécessitera des études plus approfondies afin d'être confirmée.

Bactérie	Code	Type	Par. (1.4) (µg/ml)	(2.29) (µg/ml)	(2.31) (µg/ml)
<i>S. aureus</i>	ASAU001	ATCC 29213 (QC)	2	32	32
<i>E. coli</i>	AECO001	ATCC 25922 (QC)	4	>64	>64
<i>K. pneumoniae</i>	AKPN002	ATCC 10031	2	8	8
<i>P. aeruginosa</i>	APAE001	ATCC 27853 (QC)	>64	>64	>64
<i>P. aeruginosa</i>	APAE002	Pompe à efflux	>64	>64	>64
<i>A. baumannii</i>	AABA1065	Souche sensible	4	>64	>64
<i>P. aeruginosa</i>	APAE010	MexXY up	>64	>64	>64
<i>A. baumannii</i>	AABA001	ATCC 19606	16	>64	>64
<i>Providencia stuartii</i>	APST001	AAC(2')-I	>64	64	64
<i>E. coli</i>	AECO056	APH(3')-Ib	>64	>64	>64
<i>Acinetobacter spp.</i>	AASP004	APH(3')-VI	>64	>64	>64
<i>S. aureus</i>	ASAU003	ANT(4')-I	>64	>64	>64
<i>P. aeruginosa</i>	APAE037	ANT(4')-II	>64	>64	>64
<i>E. coli</i>	AECO037	ANT(2'')-I	4	32	32
<i>S. aureus</i>	ASAU008	APH(2'')+AAC(6')	>64	>64	>64
<i>P. aeruginosa</i>	APAE040	AAC(3)-I	>64	>64	>64
<i>E. coli</i>	AECO045	ArmA	4	>64	>64

Tableau 2.6 Concentration inhibitrice minimale 6'''-N-carbométhoxy-paromomycine (2.29) et de 6''',4'''-N,O-carbonyl-paromomycine (2.31) sur diverses bactéries résistantes.

2.4.2 Modulation du pKa de l'amine en 6'''

Les résultats précédents mettent en lumière l'importance de la basicité de l'amine en 6'''. Un fluor installé en β d'une amine peut diminuer le pKa de 1,7 et ce en raison de l'électronégativité de l'halogène. Comme le démontre la Figure 2.1, les fluors permettent de moduler le pKa d'une amine.¹⁰⁵ Un motif de substitution trifluorure, difluoro nous permettra d'explorer l'importance de la basicité de l'amine en 6''' (pKa de l'amine) sur l'activité antimicrobienne et sur la néphrotoxicité de la paromomycine et de la néomycine. Les groupements éthyle devraient être accommodés par le ribosome, car il y a beaucoup d'espace disponible si on se fie aux données rayons X obtenues par Ramankrishnan ou celles de Westhof (voir Figure 2.1).

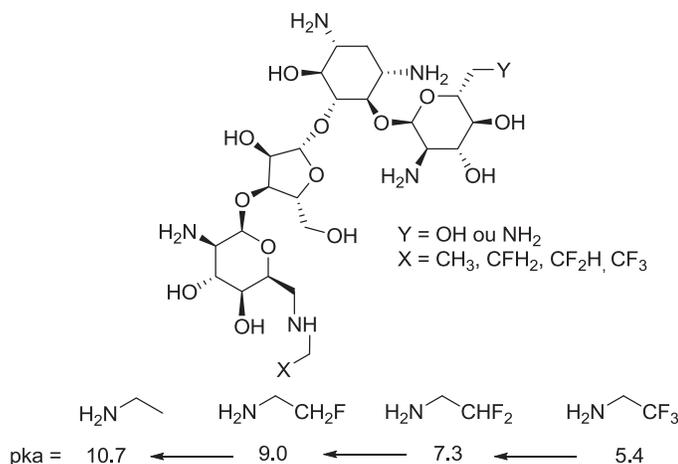


Figure 2.1 Modulation du pKa de l'amine en 6'''¹⁰⁵

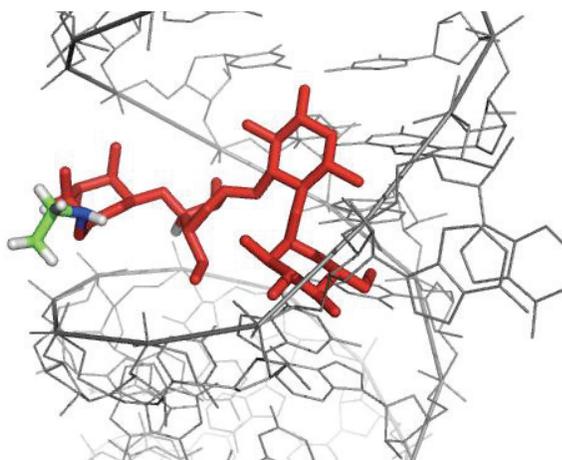


Figure 2.2 Paromomycine (rouge) liée au Site A du ribosome (le groupement éthyle (vert) est ajouté grâce à Pymol)

2.4.3 Synthèse de dérivés de la paromomycine modifiés en 6'''

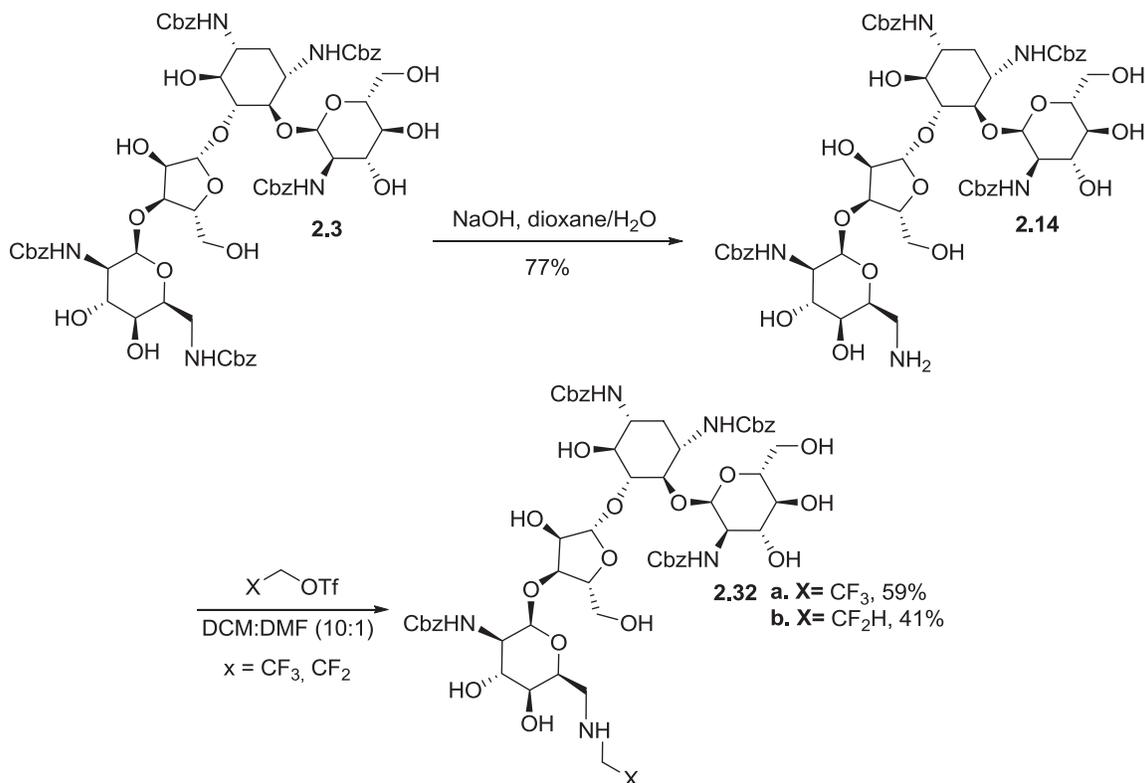


Schéma 2.11 Synthèse de 6'''-*N*-trifluoro-tétra-*N*-Cbz-paromomycine (**2.32 a**) et 6'''-*N*-difluoroéthyle-tétra-*N*-Cbz-paromomycine (**2.32 b**)

À partir de la penta-*N*-Cbz-paromomycine (**2.3**), l'amine en 6''' peut être isolée après un traitement basique aqueux (Schéma 2.5).⁹⁰ L'amine libre, **2.14**, est ensuite exposée aux différents triflates dans un solvant polaire aprotique pour être alkylée dans des rendements moyens (CF₃ = 59%, CF₂ = 41%) pour obtenir **2.32 a-b** (Schéma 2.11).¹⁰⁶

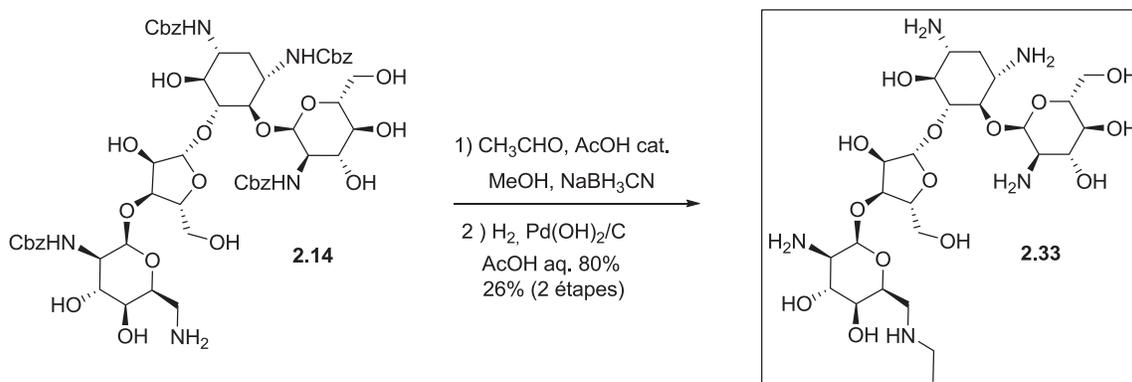


Schéma 2.12 Synthèse de 6'''-*N*-(éthyle)-paromomycine (**2.33**)

Il a été impossible d'obtenir l'analogue monofluoro éthyle à partir du triflate correspondant. Une amination réductrice sera effectuée pour obtenir la *N*-6'''-(éthyle)-paromomycine (Schéma 2.12). L'amine secondaire étant plus nucléophile que l'amine primaire, une grande proportion de produits bis alkylés est formé lors de l'amination réductrice. Ceci diminue de façon importante le rendement. Une hydrogénation catalytique et une purification du produit final sur gel de silice nous permettent d'isoler le 6'''-*N*-(éthyle)-paromomycine (**2.33**) dans un rendement de 26% en 2 étapes. Les produits finaux fluorés sont eux respectivement obtenus par hydrogénation catalytique sur palladium avec d'excellents rendements, de 92% et 95% pour obtenir respectivement **2.34 a** et **b** (Schéma 2.13) à partir de **2.32 a-b**.

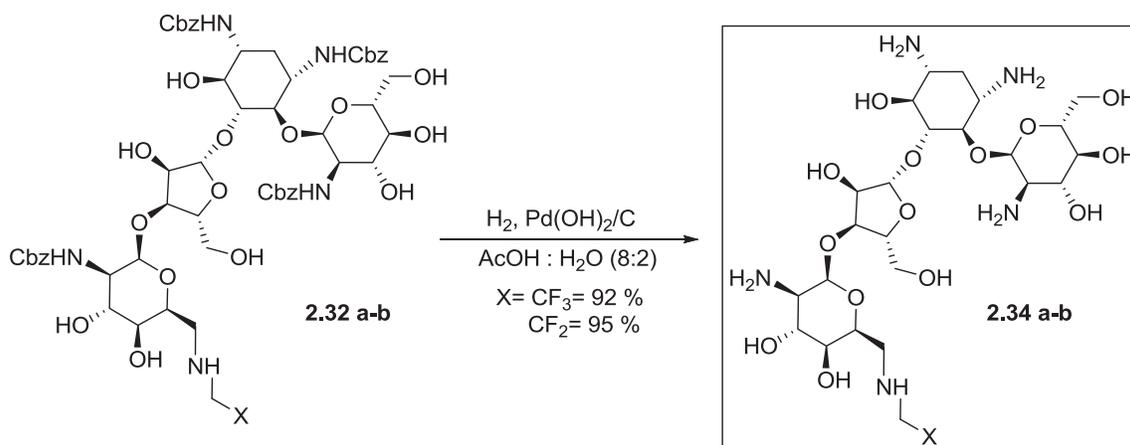


Schéma 2.13 Hydrogénation des analogues alkylés en *N*-6''' de la paromomycine (**2.34 a-b**)

2.4.4 Synthèse de dérivés de la néomycine modifiés en 6'''

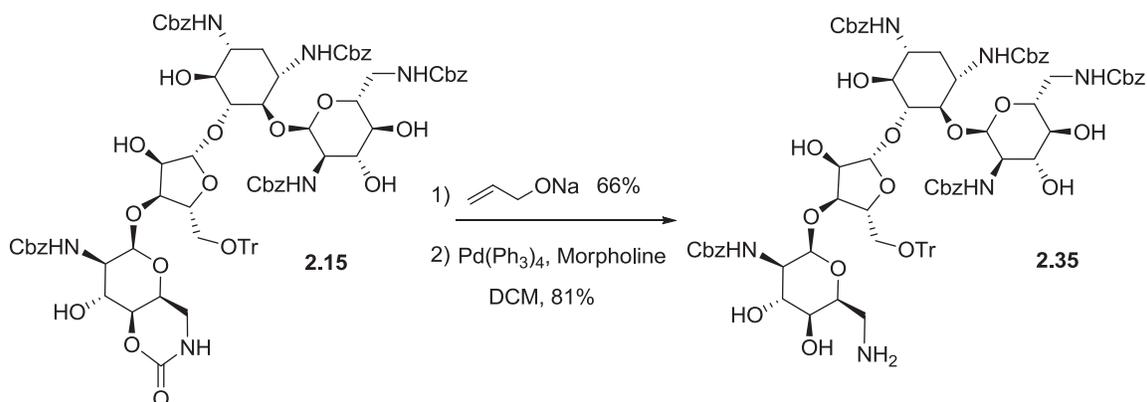


Schéma 2.14 Obtention de l'amine libre en 6''' sur la néomycine (**2.35**)

L'isolement de l'amine en 6''' chez la néomycine est beaucoup moins trivial que chez la paromomycine. L'utilisation de carbamate cyclique s'avère efficace pour isoler sélectivement l'amine en 6'''. À partir de l'intermédiaire **2.15** déjà utilisé dans la synthèse de 3',4'-didéhydro-néomycine, il est possible de protéger orthogonalement l'amine en 6''' sous forme d'un carbamate d'allyle. Le carbamate cyclique est ouvert sous l'effet

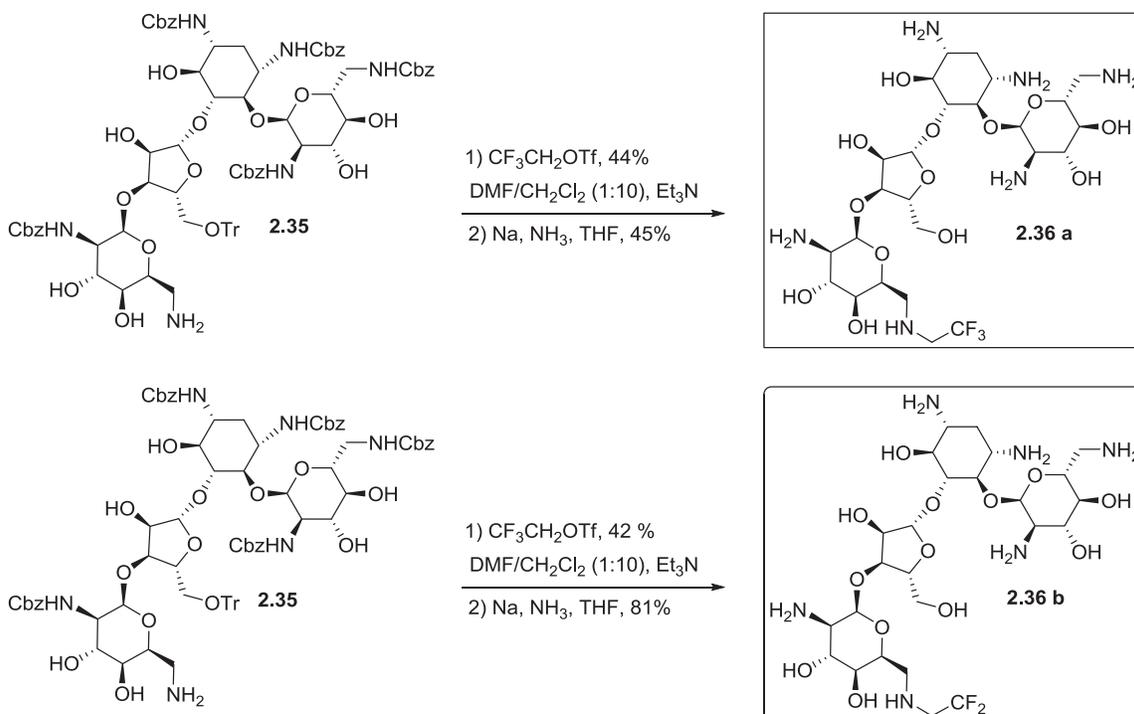


Schéma 2.15 Synthèse de 6'''-N-(2,2,2-trifluoroéthyle)-néomycine (**2.36 a**) et de 6'''-N-(2,2-difluoroéthyle)-néomycine (**2.36 b**)

d'un alcoolate d'allyle avec un rendement de 66%. Ce groupement protecteur, *Alloc*, peut ensuite être déprotégé à l'aide du trétrakis (triphénylphosphine) palladium pour fournir l'amine libre, **2.35**, avec un rendement de 81% (Schéma 2.14). L'amine libre (**2.35**) en 6''' est isolée en cinq étapes synthétiques à partir de la néomycine. Ce produit peut ensuite être alkylé de façon similaire à la paromomycine pour obtenir l'analogue trifluoroéthyle et difluoroéthyle dans des rendements respectifs de 44% et de 42% (**2.36 a-b**) (Schéma 2.15). Ils sont ensuite déprotégés dans des conditions de Birch pour enlever le trityle et les carbamates de benzyle dans des rendements modérés, 66% à 81%. L'analogue éthyle a été synthétisé de façon similaire à la paromomycine, c'est-à-dire *via* une amination réductrice suivie d'une réduction de Birch. L'analogue **2.37** est isolé avec un rendement de 21% pour deux étapes (Schéma 2.16).

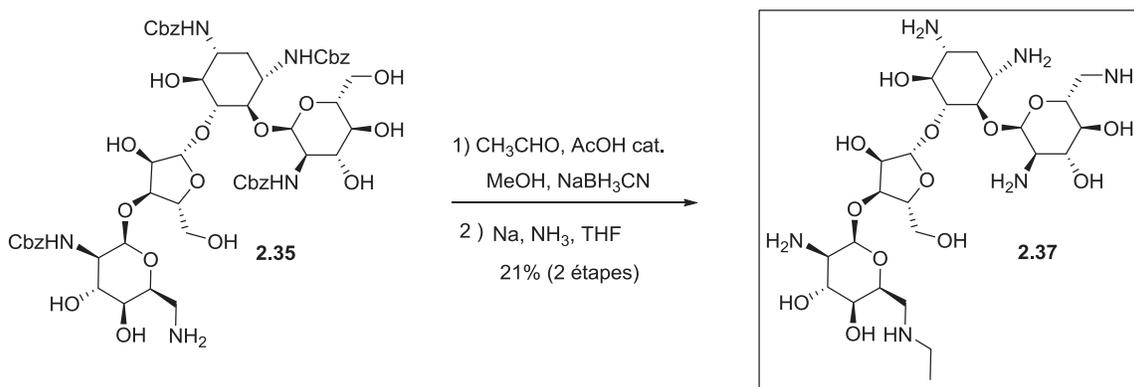


Schéma 2.16 Synthèse de 6'''-N-(éthyle)-néomycine (**2.37**)

2.4.5 Activité antimicrobienne *in vitro* et toxicité

Les résultats des activités antimicrobiennes sont très intéressants (tableau 2.7-2.8), car les composés ayant toujours un caractère basique sont presque aussi actifs que le composé de départ (par exemple 6'''-N-(éthyle)-paromomycine vs paromomycine, 6'''-N-(éthyle)-néomycine vs néomycine). Plus on diminue la basicité de l'amine, plus les composés sont inactifs (6'''-N-(2,2,2-trifluoroéthyle)-néomycine (**2.36a**) et de 6'''-N-(2,2-difluoroéthyle)-néomycine (**2.36b**). Ces effets sont moins prononcés dans la série néomycine, car celle-ci possède globalement une amine de plus qui semble compenser pour la désactivation de l'amine du cycle D. Il est difficile ici de déterminer quelles sont les raisons biologiques exactes de cette perte d'activité, cependant ceci vient démontrer l'importance de la

basicité de cette amine. Il n'a pas été possible d'effectuer à ce jour les tests de toxicité sur ces composés. On ne peut donc que spéculer sur l'effet de ces substitutions sur la toxicité des aminoglycosides alkylés en 6''.

Bactérie	Code	Type	Par. (1.4) (µg/ml)	Par.- CF ₃ (2.33a) (µg/ml)	Par.- CF ₂ H (2.33b) (µg/ml)	Par.- CH ₃ (2.34) (µg/ml)
<i>S. aureus</i>	ASAU001	ATCC 29213 (QC)	2	>64	>64	4
<i>E. coli</i>	AECO001	ATCC 25922 (QC)	2	>64	>64	8
<i>K. pneumoniae</i>	AKPN002	ATCC 10031	2	>64	>64	4
<i>P. aeruginosa</i>	APAE001	ATCC 27853 (QC)	>64	>64	>64	>64
<i>P. aeruginosa</i>	APAE002	Pompe à efflux	>64	>64	>64	>64
<i>A. baumannii</i>	AABA1065	Souche sensible	2	>64	>64	4
<i>P. aeruginosa</i>	APAE010	MexXY up	>64	>64	>64	>64
<i>A. baumannii</i>	AABA001	ATCC 19606	16	>64	>64	16
<i>Providencia stuartii</i>	APST001	AAC(2')-I	>64	64	64	>64
<i>E. coli</i>	AECO056	APH(3')-Ib	>64	>64	>64	>64
<i>Acinetobacter spp.</i>	AASP004	APH(3')-VI	>64	>64	>64	>64
<i>S. aureus</i>	ASAU003	ANT(4')-I	>64	>64	>64	>64
<i>P. aeruginosa</i>	APAE037	ANT(4')-II	>64	>64	>64	>64
<i>E. coli</i>	AECO037	ANT(2'')-I	8	>64	>64	8
<i>S. aureus</i>	ASAU008	APH(2'')+AAC(6')	>64	>64	>64	>64
<i>P. aeruginosa</i>	APAE040	AAC(3)-I	>64	>64	>64	>64
<i>E. coli</i>	AECO045	ArmA	4	>64	>64	16

Tableau 2.7 Concentration inhibitrice minimale de 6'''-N-(2,2,2-trifluoroéthyle)-paromomycine (2.33a), 6'''-N-(2,2-difluoroéthyle)-paromomycine (2.33b) et 6'''-N-(éthyle)-paromomycine (2.34) sur des diverses bactéries résistantes.⁹²

Bactérie	Code	Type	Neo. B (1.3) (µg/ml)	Neo.- CF ₃ (2.36 a) (µg/ml)	Neo.- CF ₂ H (2.36 b) (µg/ml)	Neo.- CH ₃ (2.37) (µg/ml)
<i>S. aureus</i>	ASAU001	ATCC 29213 (QC)	0,5	16	2	1
<i>E. coli</i>	AECO001	ATCC 25922 (QC)	1	8	2	1
<i>K. pneumoniae</i>	AKPN002	ATCC 10031	0,25	1	1	0,5
<i>P. aeruginosa</i>	APAE001	ATCC 27853 (QC)	>64	>64	>64	>64
<i>P. aeruginosa</i>	APAE002	Pompe à efflux	8	>64	>64	>16
<i>A. baumannii</i>	AABA1065	Souche sensible	1	4	1	0,5
<i>P. aeruginosa</i>	APAE010	MexXY up	16	>64	>64	>64
<i>A. baumannii</i>	AABA001	ATCC 19606	4	>64	>64	16
<i>Providencia stuartii</i>	APST001	AAC(2')-I	32	64	64	>64
<i>E. coli</i>	AECO056	APH(3')-Ib	>64	>64	>64	>64
<i>Acinetobacter spp.</i>	AASP004	APH(3')-VI	16	>64	>64	>64
<i>S. aureus</i>	ASAU003	ANT(4')-I	>64	>64	>64	>64
<i>P. aeruginosa</i>	APAE037	ANT(4')-II	8	>64	>64	>64
<i>E. coli</i>	AECO037	ANT(2'')-I	2	8	4	2
<i>S. aureus</i>	ASAU008	APH(2'') + AAC(6')	>64	>64	>64	>64
<i>P. aeruginosa</i>	APAE040	AAC(3)-I	8	>64	>64	4
<i>E. coli</i>	AECO045	ArmA	1	>16	4	1

Tableau 2.8 Concentration inhibitrice minimale de 6'''-N-(2,2,2-trifluoroéthyle)-paromomycine (2.36a), 6'''-N-(2,2-difluoroéthyle)-paromomycine (2.36b) et 6'''-N-(éthyle)-néomycine (2.37) sur des diverses bactéries résistantes.⁹²

2.5 Conclusion

L'application de la didésoxygénation *via* la méthode de Garegg-Samuelsson s'avère être extrêmement efficace pour didésoxygéner les aminoglycosides de la famille des 4,5-substitués, tel que la paromomycine et la néomycine. Cette transformation a été effectuée avec un rendement moyen d'environ 60% en une étape sur la paromomycine et la néomycine. Des aminoglycosides partiellement protégés ont été soumis à ces conditions avec succès. Le rendement global obtenu pour la didésoxygénation dépasse largement les précédents de la littérature. Cette réaction a permis de produire des analogues tétradésoxygénés et didésoxygénés de façon efficace. Une chaîne latérale HABA a été installée *via* un carbamate cyclique pour produire des analogues de la néomycine extrêmement actifs contre des bactéries résistantes aux aminoglycosides aujourd'hui utilisés en clinique. Ces composés se sont cependant avérés être largement plus toxiques sur les cellules rénales.

Afin d'abaisser la toxicité des aminoglycosides, la position 6''' de la paromomycine et de la néomycine a été modifiée. L'importance de la basicité de l'amine en 6''' a été démontrée par l'absence d'activité des analogues **2.29** et **2.31**. Le lien important entre la basicité et l'activité a été démontré avec éloquence avec les analogues alkylés en 6'''. L'activité des composés ayant toujours une basicité en 6''' (par exemple 6'''-*N*-(éthyle)-paromomycine *vs* 6'''-*N*-(2,2,2-trifluoroéthyle)-paromomycine) démontre bien l'importance fondamentale de la basicité en *N*-6''' sur l'activité. Des études supplémentaires de toxicité sur des cellules H2K devront être effectuées avec les composés alkylés en *N*-6'''. Il serait ensuite intéressant d'ajouter ces groupements sur des aminoglycosides très actifs (3',4',3''',4'''-tétradésoxy-*N*-1-HABA-néomycine (**2.23**) et sur 3',4'-didéhydro-*N*-1-HABA-néomycine (**2.26**)), mais cependant trop toxiques afin d'augmenter leur index thérapeutique.

Chapitre 3

Partie expérimentale

3.1 Procédures Générales

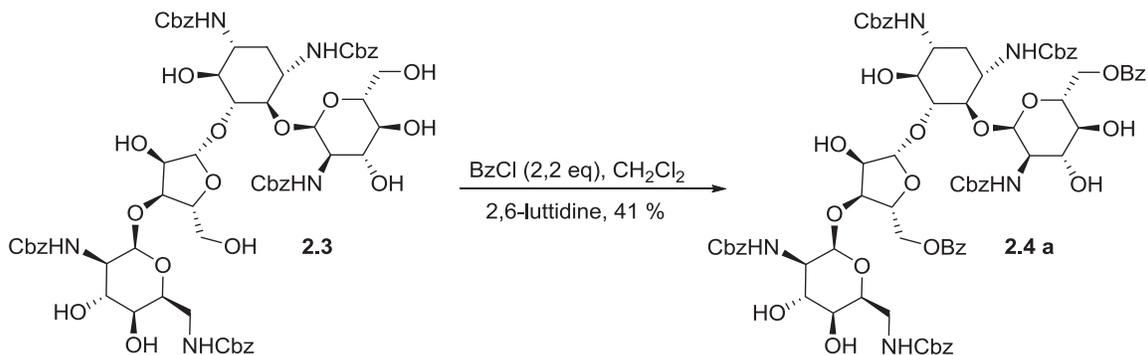
Toutes les réactions ont été effectuées sous un atmosphère inerte d'argon en utilisant des solvants anhydres. Le tétrahydrofurane (THF) et le dichlorométhane (DCM) ont été obtenus d'un système de solvant (SDS). Les réactifs ont été achetés et utilisés sans purification supplémentaire auprès de Sigma Aldrich Inc. Les chromatographies sur gel de silice ont été effectuées avec une silice de type *SilicaFlash P60*, 40-63 μm , 230-400 mesh. Les éluants soit le dichlorométhane, l'hexane et l'acétate d'éthyle ont été distillés sur CaH_2 . Les aminoglycosides déprotégés ont été purifiés avec un système composé de chloroforme, de méthanol et d'ammoniac aqueux. Les réactions ont été suivies par spectroscopie de masse, sur un appareil de type Thermo Finnigan Surveyor MSQ et par CCM de type Merck silica precoated plates (60F-254). Les CCM ont été visualisées à l'aide d'une lampe UV et avec le révélateur CAM (molybdate d'ammonium/sulfate de cérium). Les spectres RMN ont été acquis sur des appareils de type Bruker, AMX 300, ARX-400, AV-400 ou AV-700. Les spectres de masses haute résolution (HRMS) ont été obtenus sur un appareil de type Agilent Technologies LC-MSD TOF avec une ionisation positive. L'activité optique des composés a été mesurée avec un polarimètre de type Perkin-Elmer 343 à température ambiante.

3.2 Liste des composés

<u>6',5''-O-Bis-benzoate-penta-N-Cbz-paromomycine (2.4a)</u>	p.71
<u>6',5''-O-Bis-(tert-butyldiméthylsilyle)-penta-N-Cbz-paromomycine (2.4b).....</u>	p.72
<u>6',5''-O-Bis-benzoate-3',4', 3''', 4''''-tétradéhydro-penta-N-Cbz-paromomycine (2.5a)</u>	p.74
<u>6',5''-O-Bis-(tert-butyldiméthylsilyle)-3',4', 3''', 4''''-tétradéhydro-penta-N-Cbz-paromomycine (2.5b)</u>	p.76
<u>3',4', 3''', 4''''-tétradéhydro-penta-N-Cbz-paromomycine (2.6)</u>	p.77
<u>3',4', 3''', 4''''-tétradésoxy-paromomycine (2.7)</u>	p.79
<u>5''-O-triphénylméthyle-hexa-N-Cbz-néomycine (2.11)</u>	p.80
<u>5''-O-triphénylméthyle-3',4', 3''',4''''-tétradéhydro-hexa-N-Cbz-néomycine (2.12) ..</u>	p.81
<u>3',4', 3''', 4''''-tétradésoxy-néomycine (2.13)</u>	p.82
<u>6''',4''''-N,O-carbonyl-5''-O-triphénylméthyle-penta-N-Cbz-néomycine (2.15).....</u>	p.83
<u>6''',4''''-N,O-carbonyl-3',4'-didéhydro-5''-O-triphénylméthyle-penta-N-Cbz-néomycine (2.16)</u>	p.84
<u>3',4'-didéhydro-5''-O-triphénylméthyle-hexa-N-Cbz-néomycine (2.17)</u>	p.86
<u>3',4'-didéhydro-néomycine (2.18)</u>	p.87
<u>3',4', 3''',4''''-tétradésoxy-N-1-HABA-paromomycine (2.20).....</u>	p.88
<u>3',4', 3''',4''''-tétradéhydro-5''-O-triphénylméthyle-N-1-NH₂-penta-N-Cbz-néomycine (2.21)</u>	p.90
<u>3',4',3''',4''''-tétradéhydro-5''-O-triphénylméthyle-N-1-HABA-penta-N-Cbz-néomycine (2.22).....</u>	p.91
<u>3',4',3''',4''''-tétradésoxy-N-1-HABA-néomycine (2.23).....</u>	p.93
<u>3',4'-didéhydro-1,6-N,O-carbonyl-6''',4''''-N,O-carbonyl-5''-O-triphénylméthyle-penta-N-Cbz-néomycine (2.24).....</u>	p.94
<u>3',4'-didéhydro-6''',4''''-N,O-Carbonyl-N-1-HABA-5''-O-triphénylméthyle-penta-N-Cbz-néomycine (2.25).....</u>	p.95
<u>3',4'-didéhydro-N-1-HABA-néomycine (2.26).....</u>	p.97
<u>6''''-N-carbométhoxy-tétra-N-Cbz-paromomycine (2.28).....</u>	p.99

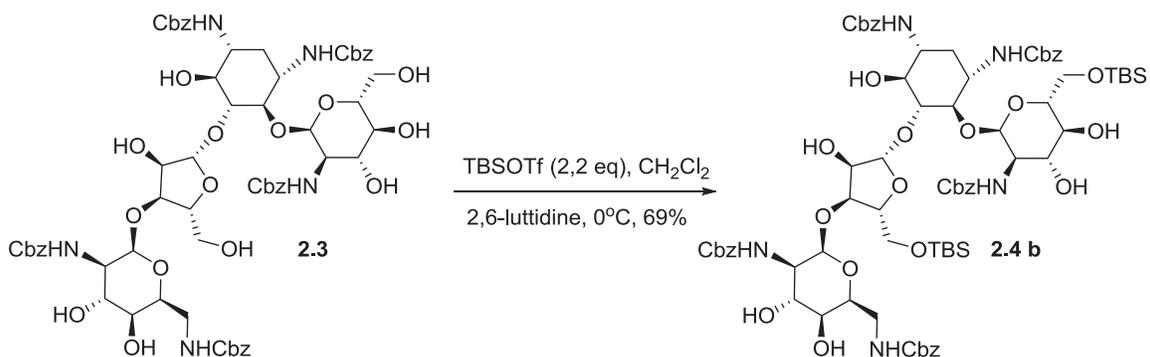
<u>6'''-N-carbométhoxy-paromomycine (2.29).....</u>	p.100
<u>6''', 3'''-N,O-carbonyl-tétra-N-Cbz-paromomycine (2.30).....</u>	p.101
<u>6''', 3'''-N,O-carbonyl-paromomycine (2.31).....</u>	p.102
<u>6'''-NH₂-tétra-N-Cbz-paromomycine (2.14).....</u>	p.103
<u>6'''-N-(2,2,2-trifluoroéthyle)-tétra-N-Cbz-paromomycine (2.32a).....</u>	p.104
<u>6'''-N-(2,2-difluoroéthyle)-tétra-N-Cbz-paromomycine (2.32b).....</u>	p.105
<u>6'''-N-(éthyle)-paromomycine (2.33).....</u>	p.106
<u>6'''-N-(2,2,2-trifluoroéthyle)-paromomycine (2.34a).....</u>	p.108
<u>6'''-N-(2,2-difluoroéthyle)-paromomycine (2.34b).....</u>	p.109
<u>6'''-NH₂-penta-N-Cbz-néomycine (2.35).....</u>	p.110
<u>6'''-N-(2,2,2-trifluoroéthyle)-néomycine (2.36a).....</u>	p.112
<u>6'''-N-(2,2-difluoroéthyle)-néomycine (2.36b).....</u>	p.114
<u>6'''-N-(éthyle)-néomycine (2.37).....</u>	p.116

3.3 Procédures expérimentales



6',5''-O-bis-benzoate-penta-N-Cbz-paromomycine (2.4a)

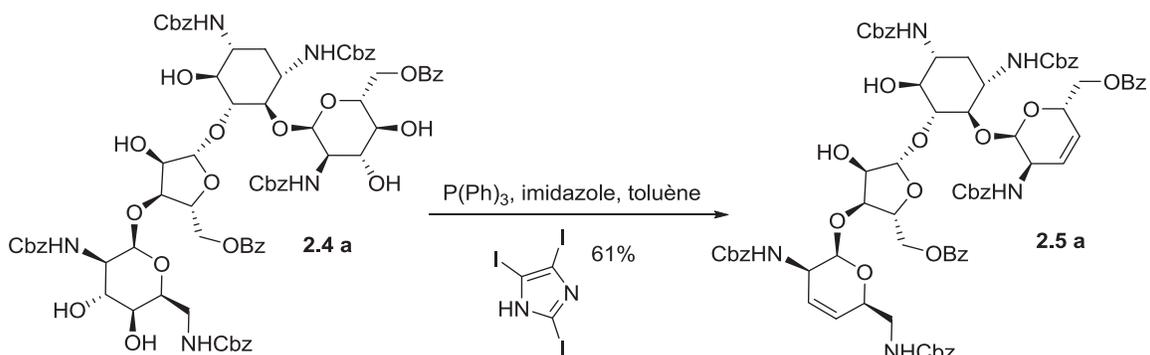
Le composé **2.3** (1,20 g, 0,933 mmol) a été dissous dans du toluène et réduit 3 fois à sec. Le résidu a été dissous dans 50 mL de CH₂Cl₂ et la solution a été refroidie à 0 °C. À cette solution, on ajoute la 2,6-lutidine (0,272 mL, 2,333 mmol) et ensuite le chlorure de benzoyle goutte-à-goutte (0,163 mL, 1,400 mmol). La solution a été agitée pendant 6 h à 0°C, puis du chlorure de benzoyle a été ajouté goutte-à-goutte (0,073 mL, 0,628 mmol). La réaction a été agitée pendant 3 h supplémentaires, du MeOH (2 mL) a été ajoutée et les solvants ont été évaporés sous pression réduite. Le résidu a été dissous dans de l'AcOEt et la phase organique a été lavée avec une solution de HCL 2.0 M, avec une solution saturée de NaHCO₃ et finalement par une solution de saumure. La phase organique a été séchée sur Na₂SO₄, puis concentrée sous pression réduite. Le résidu a été dissous dans un minimum de CH₂Cl₂ puis purifié par chromatographie éclair (100% CH₂Cl₂ à 4% MeOH). Le composé **2.4a** a été isolé sous forme d'un solide amorphe blanc (0,571 g, 41%). *m/z* calculé pour C₇₇H₈₃N₅O₂₆ [M+H]⁺: 1493.5326, LRMS [M+H]⁺: 1493.6; ¹H-RMN (300 MHz, MeOD) : δ 8.02 (m, 4H), 7.44-6.89 (m, 31H), 5.48 (s, 1H), 5.18-4.91 (m, 14H), 4.59-3.26 (m, 25H), 2.03-1.95 (m, 1H), 1.45-1.29 (m, 1H); ¹³C-RMN (75 MHz, MeOD): δ 167.55 (2C), 158.54-157.72 (5C), 137.54 (5C), 133.62 (2C), 130.54 (10C), 128.90-128.12 (25C), 111.21 (1C), 99.78 (1C), 99.10 (1C), 86.68 (1C), 80.56 (2C), 78.55 (1C), 75.35 (1C), 74.80 (1C), 73.84 (1C), 72.64 (1C), 71.11 (1C), 70.98 (1C), 70.94 (1C), 68.49 (1C), 67.16-67.04 (5C), 64.84 (1C), 64.22 (1C), 56.91 (1C), 53.53 (1C), 52.20 (1C), 51.42 (1C), 41.90 (1C), 34.85 (1C); [α]_D +14.51° (c 0.4, MeOH).



6',5''-O-bis-(*tert*-butyldiméthylsilyle)-penta-*N*-Cbz-paromomycine (**2.4b**)

Le composé **2.3** (1,00 g, 0,778 mmol) a été dissous dans du toluène et réduit 3 fois à sec. Le résidu est ensuite dissous dans du CH₂Cl₂ (50 mL) et refroidi à 0°C. À cette solution a été ajoutée goutte-à-goutte de la 2,6-lutidine (0,540 mL, 4,668 mmol) et ensuite du TBSOTf (0,390 mL, 1,712 mmol). Cette solution est ensuite vigoureusement agitée pendant 45 min, puis parachevée avec 15 mL d'H₂O. Les solvants sont évaporés sous pression réduite. Le résidu a été dissous dans de l'AcOEt et la phase organique a été lavée avec une solution de HCL 2.0 M, avec une solution saturée de NaHCO₃ et finalement par une solution de saumure. La phase organique a été séchée sur Na₂SO₄, puis concentrée sous pression réduite. Le résidu a été dissous dans un minimum de CH₂Cl₂ puis purifié par chromatographie éclair (100% CH₂Cl₂ à 5% MeOH, avec des incréments de 0,5% MeOH) pour isoler le composé **2.4b** sous forme d'une poudre blanche (0,813 g, 69%); m/z calculé pour C₇₅H₁₀₃N₅O₂₄Si₂ [M+H]⁺: 1514.66098, [M+Na]⁺: 1536.64237, HRMS [M+Na]⁺: 1536.64485; ¹H-RMN (400 MHz, MeOD) : δ 7.22 (m, 25H), 6.75-6.50 (m, 1H), 5.46 (bs, 1H), 5.04-4.85 (m, 14H), 4.02-3.24 (m, 24H), 1.91 (m, 1H), 1.29 (m, 1H), 0.79 (m, 18H), -0.06 (m, 12H); ¹³C-RMN (101 MHz, MeOD) : δ 157.67-156.92 (5C), 136.54-136.21 (5C), 127.81-126.67 (25 C), 109.20 (1C), 99.40 (1C), 96.99 (1C), 86.82 (1C), 82.68 (1C), 78.55 (1C), 76.62 (1C), 74.52 (1C), 74.12 (1C), 72.46 (1C), 72.20 (1C), 71.83 (1C), 69.66 (1C), 67.08 (1C), 66.22-65.98 (5C), 65.85 (1C), 65.70 (1C), 62.50 (1C), 62.07 (1C), 55.25 (1C), 52.50 (1C), 50.62 (1C), 50.34 (1C),

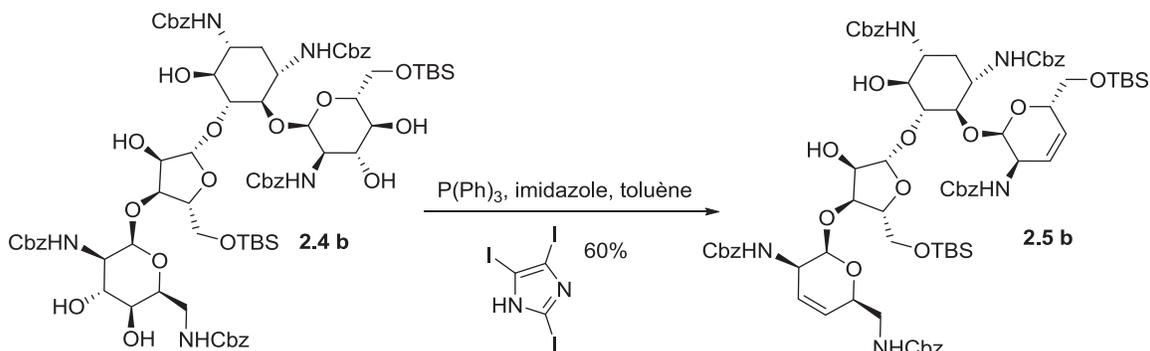
49.94 (1C), 40.70 (1C), 33.67 (1C), 24.90 (6 C), 17.64 (2C), -6.65 (2C); $[\alpha]_{\text{D}} +18.51^{\circ}$ (c 0.5, MeOH).



6',5''-O-bis-benzoate-3',4', 3''', 4''''-tétradéhydro-penta-N-Cbz-paromomycine (2.5a)

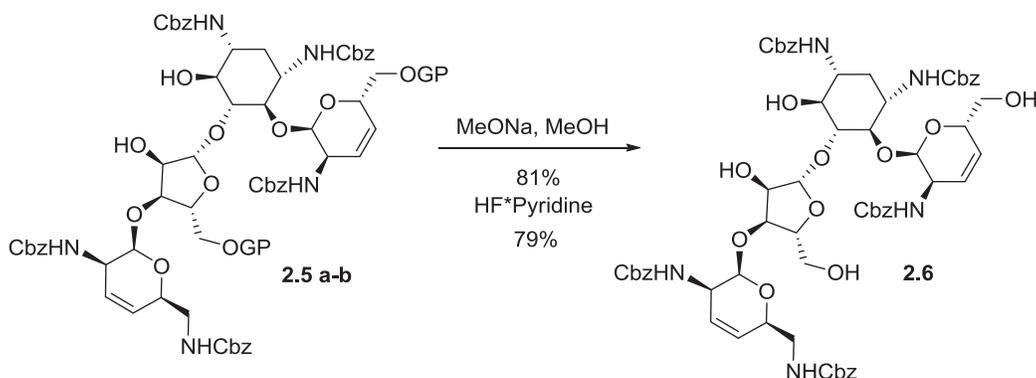
Le composé **2.4a** (0,400 g, 0,280 mmol) a été dissous dans du toluène et réduit à sec 3 fois. Le résidu a alors été dissous dans du toluène (12 mL) et dans l'ACN (4 mL). À cette solution ont été ajoutés dans cet ordre de la P(Ph)_3 (0,882 g, 3,36 mmol), l'imidazole (0,172 g, 2,521 mmol) et du triiodoimidazole (0,592 g, 1,344 mmol). La solution a été portée à reflux pour 120 min et ensuite a été refroidie et diluée dans l'AcOEt. La phase organique a d'abord été lavée avec une solution aqueuse contenant 5% de thiosulfate, puis avec une solution 2.0 M HCl, puis avec une solution saturée de NaHCO_3 et puis finalement avec une solution de saumure. La phase organique a été séchée sur du Na_2SO_4 et finalement concentrée sous pression réduite. Le résidu a été dissous dans un minimum de CH_2Cl_2 et purifié par chromatographie éclair (100% CH_2Cl_2 jusqu'à 4% MeOH, en augmentant par bond de 0,5%). Le composé **2.5a** a été isolé sous forme d'un solide blanc (0,243 g, 61%). m/z calculé pour $\text{C}_{77}\text{H}_{79}\text{N}_5\text{O}_{22}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1426.52949, LRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1426.5; $^1\text{H-RMN}$ (700 MHz, MeOD) : δ 8.03-7.97 (m, 4H), 7.58-7.28 (m, 31H), 5.82-5.78 (m, 2H), 5.56-5.52 (m, 3H), 5.28 (s, 1H), 5.20-5.18 (m, 1H), 5.10-4.99 (m, 11H), 4.67 (d, $J = 0.2$ Hz, 1H), 4.54 (m, 3H), 4.40 (m, 2H), 4.29-4.16 (m, 7H), 4.10 (dd, $J = 7.6, 3.8$ Hz, 1H), 3.60-3.46 (m, 4H), 3.37-3.29 (m, 3H), 3.20-3.19 (m, 1H), 2.07-2.05 (m, 1H), 1.42-1.39 (m, 1H); $^{13}\text{C-RMN}$ (176 MHz, MeOD): δ 166.42 (2C), 158.13-156.89 (5C), 136.98-136.76 (5C), 132.96 (2C), 130.28-129.34 (10C), 128.63 (1C), 128.25-127.38 (25C), 126.22 (2C), 125.12 (1C), 110.07 (1C), 98.88 (1C), 96.12 (1C), 84.97 (1C), 79.65 (1C), 79.12 (1C), 76.84 (1C), 74.81 (2C), 74.04 (1C), 73.86 (1C), 73.62 (1C), 68.02 (1C),

66.34-66.11 (5C), 65.24 (1C), 64.41 (1C), 51.46 (1C), 50.49 (1C), 43.92 (1C), 33.91 (1C); $[\alpha]_D +15.71^\circ$ (c 0.8, MeOH)



6',5''-O-bis-(*tert*-butyldiméthylsilyle)-3',4', 3''', 4'''-tétradéhydro-penta-*N*-Cbz-paromomycine (2.5b)

Le composé **2.4b** (0,300 g, 0,198 mmol) a été dissout dans du toluène et réduit à sec 3 fois. Le résidu a alors été dissout dans du toluène (10 mL) et de l'ACN (2.6 mL). À cette solution a été ajoutée dans cet ordre de l'imidazole (0,121 g, 1,783 mmol), P(Ph)₃ (0,623 g, 2.378 mmol) et du triiodoimidazole (0,623 g, 2.378 mmol). La solution a été portée à reflux pour 120 min et ensuite a été refroidie et diluée dans l'AcOEt. La phase organique a d'abord été lavée avec une solution aqueuse contenant 5% de thiosulfate, puis avec une solution 2.0 M HCl, puis avec une solution saturée de NaHCO₃ et puis finalement avec une solution de saumure. La phase organique a été séchée sur du Na₂SO₄ et finalement concentrée sous pression réduite. Le résidu a été dissous dans un minimum de CH₂Cl₂ et purifié par chromatographie éclair (100% CH₂Cl₂ jusqu'à 3% MeOH, en augmentant par bond de 0,5%). Le composé **2.5b** a été isolé sous forme d'un solide blanc (0,175 g, 61%). m/z calculé pour C₇₅H₉₉N₅O₂₀Si₂ [M+H]⁺: 1446,65002, [M+Na]⁺: 1468.63103, HRMS [M+Na]⁺: 1468.63141; ¹H-RMN (400 MHz, MeOD) : δ 7.22 (m, 25H), 5.84 (m, 2H), 5.51 (m, 2H) 5.04-4.85 (m, 12H), 4.02-3.24 (m, 23H), 1.91 (m, 1H), 1.29 (m, 2H), 0.79 (m, 18H), -0.06 (m, 12H); ¹³C-RMN (101 MHz, MeOD) : δ 157.67-156.92 (5C), 136.54-136.21 (5C), 129.93 (1C) 127.81-126.67 (26 C), 124.64 (2C), 108.49 (1C), 99.08 (1C), 95.23 (1C), 84.94 (1C), 82.36 (1C), 77.58 (1C), 74.23 (1C), 73.90 (1C), 73.71 (1 C), 73.41 (1C), 69.41 (1C), 66.30-65.71 (5C), 64.82 (1C), 62.88 (1C), 51.00 (1C), 50.00 (1C), 46.95 (1C), 43.73 (1C), 33.93 (1C), 29.00 (1C), 28.72 (1C), 24.81 (1C), 24.72 (6 C), 17.47 (2C), -6.65 (2C); [α]_D +19.41° (c 1.0, MeOH).



3',4', 3''', 4'''-tétradéhydro-penta-*N*-Cbz-paromomycine (2.6)

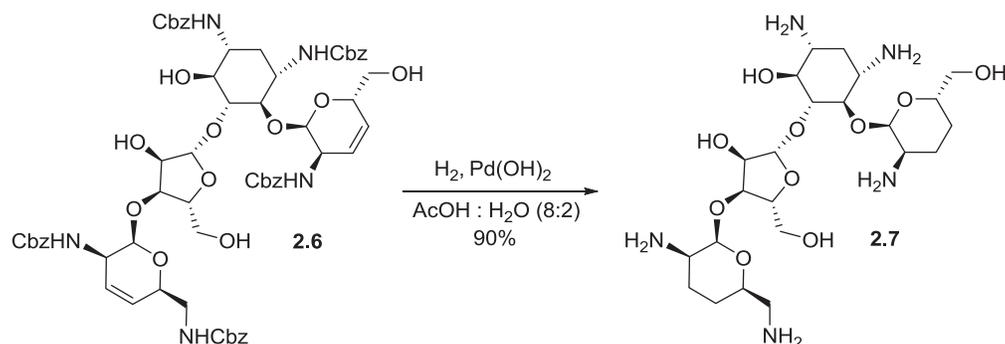
Via 2.5a

Une solution de **2.5a** (0,350 g, 0,234 mmol) dans du méthanol (10 mL) a été refroidi à 0°C. À cette solution, on ajoute du NaOMe en solution dans le méthanol jusqu'à ce que le pH de la solution atteigne 10. La solution est ensuite agitée pendant 12h et la réaction est parachevée par l'ajout de glace carbonique. Le solvant organique est ensuite concentré sous vide. Le résidu a été dissous dans un minimum de CH₂Cl₂ et purifié par chromatographie éclair (100% CH₂Cl₂ jusqu'à 5% MeOH, en augmentant par bond de 0,5%). Le composé **2.6** a été isolé sous forme d'un solide blanc (0,225 g, 79%).

Via 2.5b

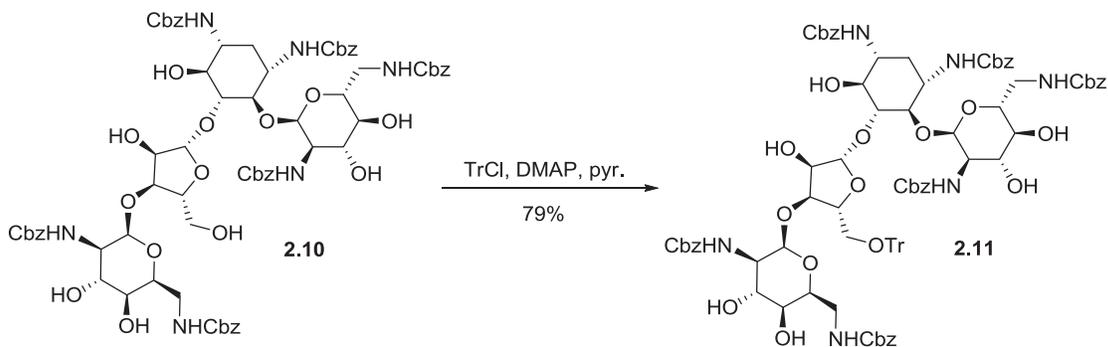
Une solution de **2.5b** (0,200 g, 0.138 mmol) dans de la pyridine sec (3 mL) à été refroidie à 0°C. Ensuite, une solution de HF*pyridine (9 mL) est ajoutée goutte-à-goutte et la réaction est agitée durant toute la nuit. La réaction est parachevée avec l'ajout d'une solution de NH₄Cl aq. (10 ml). La solution est ensuite extraite 3 fois l'AcOEt. Les phases organiques combinées ont été lavées avec une solution 2.0 M de HCl, puis avec une solution saturée de NaHCO₃ et puis finalement avec une solution de saumure. La phase organique a été séchée sur du Na₂SO₄ et finalement concentrée sous pression réduite. Le résidu a été dissous dans un minimum de CH₂Cl₂ et purifié par chromatographie éclair (100% CH₂Cl₂ jusqu'à 5% MeOH, en augmentant par bond de 0,5%). Le composé **2.6** a été isolé sous forme d'un solide blanc (0,135 g, 81%); m/z pour C₆₃H₇₁N₅O₂₀ [M+H]⁺: 1218.47706, [M+Na]⁺: 1240.46179, HRMS [M+Na]⁺: 1240.45846; ¹H-RMN (400 MHz, MeOD) : δ 7.34 (m, 25H), 5.83 (bs, 2H), 5.61 (bs, 1H), 5.50 (bs, 1H), 5.16-5.06 (m,

13H), 4.77 (s, 2H), 4.28 (m, 6H), 4.00 (s, 1H), 3.73-3.33 (m, 13H), 2.03 (m, 2H); 1.44-1.31 (m, 1H) ^{13}C -RMN (101 MHz, MeOD) : δ 157.67-156.66 (5C), 136.57-136.42 (5C), 129.71 (1C), 127.81-126.64 (25C), 126.32 (1C), 125.02 (1C), 124.48 (1C), 107.66 (1C), 98.30 (1C), 94.72 (1C), 84.73 (1C), 81.46 (1C), 76.53 (1C), 76.25 (1C), 73.89 (1C), 76.25 (1C), 73.89 (1C), 69.33 (1C), 66.06 (1C), 65.76 (5C), 63.48 (1C), 61.54 (1C), 60.86 (1C), 51.16 (1C), 49.45 (1C), 43.67 (1C), 33.54 (1C) $[\alpha]_{\text{D}} +8.32^{\circ}$ (*c* 0.5, MeOH)



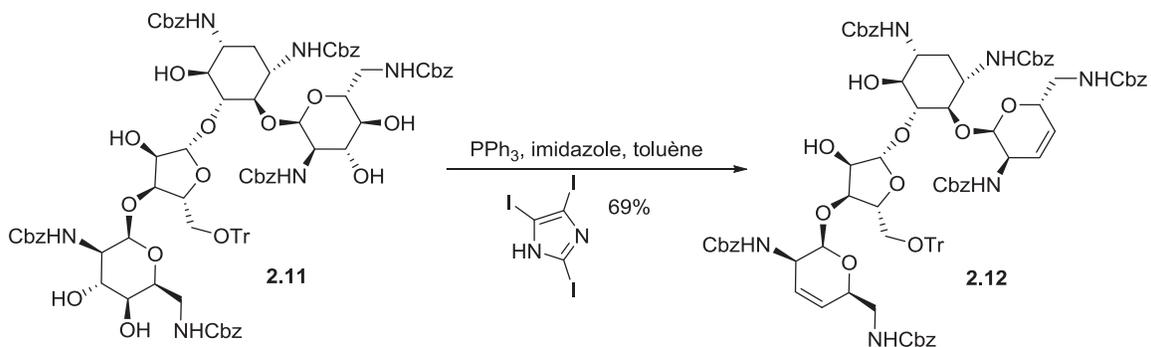
3',4', 3''', 4'''-tétradésoxy- paromomycine (2.7)

Le composé **2.6** (0,020 g, 0,0164 mmol) a été dissous dans une solution d'AcOH et d'eau (4 : 1) (5 ml). On ajoute à cette solution du Pd(OH)₂/C 20% (15 mg, 0,002 mmol) et on agite vigoureusement sous atmosphère d'hydrogène (ballon de vaudruche) pendant 4 h. On filtre alors sur célite et on lyophilise pour obtenir un résidu qui est ensuite purifié par une chromatographie éclair (2 : 3 : 1, CHCl₃ : MeOH : NH₄OH aq.) pour obtenir le produit **2.7** (8.3 mg, 91%). Le produit est transformé en sel d'acétate à des fins de caractérisation. Pour ce faire, le produit est dilué dans de l'eau (5 mL) et à cette solution a été ajouté de l'acide acétique glacial (50 µL). La solution est ensuite lyophilisée à nouveau pour isoler le produit sous forme d'un sel d'acétate. *m/z* calculé pour C₂₃H₄₅N₅O₁₀ [M+H]⁺: 552.32447, HRMS [M+H]⁺: 552.32392; ¹H-RMN (400 MHz; D₂O): δ 5.50 (s, 1H), 5.24 (s, 1H), 4.90 (s, 1H), 4.38-4.35 (m, 1H), 4.25-4.23 (m, 1H), 4.07-4.03 (m, 1H), 3.92-3.71 (m, 6H), 3.65-3.31 (m, 7H), 3.25-3.14 (m, 2H), 3.05-2.99 (m, 1H), 2.35-2.30 (m, 1H), 2.05-1.96 (m, 3H), 1,83 (s, 18 H), 1.73-1.56 (m, 3H), 1.45-1.35 (m, 2H) ¹³C-RMN (101 MHz; D₂O): δ 180.80 (5C), 109.80 (1C), 97.22 (1C), 94.80 (1C), 84.12 (1C), 80.78 (1C), 77.55 (1C), 74.14 (1C), 72.83 (1C), 72.18 (1C), 72.11 (1C), 70.56 (1C), 62.78 (1C), 59.80 (1C), 49.43 (1C), 48.64 (1C), 48.54 (1C), 47.28 (1C), 42.10 (1C), 28.46 (1C), 23.56 (1C), 23.40 (1C), 22.74 (5C), 20.76 (1C), 20.49 (1C). [α]_D +21.6° (c 0.15, H₂O)



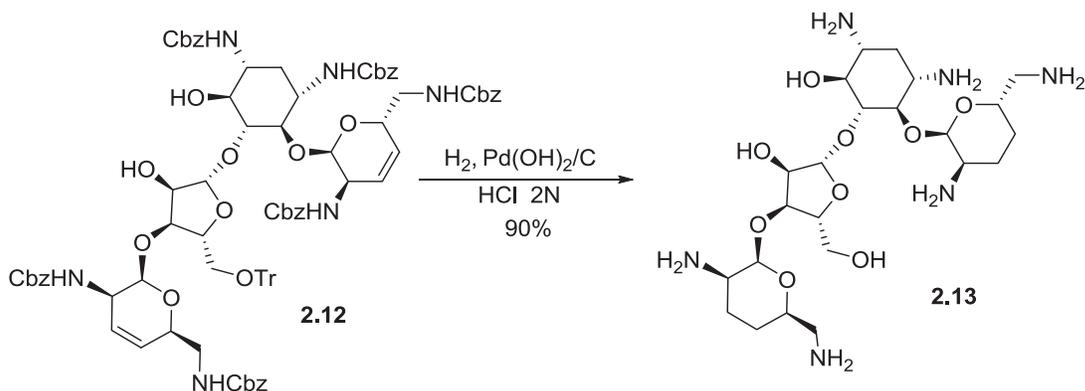
5''-O-triphénylméthyle-hexa-N-Cbz-néomycine (**2.11**)

À une solution de **2.10** (1,45 g, 1,022 mmol) dans de la pyridine (19,3 mL) ont été ajoutés du DMAP (0,002 g, 0,012 mmol) et du chlorure de triphénylméthylène (1,42 g, 5,111 mmol). La réaction est ensuite agitée pendant 12 h à 70 °C. Le solvant est réduit sous vide et le résidu est dissous dans un minimum de CH₂Cl₂. La phase organique a été lavée avec une solution de HCl 2.0 M, avec une solution saturée de NaHCO₃ aq. et finalement par une solution de saumure. La phase organique a été séchée sur Na₂SO₄, puis concentrée sous pression réduite. Le résidu a été dissous dans un minimum de CH₂Cl₂ puis purifié par chromatographie éclair (100% CH₂Cl₂ à 4% MeOH, avec des incréments de 0.7% MeOH) pour donner le produit **2.11** sous forme d'un solide blanc (1,30 g, 77%); m/z calculé pour C₉₀H₉₆N₆O₂₅[M+H]: 1661.65034, [M+Na]⁺: 1683.62936, HRMS [M+Na]⁺: 1683.63173; ¹H-RMN (400 MHz, (CD₃)₂SO): δ 8.23-7.89 (m, 44H), 7.69-7.67 (m, 1H), 7.24-7.19 (m, 1H), 6.93-6.91 (m, 1H), 6.37-6.33 (m, 1H), 6.15-6.08 (m, 2H), 5.99-5.62 (m, 16H), 5.49-5.46 (m, 1H), 5.00-4.92 (m, 2H), 4.75-4.73 (m, 1H), 4.64-4.46 (m, 4H), 4.43-4.26 (m, 4H), 4.20-3.83 (m, 9H), 2.58-2.53 (m, 2H), 2.21-2.16 (m, 1H). ¹³C-RMN (101 MHz, (CD₃)₂SO): δ 157.38-156.64 (6C), 144.73 (3C), 138.25-137.81 (6C), 129.52-127.69 (45C), 110.14 (1C), 98.75 (1C), 98.20 (1C), 86.88 (1C), 85.91 (1C), 81.15 (1C), 79.60 (1C), 78.04 (1C), 77.96 (1C), 74.15 (1C), 73.12 (1C), 72.67 (1C), 72.25 (1C), 71.94 (1C), 71.39 (1C), 70.64 (1C), 67.40 (1C), 66.34-65.86 (6C), 64.60 (1C), 60.69 (1C), 56.49 (1C), 43.21 (1C), 35.57 (1C), 21.70 (1C), 15.01 (1C). [α]_D 21.6° (c 0.51, CHCl₃).



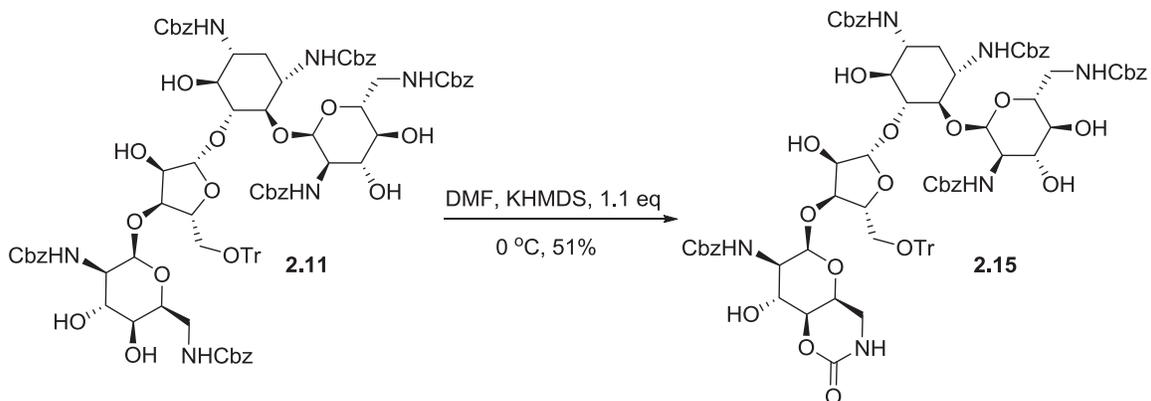
5"-O-triphénylméthyle-3',4', 3''',4''''-tétradéhydro-hexa-N-Cbz-néomycine (2.12)

Le composé **2.11** (1,300 g, 0,783 mmol) a été dissous dans du toluène et réduit à sec 3 fois. Le résidu a alors été dissous dans du toluène (43 mL) et de l'ACN (10,75 mL). À cette solution ont été ajoutés dans cet ordre de l'imidazole (0,320 g, 4,697 mmol), de la P(Ph₃) (2,464 g, 9,394 mmol) et du triiodoimidazole (1,675 g, 4,758 mmol). La solution a été portée à reflux pour 90 min. et ensuite refroidie et diluée dans l'AcOEt. La phase organique a d'abord été lavée avec une solution aqueuse contenant 5% de thiosulfate, puis avec une solution 2.0 M HCl, puis avec une solution saturée de NaHCO₃ et puis finalement avec une solution de saumure. La phase organique a été séchée sur du Na₂SO₄ et finalement concentrée sous pression réduite. Le résidu a été dissous dans un minimum de CH₂Cl₂ et purifié par chromatographie éclair (100% CH₂Cl₂ jusqu'à 2% MeOH, en augmentant par bond de 0,5%). Le composé **2.12** a été isolé sous forme d'un solide blanc (0,810 g, 65%); *m/z* calculé pour C₉₀H₉₂N₆O₂₁ [M+H]⁺: 1593.63938, [M+Na]⁺: 1615.61384, HRMS [M+Na]⁺: 1615.62078; ¹H-RMN (400 MHz, (CD₃)₂SO): δ 7.43-7.04 (45H, m), 6.64-6.61 (m, 1H), 5.77-5.72 (m, 2H), 5.51-5.47 (m, 1H), 5.32-5.25 (m, 3H), 5.18-4.96 (m, 14H), 4.85-4.77 (m, 2H), 4.58 (m, 1H), 4.25-4.18 (m, 2H), 4.12-3.98 (m, 5H), 3.59-3.43 (m, 5H), 3.25-3.08 (s, 5H), 3.04-2.98 (m, 1H), 2.88-2.83 (m, 1H), 1.82-1.77 (m, 1H), 1.36-1.32 (m, 1H); ¹³C-RMN (101 MHz, CD₃)₂SO): δ 156.84-155.62 (6 C), 143.74 (3C), 137.26-136.85 (6C), 129.97 (1C), 128.42-127.04 (46C), 125.67 (1C), 125.30 (1C), 108.15 (1C), 98.13 (1C), 96.38 (1C), 86.04 (1C), 82.54 (1C), 80.42 (1C), 80.05 (1C), 77.36 (1C), 74.12 (1C), 72.86 (1C), 68.07 (1C), 65.51-65.29 (6C), 64.45 (1C), 51.16 (1C), 50.61 (1C), 47.68 (1C), 46.62 (1C), 44.11 (1C), 34.86 (1C), 20.89 (1C), 14.20 (1C). [α]_D 4.9° (c 0.333, CHCl₃).



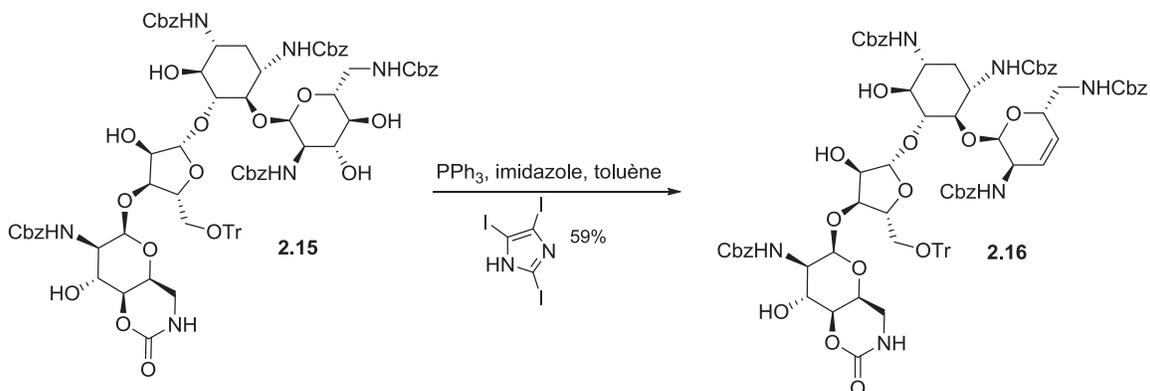
3',4', 3''', 4'''-tétradésoxy-néomycine (2.13)

Le composé **2.12** (0,020 g, 0,0164 mmol) a été dissous dans une solution 2 N de HCl et d'eau (4 :1) (5 ml). On ajoute à cette solution 20% Pd(OH)₂/C (15 mg, 0,002 mmol) et on agite vigoureusement sous atmosphère d'hydrogène (ballon de vaudruche) pendant 4 h. On filtre alors sur célite et on lyophilise pour obtenir un résidu qui est ensuite purifié par une chromatographie éclair (2:3:2, CHCl₃:MeOH:NH₄OH aq.) pour obtenir le produit **2.13** (8.1 mg, 84%). Le produit est transformé en sel d'acétate à des fins de caractérisation. Pour ce faire, le produit est dilué dans de l'eau (5 mL) et à cette solution a été ajouté de l'acide acétique glacial (50 µL). La solution est ensuite lyophilisée à nouveau pour isoler le produit sous forme d'un sel d'acétate. *m/z* calculé pour C₂₃H₄₆N₆O₉ [M+H]⁺: 551.34045; [M+Na]⁺: 573.32424, HRMS [M+H]⁺: 573.32185; ¹H-RMN (400 MHz, D₂O): δ 5.75 (m, 1H), 5.29 (m, 1H), 4.92 (bs, 1H), 4.35 (m, 1H), 4.27 (m, 1H), 4.09 (m, 2H), 3.94-3.89 (m, 1H), 3.76 (m, 3H), 3.61 (m, 3H), 3.45-3.40 (m, 1H), 3.19-3.07 (m, 6H), 2.25 (m, 1H), 2.09-1.90 (m, 5H) 1.88 (s, 18H), 1.66-1.59 (m, 2H) 1.59-1.40 (m, 2H); ¹³C-RMN (101 MHz, D₂O): δ 180.74 (5C), 109.95 (1C), 97.33 (1C), 93.84 (1C), 85.13 (1C), 81.02 (1C), 76.53 (1C), 74.39 (1C), 73.04 (1C), 72.56 (1C), 72.20 (1 C), 65.33 (1C), 60.06 (1C), 49.81 (1C), 48.46 (1C), 48.37 (1C), 47.30 (1C), 42.19 (1C), 42.11 (1C), 29.55 (1C), 25.8 (1C), 23.56 (1C), 22.69 (5 C), 20.48 (1C), 20.16 (1C). [α]_D +37.8° (c 0.315, H₂O).



6'''',4'''-N,O-carbonyle-5'''-O-triphénylméthyle-penta-N-Cbz-néomycine (2.15)

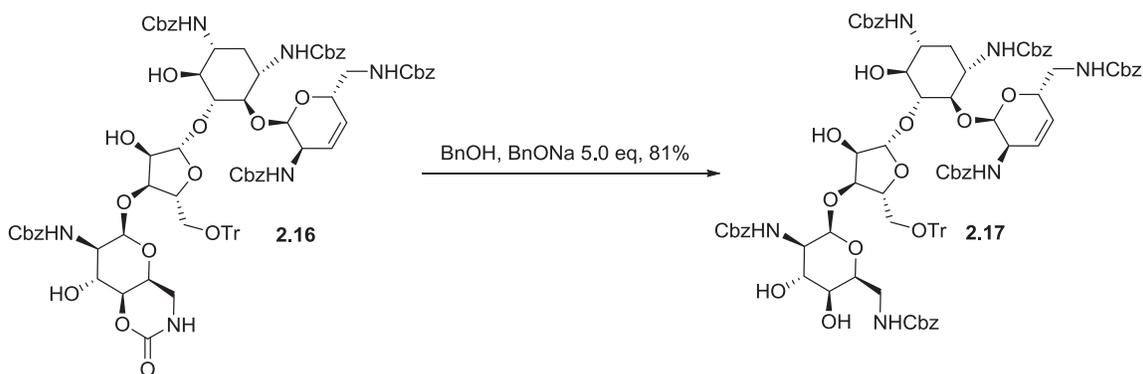
Une solution de **2.10** (3.00 g, 1.806 mmol) dans du DMF anhydre (60 ml) a été refroidie à 0°C. Du KHMDS (0.5 M dans du toluène, 3,45 mL, 1,715 mmol) a été ajoutée goutte-à-goutte, puis la réaction est agitée vigoureusement à 0°C pendant 20 h. La réaction est parachevée par l'addition de NH₄Cl aq. et extraite au CH₂Cl₂. Les phases organiques combinées sont séchées sur Na₂SO₄ et réduites sous vide mécanique. Le résidu a été dissous dans un minimum de CH₂Cl₂ puis purifié par chromatographie éclair (100% CH₂Cl₂ à 5% MeOH, par bond de 0.5%). Le composé **2.15** a été isolé sous forme d'un solide amorphe blanc (1,40 g, 51%). *m/z* calculé pour C₈₃H₈₈N₆O₂₄ [M+H]⁺: 1553,5928, LRMS [M+H]⁺: 1553.8; ¹H-RMN (400 MHz, (CD₃)₂SO) : δ 7.43-7.16 (m, 40H), 6.92-6.88 (m, 1H), 6.53-6.49 (m, 1H), 5.98-5.96 (m, 1H), 5.40-5.36 (m, 1H), 5.27-5.25 (m, 1H), 5.18-4.89 (m, 13H), 4.84-4.75 (m, 2H), 4.71-4.68 (m, 1H), 4.27-4.13 (m, 3H), 3.97-3.87 (m, 3H), 3.76-3.41 (m, 7H), 3.35-3.24 (m, 2H), 3.20-3.04 (m, 4H), 2.90-2.85 (m, 1H), 1.76-1.70 (m, 1H), 1.40-1.35 (m, 1H); ¹³C-RMN (101 MHz, (CD₃)₂SO): δ 156.55-155.83 (5C), 151.18 (1C), 143.88 (3C), 137.34-136.86 (5C), 128.26 (40H) 108.78 (1C), 97.51 (1C), 86.06 (1C), 84.86 (1C), 79.98 (1C), 79.02 (1C), 77.02 (1C), 73.79 (1C), 73.15 (1C), 72.81 (1C), 71.83 (1C), 71.26 (1C), 70.49 (1C), 67.31 (1C), 65.70-65.27 (5C), 64.90 (1C), 63.33 (1C), 55.77 (1C), 55.04 (1C), 52.05 (1C), 50.86 (1C), 50.49 (1C), 43.37 (1C), 42.35 (1C), 34.77 (1C). [α]_D +15.71° (c 0.8, MeOH).



6'''',4''''-N,O-carbonyle-3',4'-didéhydro-5''-O-triphénylméthyle-penta-N-Cbz-néomycine
(2.16)

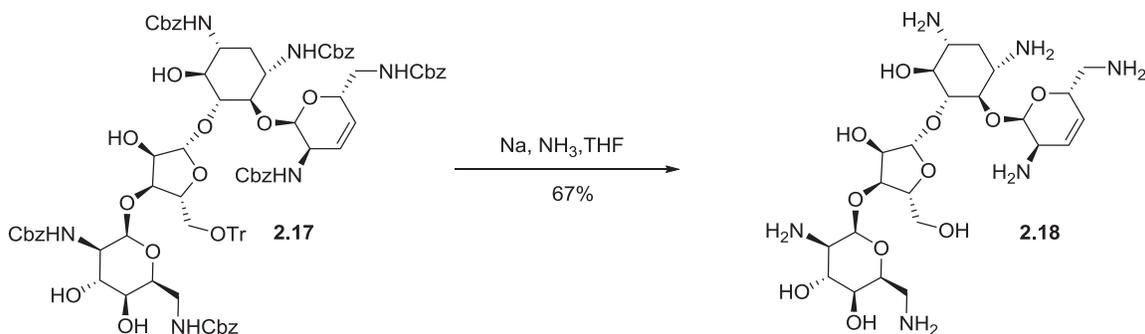
Le composé **2.15** (1,880 g, 1,211 mmol) a été dissous dans du toluène et réduit à sec 3 fois. Le résidu a alors été dissous dans du toluène (67 mL) et dans l'ACN (20 mL). À cette solution ont été ajoutés dans cet ordre de l'imidazole (0,495 g, 7,265 mmol), de la $P(Ph)_3$ (3,881 g, 14,531 mmol) et du triiodoimidazole (0,592 g, 1,344 mmol). La solution a été portée à reflux pour 90 min et a ensuite été refroidie et diluée dans l'AcOEt. La phase organique a d'abord été lavée avec une solution aqueuse contenant 5% de thiosulfate, puis avec une solution 2.0 M HCl, puis avec une solution saturée de $NaHCO_3$ et puis finalement avec une solution de saumure. La phase organique a été séchée sur du Na_2SO_4 et finalement concentrée sous pression réduite. Le résidu a été dissous dans un minimum de CH_2Cl_2 et purifié par chromatographie éclair (100% CH_2Cl_2 jusqu'à 4% MeOH, en augmentant par bond de 0,5%). Le composé **2.16** a été isolé sous forme d'un solide blanc (1,157 g, 63%). m/z calculé pour $C_{83}H_{86}N_6O_{22}$ $[M+H]^+$: 1519.5873, LRMS $[M+H]^+$: 1519.4; 1H -RMN (400 MHz, $(CD_3)_2SO$): δ 7.40-7.21 (m, 40H), 7.03 (s, 1H), 6.65-6.61 (m, 1H), 5.99 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H), 5.38-5.22 (m, 6H), 5.07-4.93 (m, 11H), 4.84-4.77 (m, 1H), 4.24-4.12 (m, 5H), 3.96 (s, 2H), 3.78 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 3.58-3.45 (m, 7H), 3.34-3.13 (m, 5H), 1.82-1.77 (m, 1H), 1.41-1.34 (m, 1H); ^{13}C -RMN (101 MHz, $(CD_3)_2SO$): δ 157.13-156.43 (5C), 151.94 (1C), 144.60 (3C), 138.04-137.65 (5C), 129.03-127.84 (41C), 126.48 (1C), 109.49 (1C), 98.26 (1C), 96.99 (1C), 86.92 (1C), 84.22 (1C), 80.90 (1C), 80.64 (1C), 77.81 (1C), 74.80 (1C), 73.47 (1C), 68.86 (1C),

68.08 (1C), 66.58-66.13 (5C), 64.84 (1C), 64.18 (1C), 55.80 (1C), 52.81 (1C), 51.93 (1C), 51.37 (1C), 48.42 (1C), 44.97 (1C), 44.16 (1C), 35.60 (1C).



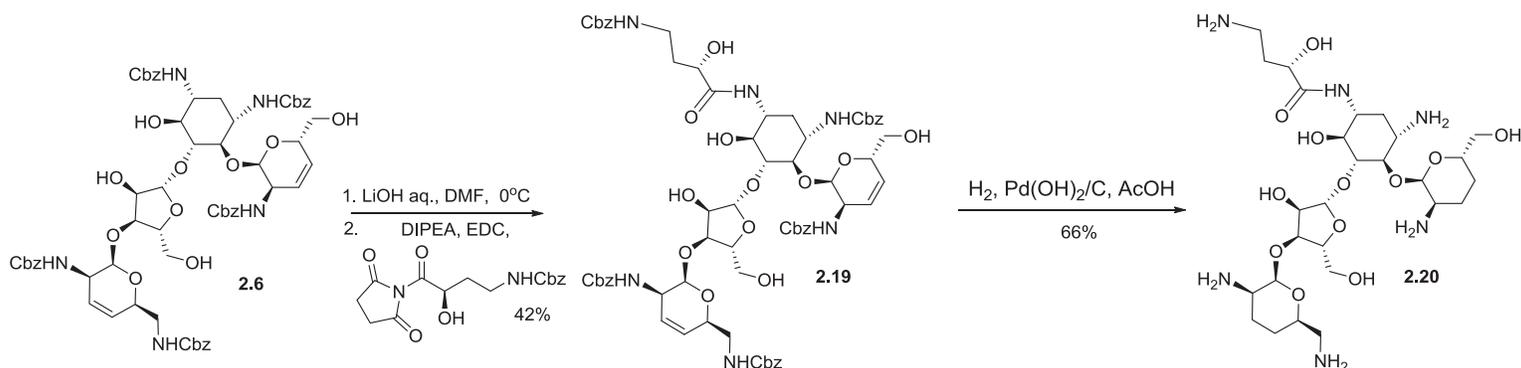
3',4'-didéhydro-5''-O-triphénylméthyle-hexa-N-Cbz-néomycine (2.17)

Le composé **2.16** (0,100 g, 0,064 mmol) a été dissous dans de l'alcool benzilique (3 ml). À cette solution est ajouté de l'alcoolate de benzyle (1M dans de l'alcool benzilique, 0,032 mL, 0,322 mmol). La réaction est agitée à température pièce pendant 24 h avant d'être parachéevée par l'ajout de quelques gouttes de NH₄Cl aq. On extrait alors la solution au CH₂Cl₂, puis on sèche les phases organiques combinées sur Na₂SO₄ et on réduit sous vide. Le résidu a été dissout dans un large volume de CH₂Cl₂ et purifié par chromatographie éclair (100% CH₂Cl₂ jusqu'à ce que tout l'alcool benzylique soit sorti, puis jusqu'à 5% MeOH, en augmentant par bond de 1,0%). Le composé **2.17** a été isolé sous forme d'un solide blanc (0,084 g, 81%). *m/z* calculé pour C₉₀H₉₄N₆O₂₃ [M+H]⁺: 1627.64486, LRMS [M+H]⁺: 1627.8; ¹H-RMN (400 MHz, (CD₃)₂SO) : δ 7.43-7.16 (m, 45H), 6.92-6.88 (m, 1H), 6.53-6.49 (m, 1H), 5.98-5.96 (m, 1H), 5.40-5.36 (m, 1H), 5.27-5.25 (m, 1H), 5.18-4.89 (m, 14H), 4.84-4.75 (m, 2H), 4.71-4.68 (m, 1H), 4.27-4.13 (m, 4H), 3.97-3.87 (m, 3H), 3.76-3.41 (m, 7H), 3.35-3.24 (m, 2H), 3.20-3.04 (m, 4H), 2.90-2.85 (m, 1H), 1.76-1.70 (m, 1H), 1.40-1.35 (m, 1H); ¹³C-RMN (101 MHz, (CD₃)₂SO): δ 157.55-156.83 (6C), 144.88 (3C), 138.34-137.86 (6C), 129.26-127.32 (46C), 126.54 (1C), 109.78 (1C), 98.51 (1C), 96.99 (1C), 86.99 (1C), 84.86 (1C), 80.08 (1C), 77.02 (1C), 74.72 (1C), 73.15 (1C), 72.81 (1C), 71.60 (1C), 70.49 (1C), 68.51 (1C), 67.31 (1C), 66.70-65.92 (6C), 64.90 (1C), 64.23 (1C), 55.77 (1C), 52.05 (1C), 51.49 (1C), 43.37 (1C), 42.35 (1C), 35.57 (1C).



3',4'-didéhydro-néomycine (2.18)

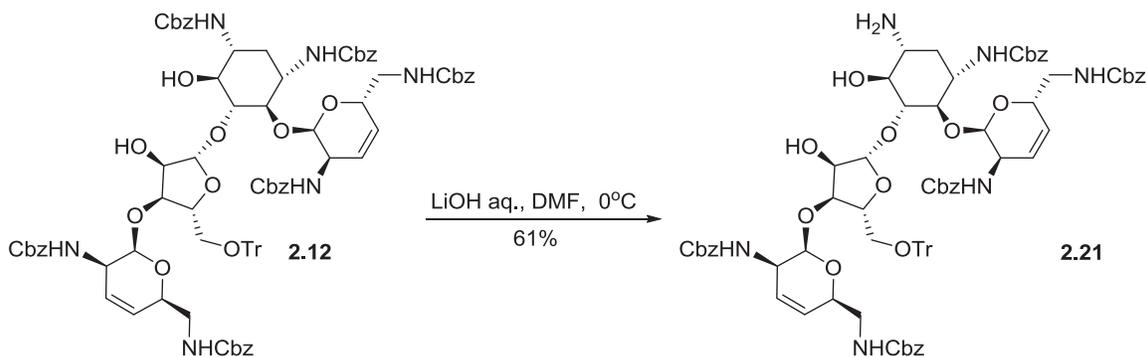
Le composé **2.17** (0,040 g, 0,022 mmol) a été dissous dans du THF anhydre (2 mL) et refroidi à -78°C . NH_3 (5 mL) a été condensé à l'aide d'un " Cold Finger ". De petits morceaux de sodium métallique sont alors ajoutés aux ballons jusqu'à ce que la couleur bleu marine persiste. Ensuite, après 15 min on parachève en ajoutant quelques gouttes de NH_4Cl aq. et le solvant est évaporé sous un flux d'argon. On dissout le résidu dans un minimum de solvant et on purifie par chromatographie éclair (2:3:2 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$). On évapore les solvants à basse température, puis on lyophilise pour obtenir **2.18**, un solide blanc (0,011 g, 67%). Le produit est transformé en sel d'acétate à des fins de caractérisation. Pour ce faire, le produit est dilué dans de l'eau (5 mL) et à cette solution a été ajouté de l'acide acétique glacial (50 μL). La solution est ensuite lyophilisée à nouveau pour isoler le produit sous forme d'un sel d'acétate. m/z calculé pour $\text{C}_{23}\text{H}_{44}\text{N}_6\text{O}_{11}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 581.31463, LRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$: 581.4; ^1H -RMN (400 MHz, D_2O): δ 6.10 (bs, 1H), 5.96 (bs, 1H), 5.35 (bs, 1H), 5.22 (m, 2H), 4.42 (m, 2H), 4.29 (m, 1H), 4.15 (m, 2H), 3.94-3.21 (m, 12H) 3.17-3.14 (m, 1H), 3.09 (m, 2H), 2.33-2.31 (m, 1H), 1.82-1.82 (m, 15H), 1.62-1.52 (m, 1H).



3',4',3''',4''''-tétradésoxy-N-1-HABA-paromomycine (2.20)

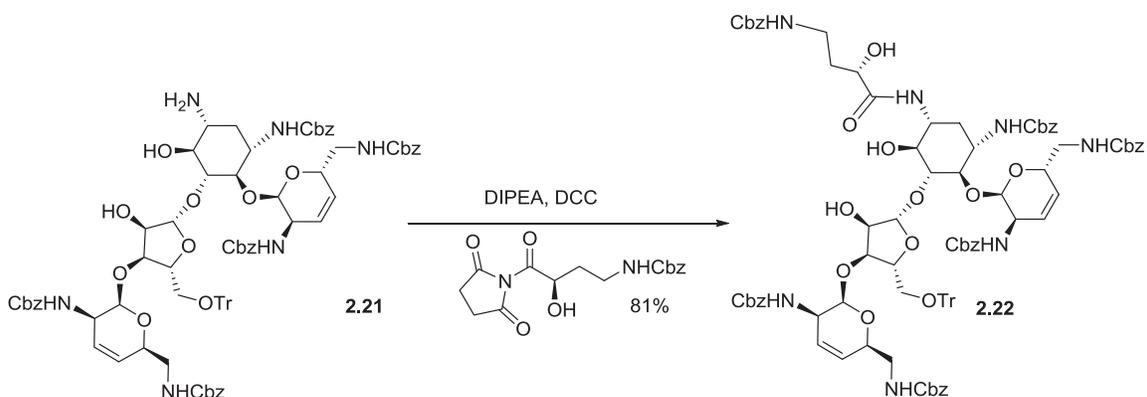
À une solution de **2.6** (0,150 g, 0,136 mmol) dans du DMF (15 mL) a été ajoutée du LiOH aq. 2 M (1,5 ml H₂O). La réaction est alors agitée à température pièce pendant 24 h. La réaction est ensuite parachevée avec une solution de NH₄Cl aq. et extraite avec de l'AcOEt. Les phases organiques combinées sont alors séchées sur du Na₂SO₄ et réduites sous vide. Le résidu est alors codistillé 3 fois avec du toluène et le résidu est alors dissous dans du CH₂Cl₂ (5 ml). La solution est ensuite refroidie à 0°C, puis HABA-Cbz (0,049 g, 0,1937 mmol) est ajouté, suivi de DIPEA (0,241 mL, 0,369 mmol) et finalement de l'EDC (0,055g, 0,029 mmol). La réaction est progressivement ramenée à température pièce et agitée pendant 12 h, puis parachevée par l'ajout d'une solution de NH₄Cl aq. Le solvant est évaporé sous vide et le résidu a été dissous dans de l'AcOEt et la phase organique a été lavée avec une solution de HCL 2.0 M, avec une solution saturée de NaHCO₃ et finalement par une solution de saumure. La phase organique a été séchée sur Na₂SO₄, puis concentrée sous pression réduite. Le résidu a été dissous dans un minimum de CH₂Cl₂ puis purifié par chromatographie éclair (100% CH₂Cl₂ à 9% MeOH, avec des incréments de 1.0% MeOH) pour obtenir **2.19** (0.082 g, 42% pour 2 étapes) sous forme d'un solide blanc. *m/z* calculé pour C₆₇H₇₈N₆O₂₂ [M+H]⁺: 1319.52474 [M+Na]⁺: 1341.50588; HRMS [M+Na]⁺: 1341.50614. Le composé **2.19** (0,014 g, 0,11 mmol) a été dissous dans une solution d'AcOH et d'eau (4 : 1) (5 ml). On ajoute à cette solution 20% de Pd(OH)₂/C (15 mg, 0,002 mmol) et on agite vigoureusement sous atmosphère d'hydrogène (ballon de vaudruche) pendant 4 h. On filtre alors sur célite et on lyophilise pour obtenir un résidu qui est ensuite purifié par une chromatographie éclair (2 : 3 : 2,

CHCl₃ :MeOH :NH₄OH aq.) pour obtenir le produit **2.20** (6.5 mg, 66%). Le produit est transformé en sel d'acétate à des fins de caractérisation. Pour ce faire, le produit est dilué dans de l'eau (5 mL) et à cette solution a été ajouté de l'acide acétique glacial (50 µL). La solution est ensuite lyophilisée à nouveau pour isoler le produit sous forme d'un sel d'acétate. *m/z* calculé pour C₂₇H₅₂N₆O₁₂ [M+H]⁺: 653.37215 [M+Na]⁺: 675.35354, HRMS [M+Na]⁺: 675.35179; ¹H-RMN (500 MHz, D₂O) δ 5.56-5.53 (m, 1H), 5.28-5.27 (m, 1H), 4.95-4.92 (m, 1H), 4.43-4.40 (m, 1H), 4.36 (s, 1H), 4.29-4.23 (m, 2H), 4.09-4.06 (m, 1H), 3.95-3.75 (m, 5H), 3.68-3.49 (m, 4H), 3.48-3.34 (m, 2H) 3.21-3.18 (m, 1H), 3.11-3.04 (m, 2H), 2.81-2.77 (m, 1H), 2.70-2.64 (m, 1H), 2.15-2.00 (m, 3H), 1.95-1.87 (m, 3H), 1.82-1.81 (m, 16H), 1.78-1.57 (m, 4H), 1.44-1.35 (m, 2H); ¹³C-RMN (126 MHz, D₂O): δ 181.28 (5C), 175.62 (1C), 110.27 (1C), 97.61 (1C), 95.29 (1C), 85.42 (1C), 81.02 (1C), 78.32 (1C), 74.52 (1C), 73.63 (1C), 72.63 (1C), 70.86 (1C), 69.54 (1C), 63.32 (1C), 60.16 (1C), 49.51 (1C), 49.04 (1C), 48.74 (1C), 42.57 (1C), 36.66 (1C), 35.84 (1C), 30.93 (1C), 30.63 (1C), 23.97 (2C), 23.22 (5C), 21.24 (1C), 20.89 (1C), 20.28 (1C) [α]_D +26.1° (c 0.5, H₂O).



3',4', 3''',4'''-tétradéhydro-5''-O-triphénylméthyle-N-1-NH₂-penta-N-Cbz-néomycine (**2.21**)

À une solution de **2.12** (0,394 g, 0,247 mmol) dans du DMF (20 mL) a été ajoutée une solution de 2M de LiOH aq. (3,00 ml). La réaction est agitée vigoureusement pendant 24 h, puis est parachéevée par l'ajout de NH₄Cl aq. La solution est extraite 3 fois par du CH₂Cl₂ et les phases organiques combinées sont séchées sur Na₂SO₄ et puis réduites sous vide. Le résidu a été dissous dans un minimum de CH₂Cl₂ puis purifié par chromatographie éclair (100% CH₂Cl₂ à 9% MeOH, avec des bonds de 1.0% MeOH) pour obtenir **2.21** (0.216 g, 60%) sous forme d'un solide blanc. m/z calculé pour C₈₂H₈₆N₆O₁₉ [M+H]⁺: 1459.60260, HRMS [M+H]⁺: 1459.60205; ¹H-RMN (400 MHz, (CD₃)₂SO): δ 7.43-7.04 (m, 40H), 6.64-6.61 (m, 1H), 5.74 (m, 2H), 5.50 (m, 1H), 5.30 (m, 2H), 5.17-4.96 (m, 13H), 4.60 (m, 1H), 4.26-4.21 (m, 2H), 4.07-4.03 (m, 5H), 3.54-2.96 (m, 12H), 1.80-1.62 (m, 2H), 1.21-1.11 (m, 1H). ¹³C-RMN (101 MHz, (CD₃)₂SO): δ 156.84-155.62 (5C), 143.74 (3C), 137.26-136.85 (5C), 129.97 (1C), 128.42-127.04 (41C), 125.67 (1C), 125.30 (1C), 107.75 (1C), 98.08 (1C), 96.36 (1C), 86.21 (1C), 86.04 (1C), 82.16 (1C), 80.84 (1C), 80.03 (1C), 77.91 (1C), 77.93 (1C), 72.86 (1C), 68.04 (1C), 65.58-65.32 (5C), 64.44 (1C), 51.13 (1C), 51.06 (1C), 47.68 (1C), 46.62 (1C), 44.11 (1C), 44.06 (1C), 36.75 (1C). [α]_D 4.9° (c 0.333, MeOH).

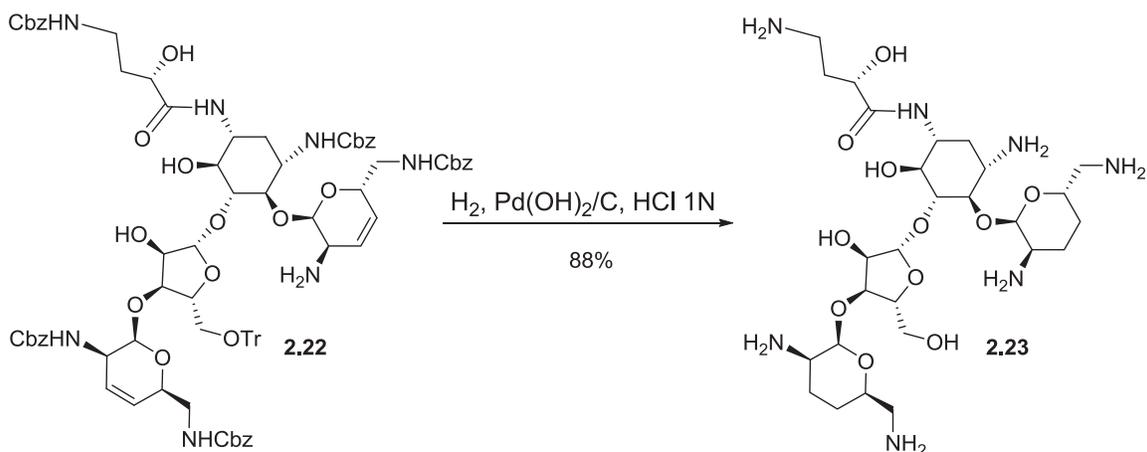


3',4',3''',4''-tétradéhydro-5''-O-triphénylméthyle-N-1-HABA-penta-N-Cbz-néomycine

(2.22)

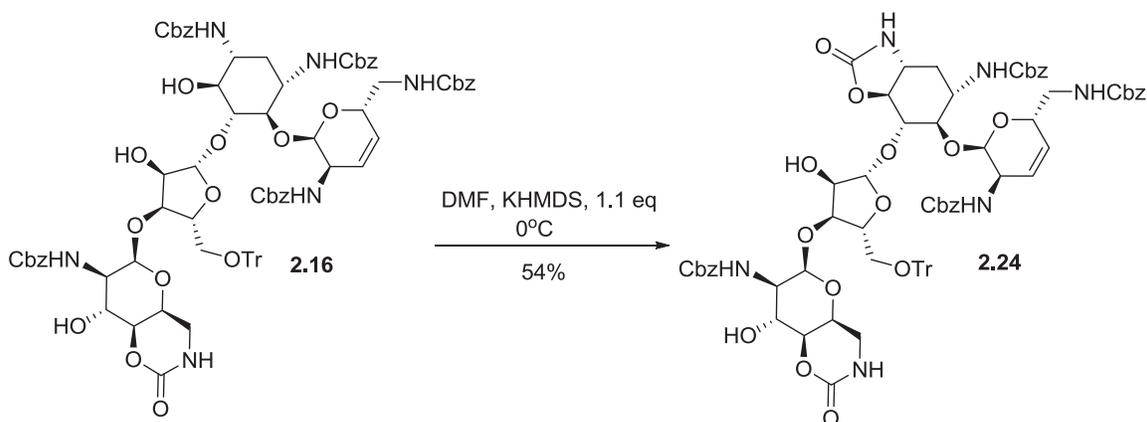
L'acide HABA-Cbz (0,095g, 0,377 mmol), DCC (0,078 g, 0,377 mmol) et du *N*-hydroxysuccinimide (0,043 g, 0,377 mmol) dans du THF (10 mL) ont été ajoutés et agités à température pièce pour 30 min. À cette solution ont été ajoutés **2.21** (0,220 g, 0,151 mmol) et de la Et₃N (0,126 ml, 0,905 mmol). La réaction est ensuite agitée à température pièce pendant 2.5 h. Le solvant est ensuite évaporé et le résidu est dissous dans de l'AcOEt. La phase organique a été lavée avec une solution de HCL 2.0 M, avec une solution saturée de NaHCO₃ et finalement par une solution de saumure. La phase organique a été séchée sur Na₂SO₄, puis concentrée sous pression réduite. Le résidu a été dissous dans un minimum de CH₂Cl₂ puis purifié par chromatographie éclair (100% CH₂Cl₂ à 3% MeOH, avec des bonds de 0.5% MeOH) pour obtenir **2.22** (0.210 g, 82%) sous forme d'un solide blanc. *m/z* calculé pour C₉₄H₉₉N₇O₂₃ [M+H]⁺: 1694.68706, [M+Na]⁺: 1716.66845, HRMS [M+Na]⁺: 1716.66429; ¹H-RMN (400 MHz, (CD₃)₂SO): δ 7.64 (d, 7.6 Hz, 1H), 7.43-7.15 (m, 43H) 7.05 (m, 1H), 6.64 (d, 9.2 Hz, 1H), 5.77-5.71 (m, 2H), 5.53-5.48 (m, 2H), 5.30-5.25 (m, 2H), 5.18 (m, 2H), 5.08-4.94 (m, 12H), 4.81-4.78 (m, 3H), 4.58 (m, 1H), 4.25-3.85 (m, 8H), 3.63-3.42 (m, 5H), 3.25-2.83 (m, 8H), 1.85-1.76 (m, 2H), 1.60-1.57 (m, 1H), 1.39-1.35 (m, 1H); ¹³C-RMN (101 MHz, (CD₃)₂SO): δ 173.68 (1C), 156.85-155.62 (6C), 143.73 (3C), 137.16 (6C), 129.99 (1C), 128.43-127.06 (46C), 125.68 (1C), 125.32 (1C), 108.10 (1C), 98.20 (1C), 96.40 (1C), 86.07 (1C), 82.86 (1C), 80.40 (1C), 80.01 (1C), 77.42 (1C), 73.58 (1C), 72.90 (1C), 69.29 (1C), 67.95 (1C), 65.58-65.24 (6C), 64.40 (1C), 55.04 (1C), 50.75 (1C), 49.13

(1C), 47.69 (1C), 46.61 (1C), 44.12 (1C), 44.06 (1C), 37.26 (1C), 34.76 (1C), 34.31 (1C).
[α]_D -3.1° (*c* 0.5, CHCl₃).



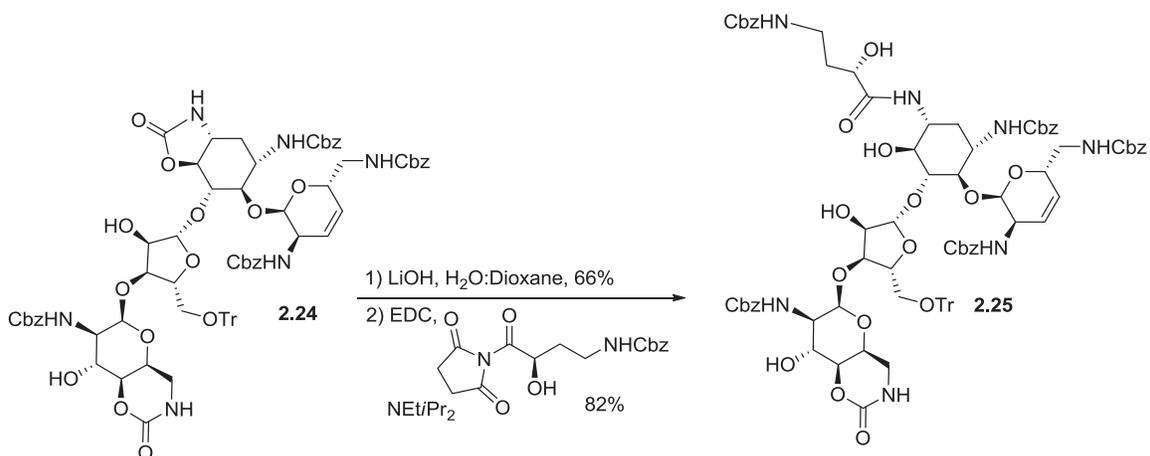
3',4',3''',4''-tétradésoxy-N-1-HABA-néomycine (2.23)

Le composé **2.22** (0,034 g, 0,019 mmol) a été dissous dans une solution 4 N de HCl et d'eau (4 :1) (5 ml). On ajoute à cette solution du 20% Pd(OH)₂/C (20 mg, 0,003 mmol) et on agite vigoureusement sous atmosphère d'hydrogène (ballon de vaudruche) pendant 12 h. On filtre alors sur célite et on lyophilise pour obtenir un résidu qui est ensuite purifié par une chromatographie éclair (2 :3 :2, CHCl₃ :MeOH :NH₄OH aq.) pour obtenir le produit **2.23** (9,0 mg, 88%). Le produit est transformé en sel d'acétate à des fins de caractérisation. Pour ce faire, le produit est dilué dans de l'eau (5 mL) et à cette solution a été ajouté de l'acide acétique glacial (50 µL). La solution est ensuite lyophilisée à nouveau pour isoler le produit sous forme d'un sel d'acétate. *m/z* calculé pour C₂₇H₅₃N₇O₁₁ [M+H]⁺: 652.38813, [M+Na]⁺: 674.36975, HRMS [M+Na]⁺: 674.36953; ¹H-RMN (400 MHz, D₂O): δ 5.72 (m, 1H), 5.28 (bs, 1H), 4.91 (s, 1H), 4.55 (m, 1H) 4.38 (m, 1H), 4.27 (m, 1H), 4.22-4.20 (m, 1H), 4.10-4.06 (m, 2H), 3.91 (m, 1H), 3.83-3.59 (m, 6H), 3.19-2.95 (m, 9H), 2.07-1.87 (m, 5H), 1.82 (m, 18H), 1.62-1.41 (m, 6H); ¹³C-RMN (101 MHz, D₂O): δ 180.09 (5 C), 175.59 (1C), 110.10 (1C), 97.24 (1C), 93.92 (1C), 86.20 (1C), 80.66 (1C), 77.79 (1C), 74.17 (1C), 73.77 (1C), 72.99 (1C), 72.29 (1C), 69.14 (1C), 65.19 (1C), 60.00 (1C), 49.91 (1C), 48.84 (1C), 48.51 (1C), 47.29 (1C), 42.31 (1C), 42.18 (1C), 36.24 (1C), 31.98 (1C), 30.51 (1C), 25.38 (1C), 23.67 (1C), 22.86 (5C), 20.68 (1C), 20.51 (1C). [α]_D 42.1° (c 0.20, H₂O)



3',4'-didéhydro-1,6-*N,O*-Carbonyle-6''',4''-*N,O*-Carbonyle-5''-*O*-triphénylméthyle-penta-*N*-Cbz-néomycine (2.24)

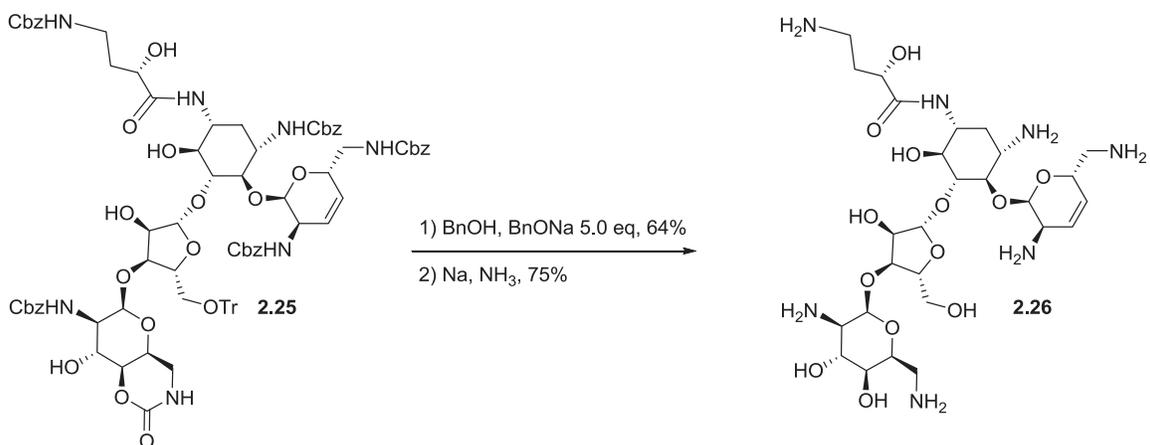
Une solution de **2.20** (1,150 g, 0,757 mmol) dans du DMF anhydre (25 mL) a été refroidie à 0°C, puis a été ajouté du KHMDS (0.5 M dans du toluène, 1,82 mL, 0.909 mmol). La réaction est vigoureusement agitée à cette température pendant 15 h, puis du KHMDS a été ajouté et la réaction a été agitée pendant 17 h supplémentaires avant d'être parachéevée par l'ajout de NH₄Cl aq. La solution est alors extraite 3 fois avec du CH₂Cl₂. Les phases organiques combinées sont séchées sur Na₂SO₄ et réduites sous vide. Le résidu a été dissous dans un minimum de CH₂Cl₂ puis purifié par chromatographie éclair (100% CH₂Cl₂ à 5% MeOH, par nond de 0.5%). Le composé **2.24** a été isolé sous forme d'un solide blanc (0,580 g, 54%). *m/z* calculé pour C₇₆H₇₈N₆O₂₁ [M+H]⁺: 1411.5298, LRMS [M+H]⁺: 1411.6 ; ¹H-RMN (400 MHz, (CD₃)₂SO) : δ 7.81-7.77 (m, 1H), 7.42-7.15 (m, 32H), 7.03-7.00 (m, 1H), 6.39-6.36 (m, 1H), 5.99-5.96 (m, 1H), 5.38-5.34 (m, 1H), 5.35-4.85 (m, 13H), 4.22-3.91 (m, 8H), 3.80-3.71 (m, 3H), 3.69-3.52 (m, 2H), 3.37-3.27 (m, 6H), 3.13-2.99 (m, 4H), 2.99-2.89 (m, 1H), 2.01-1.95 (m, 1H), 1.46-1.38 (dd, *J* = 6 Hz, 23 Hz, 1H) ; ¹³C-RMN (101 MHz, (CD₃)₂SO): δ 160.33 (1C), 156.62-156.32 (4C), 151.91 (1C), 144.61 (3C), 137.55 (4C), 129.28-127.85 (36 C), 126.25 (1C), 107.48 (1C), 98.21 (1C), 97.37 (1C), 86.83 (1C), 83.47 (1C), 81.97 (1C), 80.93 (1C), 77.91 (1C), 77.13 (1C), 74.49 (1C), 72.60 (1C), 69.13 (1C), 68.09 (1C), 66.67-66.19 (4C), 65.15 (1C), 64.24 (1C), 53.70 (1C), 52.88 (1C), 52.68 (1C), 48.59 (1C), 44.79 (1C), 44.15 (1C), 33.27 (1C).



3',4'-didéhydro-6''',4'''-N,O-Carbonyl-N-1-HABA-5''-O-triphénylméthyle-penta-N-Cbz-néomycine (**2.25**)

À une solution de **2.24** (0,844 g, 0.598 mmol) dans du DMF (71 mL) et dans H₂O (7.1 ml) a été ajouté du LiOH aq. (0.5 M, 3.59 ml, 1.795 mmol). La réaction a été agitée à température pendant 6 h, pour être ensuite parachevée par l'ajout de NH₄Cl aq. La solution est ensuite extraite 3 fois à l'aide de CH₂Cl₂. Les phases organiques combinés sont ensuite séchées sur Na₂SO₄ et concentrées sous vide. Le résidu a été dissous dans un minimum de CH₂Cl₂ puis purifié par chromatographie éclair (100% CH₂Cl₂ à 12% MeOH, par bond de 3,0%). Le composé a été isolé sous forme d'un solide blanc (0,550 g, 66%). *m/z* calculé pour C₇₅H₈₀N₆O₂₀ [M+H]⁺: 1384.5427, LRMS [M+H]⁺: 1385.5 ; ¹H-RMN (400 MHz, (CD₃)₂SO) : δ 7.39-7.19 (m, 34H), 7.11-7.05 (m, 1H), 6.65-6.63 (m, 1H), 6.65-6.63 (m, 1H), 6.02 (s, 1H), 5.48-5.46 (m, 1H), 5.36-5.21 (m, 4H), 5.07-4.92 (m, 8H), 4.83-4.80 (m, 1H), 4.14-4.11 (m, 4H), 3.94 (m, 4H), 3.94 (m, 3H), 3.51-3.35 (m, 5H), 3.12-3.00 (m, 4H), 2.55 (m, 1H), 1.78-1.75 (m, 1H), 1.24-1.14 (m, 1H) ; ¹³C-RMN (101 MHz, (CD₃)₂SO): δ 156.37-155.69 (4C), 151.15 (1C), 143.80 (3C), 137.31-136.86 (4C), 128.42-127.07 (36C), 125.68 (1C), 108.27 (1C), 97.41 (1C), 96.22 (1C), 86.12 (1C), 82.87 (1C), 80.51 (1C), 79.81 (1C), 77.30 (1C), 76.95 (1C), 73.74 (1C), 72.61 (1C), 68.06 (1C), 67.28 (1C), 65.77-65.24 (4C), 64.04 (1C), 63.39 (1C), 55.04 (1C), 52.15-51.92 (1C), 50.94-50.85 (1C), 47.67 (1C), 44.14 (1C), 43.36 (1C), 36.24 (1C). L'acide HABA-Cbz (0,073g, 0,289 mmol), DCC (0,060 g, 0,289 mmol) et du *N*-hydroxysuccinimide (0,033 g, 0,289 mmol) dans du THF (9,6 mL) ont été ajoutés et agités à température pièce pour 30 min. À cette solution ont été ajoutés le composé

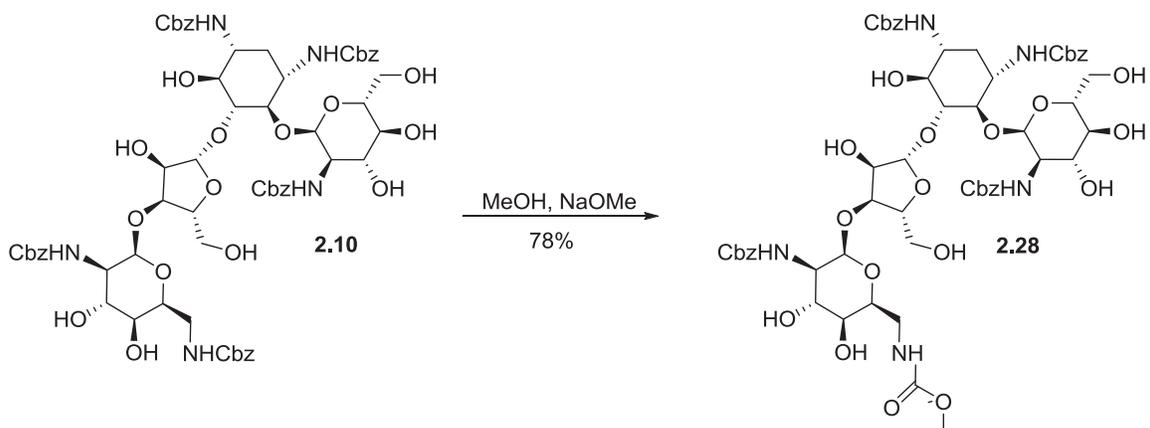
précédent (0.200 g, 0,144 mmol) et de la NEt_2Pr_2 (0,100 mL, 0.578 mmol). La réaction est ensuite agitée a température pièce pendant 3.0 h. Le solvant est ensuite évaporé et le résidu est dissous dans de l'AcOEt. La phase organique a été lavée avec une solution de HCL 2.0 M, avec une solution saturée de NaHCO_3 et finalement par une solution de saumure. La phase organique a été séchée sur Na_2SO_4 , puis concentrée sous pression réduite. Le résidu a été dissous dans un minimum de CH_2Cl_2 puis purifié par chromatographie éclair (100% CH_2Cl_2 à 5% MeOH, avec des bonds de 0.5% MeOH) pour obtenir **2.25** (0.210 g, 82%) sous forme d'un solide blanc. m/z calculé pour $\text{C}_{87}\text{H}_{93}\text{N}_7\text{O}_{24}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1620.6350, LRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1620.7; ^1H -RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ 7.65-7.59 (m, 1H), 7.39-7.19 (m, 40H), 7.08-6.97 (m, 1H), 6.71-6.59 (m, 1H), 6.03-5.95 (m, 1H), 5.56-5.51 (m, 1H), 5.51-5.42 (m, 1H), 5.43-5.15 (m, 5H), 5.03-4.91 (m, 11H), 4.88-4.76 (m, 1H), 4.14-4.09 (m, 5H), 3.94-3.87 (m, 4H), 3.82-3.75 (m, 1H), 3.64-3.43 (m, 6H), 3.11-3.10 (m, 6H), 1.88-1.71 (m, 1H), 1.63-1.55 (m, 1H), 1.35 (m, 1H); ^{13}C -RMN (101 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ 173.64 (1C), 156.41-155.60 (5C), 151.15 (1C), 143.79 (3C), 137.34-136.84 (5C), 128.45-127.07 (41C), 125.69 (1C), 108.57 (1C), 97.44 (1C), 96.22 (1C), 86.13 (1C), 83.69 (1C), 80.03 (1C), 79.80 (1C), 76.97 (1C), 73.74 (1C), 73.41 (1C), 72.70 (1C), 69.27 (1C), 67.90 (1C), 67.26 (1C), 65.78-65.24 (5C), 64.01 (1C), 63.38 (1C), 52.00 (1C), 50.70 (1C), 49.03 (1C), 47.63 (1C), 44.24 (1C), 43.36 (1C), 37.25 (1C), 34.77 (1C), 34.28 (1C).



3',4'-didéhydro-*N*-1-HABA-néomycine (2.26)

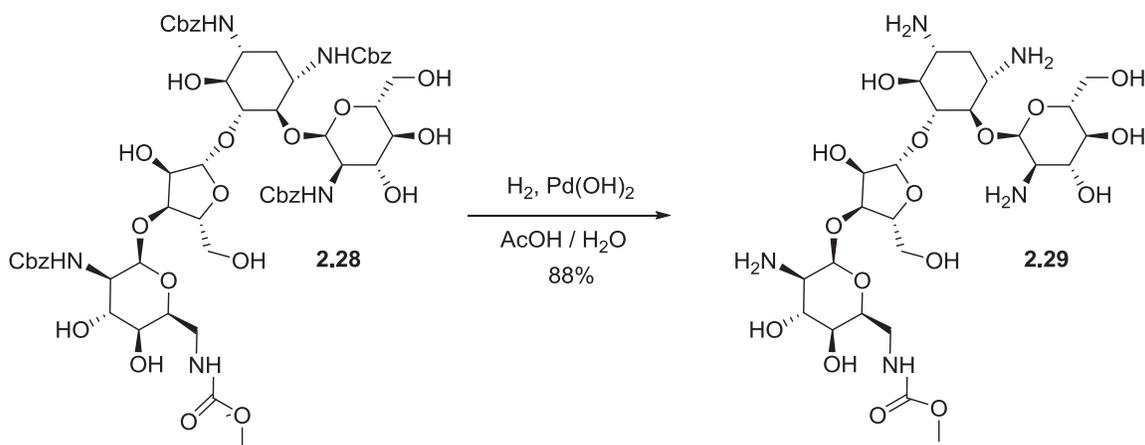
Le composé **2.25** (0,100g, 0,0617 mmol) a été dissous dans de l'alcool benzylique (2.5 ml). À cette solution est ajouté de l'alkoxide de benzyle de sodium (1M dans de l'alcool benzylique, 0,124 mL, 0,124 mmol). La réaction est agitée à température pièce pendant 24 h avant d'être parachevée par l'ajout de NH₄Cl aq. On extrait alors la solution au CH₂Cl₂, puis on sèche les phases organiques combinées sur Na₂SO₄ et on réduit sous vide. Le résidu a été dissous dans un volume de CH₂Cl₂ (5 mL) et purifié par chromatographie éclair (100% CH₂Cl₂ jusqu'à que tout l'alcool benzylique soit sorti, puis jusqu'à 5% MeOH, en augmentant par bond de 1,0%). Le composé a été isolé sous forme d'un solide blanc (0,069 g, 64%). *m/z* calculé pour C₉₄H₁₀₁N₇O₂₅ [M+H]⁺: 1728.6925, LRMS [M+H]⁺: 1728.7 ; ¹H-RMN (400 MHz, (CD₃)₂SO): δ 7.62-7.59 (m, 1H), 7.39-7.02 (m, 45H), 7.10-7.02 (m, 1H), 6.60-6.58 (m, 1H), 6.10-6.07 (m, 1H) 5.55-5.49 (m, 3H), 5.27-4.92 (m, 16H), 4.77-4.72 (m, 2H), 4.21-4.15 (m, 2H), 3.98-3.71 (m, 6H), 3.59-3.40 (m, 6H), 3.19-2.98 (m, 7H), 1.82-1.75 (m, 2H), 1.58-1.56 (m, 1H), 1.36-1.33 (m, 1H) ; ¹³C-RMN (101 MHz, (CD₃)₂SO): δ 173.63 (1C), 156.55-155.63 (6C), 143.81 (3C), 137.17 (6C), 129.14-126.78 (46C), 125.80 (1C), 108.94 (1C), 97.86 (1C), 96.05 (1C), 86.11 (1C), 84.51 (1C), 80.07 (1C), 76.63 (1C), 73.53 (1C), 73.20 (1C), 72.53 (1C), 72.27 (1C), 69.98 (1C), 69.27 (1C), 69.27 (1C), 67.76 (1C), 66.57 (1C), 65.88-64.90 (6C), 64.25 (1C), 64.11 (1C), 52.53 (1C), 50.58 (1C), 49.02 (1C), 47.60 (1C), 44.43 (1C), 37.25 (1C), 34.73 (1C). Le composé précédent (0,038 g, 0,022 mmol) a été dissous dans du THF anhydre (2 mL) et refroidi à -78°C. NH₃ (5 mL) a été condensé à l'aide d'un " Cold Finger ". De petits morceaux de sodium métallique sont alors ajoutés au ballon jusqu'à

que la couleur bleu marine persiste. Ensuite, après 15 min on parachève en ajoutant quelques gouttes de NH_4Cl aq. et le solvant est évaporé sous un flux d'argon. On dissout le résidu dans un minimum de solvant et on purifie par chromatographie éclair (2:3:2 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$). On évapore les solvants à basse température, puis on lyophilise pour obtenir **2.26**, un solide blanc (0,011 g, 75%). Le produit est transformé en sel d'acétate à des fins de caractérisation. Pour ce faire, le produit est dilué dans de l'eau (5 mL) et à cette solution a été ajouté de l'acide acétique glacial (50 μL). La solution est ensuite lyophilisée à nouveau pour isoler le produit sous forme d'un sel d'acétate. m/z calculé pour $\text{C}_{27}\text{H}_{51}\text{N}_7\text{O}_{13}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 682.36231, HMRS $[\text{M}+\text{H}]^+$: 682.3630 ^1H -RMN (400 MHz; D_2O): δ 6.12-6.06 (m, 1H), 5.98-5.94 (m, 1H), 5.61-5.57 (m, 1H), 5.23-5.15 (m, 2H), 4.42-4.38 (m, 1H), 4.28-4.20 (m, 3H), 4.16-4.07 (m, 3H), 3.94-3.53 (m, 8H), 3.49-3.43 (m, 1H), 3.37-3.22 (m, 3H), 3.20-3.16 (m, 2H), 3.12-3.05 (m, 2H), 2.15-2.04 (m, 2H), 1.93-1.87 (m, 1H), 1.82 (s, 12H) 1.65-1.59 (m, 1H). ^{13}C -RMN (101 MHz; D_2O): δ 181.70 (1C), 175.96 (4C), 130.70 (1C), 121.87 (1C), 110.67 (1C), 96.08 (1C), 93.51 (1C), 85.61 (1C), 81.88 (1C), 78.34 (1C), 76.40 (1C), 73.79 (1C), 73.59 (1C), 70.53 (1C), 70.45 (1C), 69.89 (1C), 68.15 (1C), 67.76 (1C), 61.36 (1C), 51.29 (1C), 49.43 (1C), 49.15 (1C), 45.31 (1C), 41.32 (1C), 40.82 (1C), 36.97 (1C), 31.27 (1C), 30.63 (1C), 23.56 (4C).



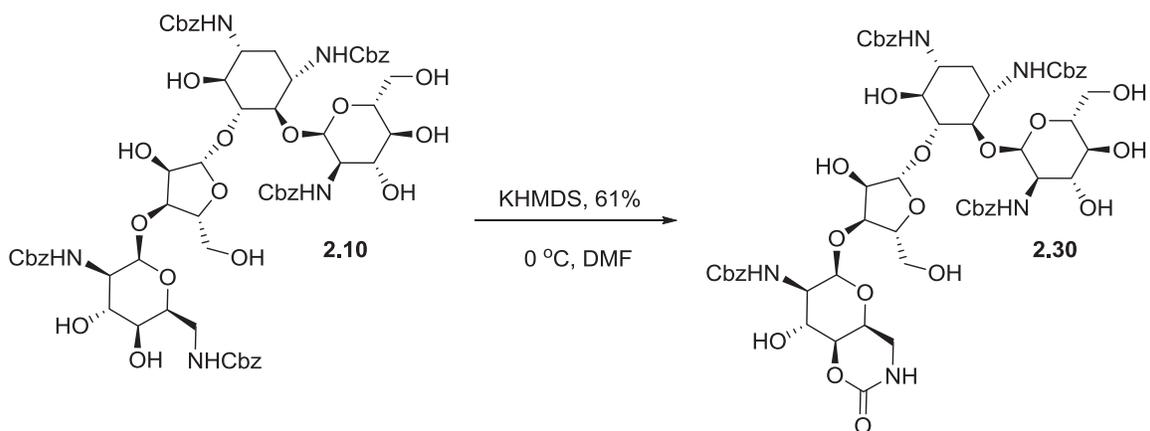
6'''-*N*-Carbométhoxy-tétra-*N*-Cbz-paromomycine (2.28)

Le composé **2.4** (0,150 g, 0,112 mmol) est dissous dans du MeOH anhydre (5 mL). On ajoute du méthanolate de sodium goutte-à-goutte et on laisse réagir pendant 48 h à température pièce. On parachève par l'ajout de glace carbonique et on réduit sous vide. Le résidu a été dissous dans un minimum de CH₂Cl₂ puis purifié par chromatographie éclair (100% CH₂Cl₂ à 3% MeOH, par bond de 1.0%). Le composé **2.28** (0,110 g, 80%) a été isolé sous forme d'un solide blanc. *m/z* calculé pour C₅₇H₇₁N₅O₂₄ [M+H]⁺: 1225.1927, LRMS [M+H]⁺: 1225.2; ¹H-RMN (400 MHz; MeOD) : δ 7.40-7.32 (m, 20H), 5.20-5.00 (m, 12H), 4.61 (s, 3H), 3.64 (m, 26H), 2.02-1.95 (m, 1H), 1.48-1.35 (m, 1H); ¹³C-RMN (101 MHz, MeOD) : δ 154.21 (1C), 153.48-152.75 (4C), 136.95-132.36 (4C), 124.26-121.85 (20C), 105.03 (1C), 94.63 (1C), 81.61 (1C), 77.92 (1C), 75.33 (1C), 72.35 (1C), 70.17 (1C), 69.76 (1C), 69.16 (1C), 68.90 (1C), 67.05 (1C), 65.88 (1C), 63.52 (1C), 62.22-61.81 (4C), 59.55 (1C), 57.43 (1C), 57.12 (1C), 52.81 (1C), 52.04 (1C), 51.52 (1C), 48.38 (1C), 47.06 (1C), 46.62 (1C), 36.86 (1C), 29.69 (1C). [α]_D 30.8° (*c* 1.0, MeOH).



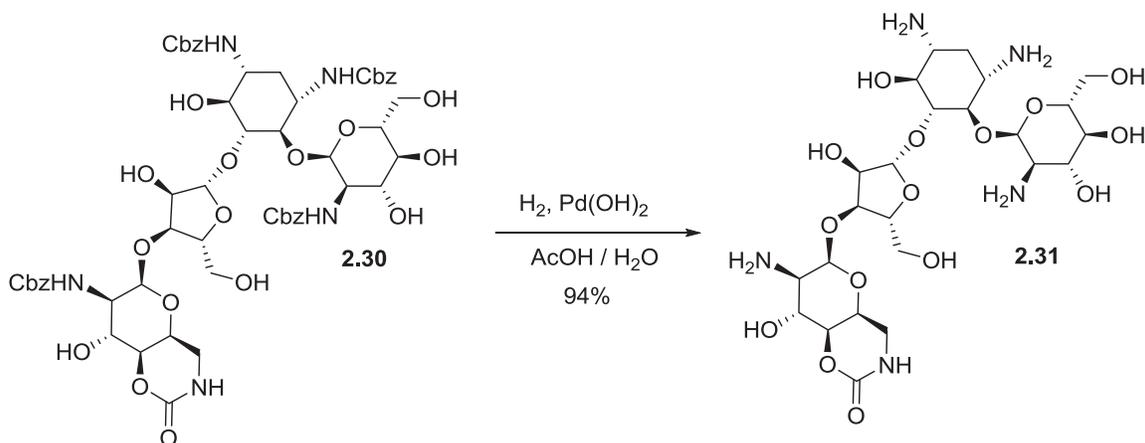
6'''-N-Carbométhoxy-paromomycine (2.29)

Le composé **2.28** (0,020 g, 0,0165 mmol) a été dissous dans une solution de l'AcOH et d'eau (4 :1) (5 mL). On ajoute à cette solution 20% Pd(OH)₂/C (15 mg, 0,002 mmol) et on agite vigoureusement sous atmosphère d'hydrogène (ballon de vaudruche) pendant 4 h. On filtre alors sur célite et on lyophilise pour obtenir un résidu qui est ensuite purifié par une chromatographie éclair (2 :3 :1, CHCl₃ :MeOH :NH₄OH aq.) pour obtenir le produit **2.29** (9.1 mg, 88%). Le produit est transformé en sel d'acétate à des fins de caractérisation. Pour ce faire, le produit est dilué dans de l'eau (5 mL) et à cette solution a été ajouté de l'acide acétique glacial (50 µL). La solution est ensuite lyophilisée à nouveau pour isoler le produit sous forme d'un sel d'acétate. *m/z* calculé pour C₂₅H₄₇N₅O₁₆ [M+H]⁺: 674.30961, LRMS [M+H]⁺: 674.1; ¹H-RMN (400 MHz; D₂O) δ 5.68 (bs, 1H), 5.28 (s, 1H), 5.09 (s, 1H), 4.25-4.23 (m, 2H), 4.14-4.10 (m, 3H), 3.95-3.57 (m, 14H), 3.44-3.25 (m, 7H), 2.02-1.95 (m, 1H), 1.48-1.35 (m, 1H); ¹³C-RMN (101 MHz; D₂O) : 180.20 (4C) 158.92 (1C), 109.58 (1C), 95.39 (1C), 94.95 (1C), 84.67 (1C), 81.37 (1C), 78.34 (2C), 75.51 (1C), 73.36 (1C), 72.54 (1C), 72.41 (1C), 70.54 (1C), 68.66 (1C), 67.31 (1C), 65.76 (1C), 60.09 (1C), 53.29 (1C), 52.18 (1C), 50.66 (1C), 49.68 (1C), 48.10 (1C), 40.21 (1C), 29.19 (1C), 39.69 (1C), 22.86 (4C). [α]_D +44.1° (c 0.3, H₂O)



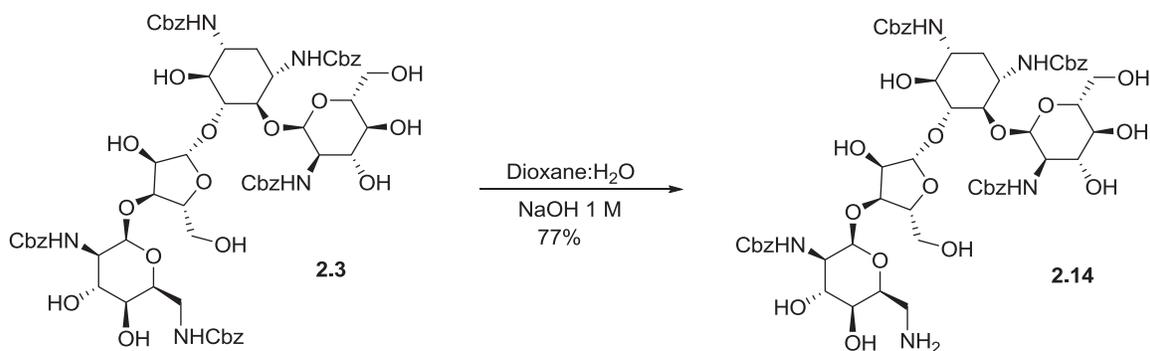
6''', 4''',-N,O-Carbonyl-tétra-N-Cbz-paromomycine (2.30)

À une solution de **2.4** (0,100 g, 0,078 mmol) dans du DMF anhydre (10 mL) a été refroidi à 0°C. Du KHMDS (0.5 M dans du toluène, 0,162 mL, 0,081 mmol) à été ajoutée goutte-à-goutte, puis la réaction est agitée vigoureusement à 0°C pendant 12 h. La réaction est parachevée par l'addition de NH₄Cl aq. et extraite à l'AcOEt. Les phases organiques combinées sont séchées sur Na₂SO₄ et réduites sous vide mécanique. Le résidu a été dissous dans un minimum de CH₂Cl₂ puis purifié par chromatographie éclair (100% CH₂Cl₂ à 15% MeOH, par bond de 3.0%). Le composé **2.30** a été isolé sous forme d'un solide amorphe blanc (0,056 g, 61%). m/z calculé pour C₅₆H₆₇N₅O₂₃ [M+H]⁺: 1177.42268, LRMS [M+H]⁺: 1178.6; ¹H-RMN (300 MHz, MeOD): δ 7.41-7.25 (m, 20H), 5.29-5.00 (m, 12H), 4.58 (s, 1H), 4.24-3.40 (m, 21H), 3.36-3.30 (m, 4H), 1.95 (m, 1H), 1.41 (m, 1H). ¹³C-RMN (75 MHz, MeOD): δ 158.18 (4C), 154.34 (1C), 137.70-137.53 (4C), 129.08-128.23 (20C), 109.73 (1C), 99.48-99.20 (1C), 86.70 (1C), 82.77 (1C), 79.89 (1C), 77.70-77.31 (1C), 75.50 (1C), 75.18 (1C), 74.83 (1C), 74.16 (1C), 72.24 (1C), 71.06 (1C), 68.72 (1C), 67.55-66.41 (4C), 63.99 (1C), 63.87 (1C), 62.75 (1C), 62.22 (1C), 57.13 (1C), 52.96 (1C), 52.12 (1C), 51.63 (1C), 44.32 (1C), 35.82 (1C). [α]_D +43.6° (c 0.5, MeOH)



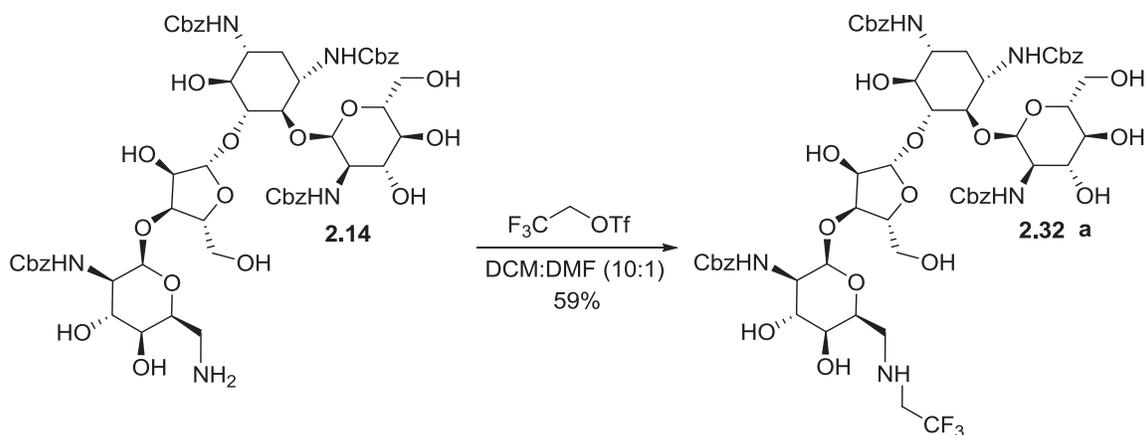
6''', 4'''-N,O-Carbyle-paromomycine (2.31)

Le composé **2.37** (0,040 g, 0,034 mmol) a été dissous dans une solution de l'AcOH et d'eau (4 :1) (5 mL). On ajoute à cette solution 20% Pd(OH)₂/C (15 mg, 0,002 mmol) et on agite vigoureusement sous atmosphère d'hydrogène (ballon de vaudruche) pendant 4 h. On filtre alors sur célite et on lyophilise pour obtenir un résidu qui est ensuite purifié par une chromatographie éclair (2 :3 :1, CHCl₃ :MeOH :NH₄OH aq.) pour obtenir le produit **2.31** (21,2 mg , 88%). Le produit est transformé en sel d'acétate à des fins de caractérisation. Pour ce faire, le produit est dilué dans de l'eau (5 mL) et à cette solution a été ajouté de l'acide acétique glacial (50 µL). La solution est ensuite lyophilisée à nouveau pour isoler le produit sous forme d'un sel d'acétate. *m/z* calculé pour C₂₄H₄₃N₅O₁₅ [M+H]⁺: 674.30961, LRMS [M+H]⁺: 674.1; ¹H-RMN (400 MHz; D₂O): δ 5.73 (bs, 1H), 5.32 (s, 1H), 5.11 (s, 1H), 4.25-4.23 (m, 2H), 4.15-4.08 (m, 3H), 3.93-3.52 (m, 12H), 3.41-3.22 (m, 6H), 2.02-1.95 (m, 1H), 1.82 (s, 14H), 1.45-1.34 (m, 1H) [α]_D +47.3 ° (c 0.3, H₂O).



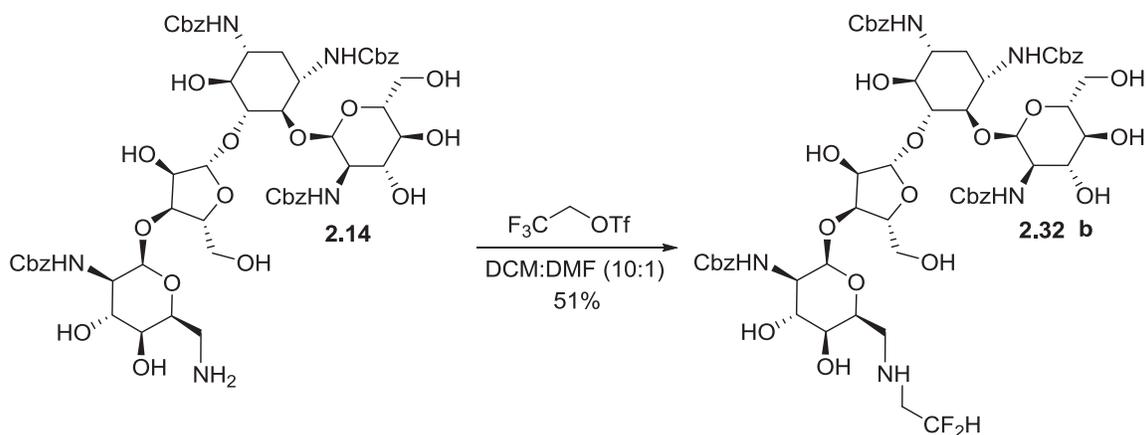
6'''-NH₂-Tétra-N-Cbz-paromomycine (2.14)

Du NaOH (1,5 g, 0,039 mol) a été dissous dans H₂O dans (30 mL) et cette solution a été ajoutée goutte-à-goutte à **2.4** (1,25 g, 0,972 mmol) dans du dioxane (50 mL). La réaction est agitée à température pièce pendant 24 h. Le dioxane est évaporé et de l'H₂O (50 mL) est ajouté à la solution. Le solvant est ensuite décanté, trituré à l'eau et le résidu a été dissous dans de l'AcOEt. La phase organique a été lavée avec une solution de HCL 2.0 M, puis avec une solution saturée de NaHCO₃. La phase organique a été séchée avec du Na₂SO₄, puis concentrée sous pression réduite. On isole alors **2.14** (0,862 g, 77%) sous forme d'une poudre blanche. Le produit est suffisamment pur pour être utilisé sans purification supplémentaire. Les données spectrales sont conformes à celles précédemment rapportés par Hanessian, S.; Szychowski, Compos-Reales Pineda, N. B.; Furtos, A., Keillor, J.W. 6-Hydroxy to 6'''-amino tethered ring-to-ring macrocyclic aminoglycosides as probe for APH(3')-IIIa kinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, p. 3221-3225



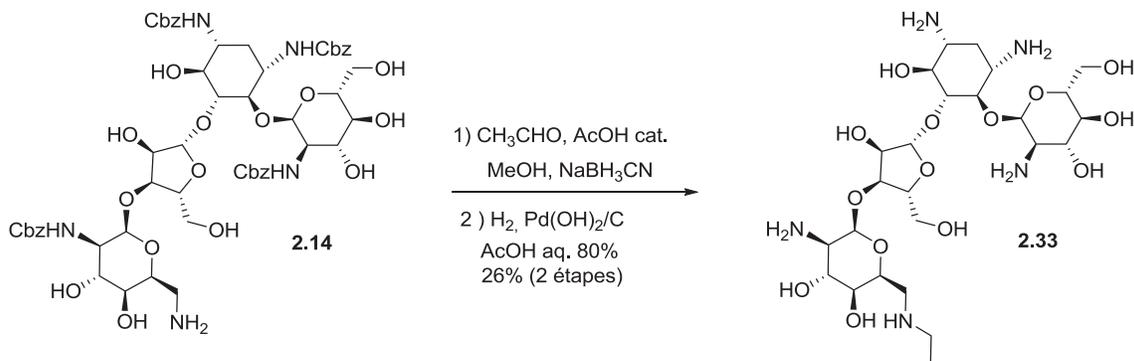
6'''-N-(2,2,2-Trifluoroéthyle)-tétra-N-Cbz-paromomycine (2.32a)

Le composé **2.14** (0,270 g, 0,234 mmol) a été dissous dans du toluène et réduit 3 fois à sec. Le composé fut alors dissout dans une solution anhydre de 10:1 CH₂Cl₂/DMF (10 mL) et refroidit à 0°C. La Et₃N (0,164 mL, 1,173 mmol) a été ajoutée puis le CF₃CH₂OTf (0,116 mL, 0,702 mmol) a été ajouté goutte-à-goutte. La réaction est agitée pendant 12 h supplémentaires à température pièce avant d'être parachéevée par l'ajout de NH₄Cl aq.. La solution est alors extraite 3 fois avec de l'AcOEt. Les phases organiques combinées sont séchées sur Na₂SO₄ et réduites sous vide. Le résidu a été dissous dans un minimum de CH₂Cl₂ puis purifié par chromatographie éclair (100% CH₂Cl₂ à 5% MeOH, par incrément de 0.5%). Le composé **2.32a** a été isolé sous forme d'un solide blanc (0,169 g, 59%). *m/z* calculé pour C₅₇H₇₀F₃N₅O₂₂ [M+H]⁺: 1234,45428, LRMS [M+H]⁺: 1234.6; ¹H-RMN (400 MHz, MeOD): δ 7.42-7.28 (m, 20H), 5.30 (m, 1H), 5.22-5.02 (m, 11H), 4.85 (m, 1H), 4.05-3.32 (m, 26H), 2.00-1.97 (m, 1H), 1.45-1.41 (m, 1H); ¹³C-RMN (101 MHz, MeOD): δ 157.78-156.76 (4C), 136.59-136.29 (4C), 127.86-126.72 (20C), 123.84 (q, *J*_{CF} = 278.48 Hz, 1C), 108.99 (1C), 98.67 (1C), 98.26 (1C), 85.65 (1C), 81.80 (1C), 79.15 (1C), 76.48 (1C), 74.18 (1C), 73.75 (1C), 73.03 (1C), 71.70 (1C), 70.91 (1C), 69.87 (1C), 69.73 (1C), 67.44 (1C), 66.36-65.71 (4C), 61.38 (1C), 61.01 (1C), 56.69 (1C), 55.91 (1C), 52.25 (1C), 50.84 (1C), 50.45 (1C), 40.09 (1C), 33.58 (1C); ¹⁹F-RMN (376 MHz; MeOD): δ -98,2 (t, *J* = 9,6 Hz, 3F) [α]_D 34.5° (*c* 1.2, MeOH)



6'''-N-(2,2-Difluoroéthyle)-tétra-N-Cbz-paromomycine (**2.32b**)

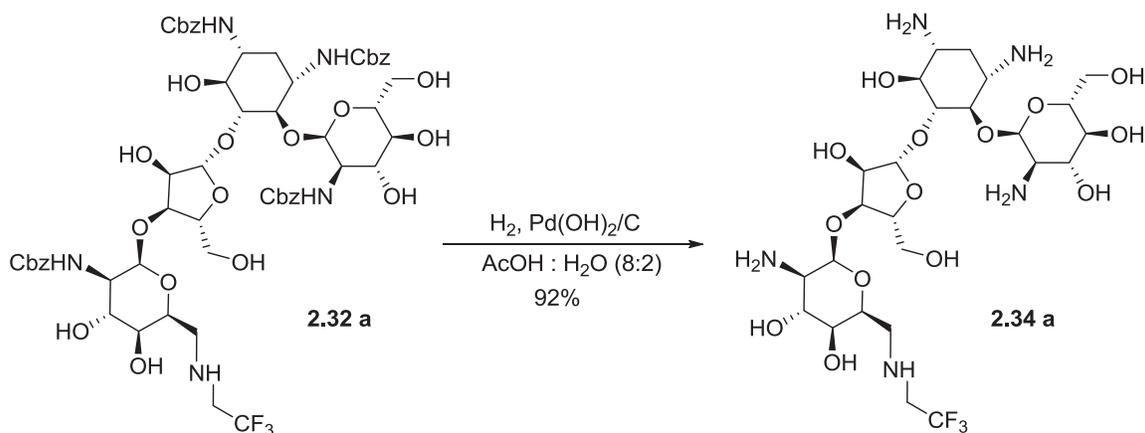
Le composé **2.14** (0,270 g, 0,234 mmol) a été dissous dans du toluène et réduit 3 fois à sec. Le composé a alors été dissous dans une solution anhydre de 10:1 CH₂Cl₂/DMF (10 mL) et refroidit à 0°C. La Et₃N (0,126 mL, 1,17 mmol) a été ajoutée puis le CF₂CH₂OTf (0,116 mL, 0,702 mmol) a été ajouté goutte-à-goutte. La réaction a été agitée 12 h à RT, puis parachevée avec l'ajout de quelques gouttes de NH₄Cl saturée. Le solvant a été réduit et le résidu dissous dans de l'AcOEt. La phase organique a d'abord été lavée avec une solution 2.0 M HCl, puis avec une solution saturée de NaHCO₃ et puis finalement avec une solution de saumure. La phase organique a été séchée avec du Na₂SO₄ et finalement concentrée sous pression réduite. Le résidu a été dissous dans un minimum de CH₂Cl₂ et purifié par chromatographie éclair (100% CH₂Cl₂ jusqu'à 12% MeOH, en augmentant par bond de 3,0%). Le composé **2.32b** a été isolé sous forme d'un solide blanc (0,116 g, 41%). *m/z* calculé pour C₅₇H₇₁F₂N₅O₂₂ [M+H]⁺: 1216.4637; LRMS [M+H]⁺: 1216.5; ¹H-RMN (400 MHz; MeOD): δ 7.36 (m, 20H), 5.92 (tt, *J*_{HF}= 56 Hz, 4,4 Hz, 1H), 5.32-5.28 (m, 1H), 5.11 (m, 10H), 4.11-4.06 (m, 2H), 3.92-3.55 (m, 22H), 3.07-2.84 (m, 4H), 2.02-1.92 (m, 1H), 1.49-1.26 (m, 1H); ¹³C-RMN (101 MHz; MeOD): δ 157.16-156.75 (4C), 136.46 (4C), 127.85-126.86 (20C), 115.55 (t, *J*_{CF}= 240.07 Hz, 1C), 108.58 (1C), 98.70 (1C), 98.03 (1C), 85.38 (1C), 81.55 (1C), 78.74 (1C), 76.26 (1C), 74.00 (1C), 73.68 (1C), 73.48 (1C), 72.95 (1C), 72.35 (1C), 72.09 (1C), 69.96 (1C), 69.79 (1C), 69.01 (1C), 68.29 (1C), 67.11-65.34 (4C), 62.87-62.28 (1C), 61.00 (1C), 55.90 (1C), 52.30 (1C), 50.82 (1C), 49.59 (1C), 33.07 (1C); ¹⁹F-NMR (376 MHz; CDCl₃): δ -123.54 (dt, *J* = 56.2, 15.5 Hz, 2F). [α]_D 32.6° (*c* 1.0, MeOH).



6'''-N-(Éthyle)-paromomycine (2.33)

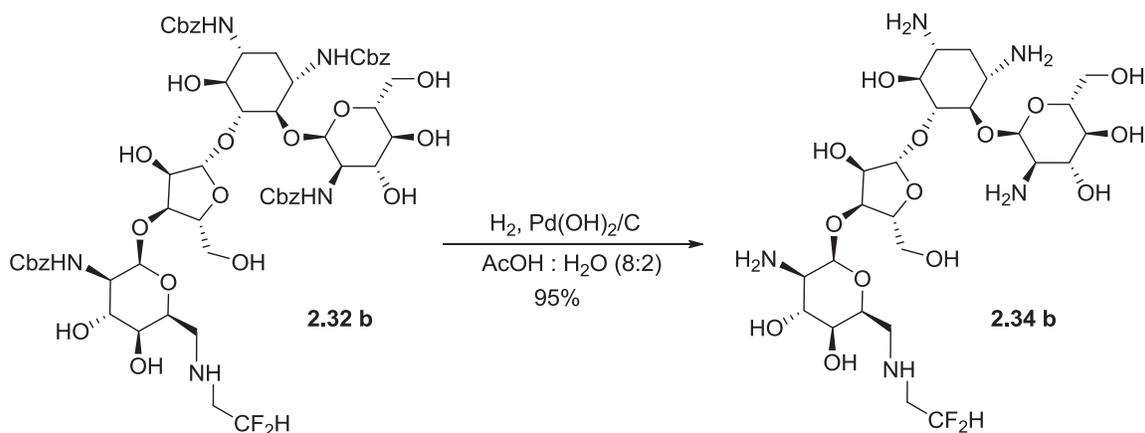
Le composé **2.14** (0,100 g, 0,086 mmol) a été dissous dans du MeOH (5 mL) anhydre, puis la solution est agitée et refroidie à -78°C . On ajoute la solution d'acétaldéhyde 1 M (solution fraîchement préparé) goutte-à-goutte et on laisse agiter pendant 5 minutes. On ajoute ensuite une goutte d'acide acétique 99%, puis le NaBH_3CN 1M goutte-à-goutte. La solution est laissée à -78°C pendant 15 minutes, puis quelques gouttes d'une solution saturée de NH_4Cl ont été ajoutées. Le solvant est réduit, puis le résidu est dissous dans de l'AcOEt. La phase organique est lavée avec une solution de NaHCO_3 , de saumure et séchée sur Na_2SO_4 . La phase organique est réduite sous vide pour donner un mélange de produit mono et bis alkylée. Le résidu a été dissous dans 5 mL d'une solution AcOH et eau (4 :1). On ajoute a cette solution du $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ 20% (15 mg) et on agite vigoureusement sous atmosphère d'hydrogène (ballon de vaudruche) pendant 4 h. On filtre alors sur célite et on lyophilise pour obtenir un résidu. On dissous le résidu dans un minimum de solvant et on purifie par chromatographie éclair (2:3:1 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$). On évapore les solvants à basse température, puis on lyophilise pour obtenir **2.33**, un solide blanc (0.014 g, 26%). Le produit est transformé en sel d'acétate à des fins de caractérisation. Pour ce faire, le produit est dilué dans de l'eau (5 mL) et à cette solution a été ajouté de l'acide acétique glacial (50 μL). La solution est ensuite lyophilisée à nouveau pour isoler le produit sous forme d'un sel d'acétate. m/z calculé pour $\text{C}_{25}\text{H}_{49}\text{N}_5\text{O}_{14}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 644.33543, LRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$: 644.3, HRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$: 644.33488; ^1H -RMN (400 MHz, D_2O) : δ 5.64 (s, 1H), 5.27 (s, 1H), 5.17 (s, 1H), 4.44-4.40 (m, 1H), 4.30-4.23 (m, 2H), 4.12-4.06 (m, 2H), 3.82-3.62 (m, 10H), 3.56-3.51 (m, 1H), 3.45 (m, 1H), 3.41-3.34 (m, 1H), 3.29-3.14 (m, 4H), 3.08-3.02 (m, 2H), 2.27-2.22 (m, 1H), 1.83-1.82 (m, 15H), 1.60-1.55 (m, 1H), 1.22-1.17 (m, 3H); ^{13}C -RMN (101

MHz, D₂O) : δ 180.93 (5C), 109.65 (1C), 95.70 (1C), 94.81 (1C), 84.32 (1C), 80.58 (1C), 78.69 (1C), 74.37 (1C), 73.10 (1C), 72.84 (1C), 72.48 (1C), 69.65 (1C), 68.83 (1C), 68.56 (1C), 67.26 (1C), 66.59 (1C), 59.84 (1C), 59.51 (1C), 53.60 (1C), 50.40 (1C), 49.65 (1C), 48.53 (1C), 47.14 (1C), 43.14 (1C), 29.46 (1C), 22.78 (5C), 10.02 (1C). $[\alpha]_D + 47.5^\circ$ (*c* 0.5, H₂O).



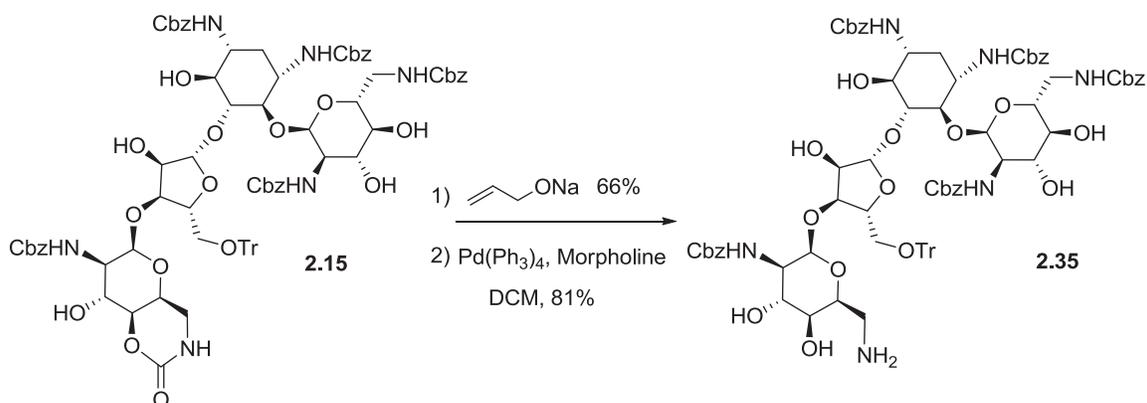
6'''-N-(2,2,2-Trifluoroéthyle)-paromomycine (2.34a)

Le composé **2.32a** (0,050 g, 0,0405 mmol) a été dissout dans 5 mL d'une solution de l'AcOH et d'eau (4 :1). On ajoute a cette solution Pd(OH)₂/C 20% (15 mg, 0.0214 mmol) et on agite vigoureusement sous atmosphère d'hydrogène (ballon de vaudruche) pendant 4 h. On filtre alors sur célite et on lyophilise pour obtenir le produit **2.34a** (0,020 g, 89%) sous forme d'un sel d'acétate. *m/z* calculé pour C₂₅H₄₆F₃N₅O₁₄ [M+H]⁺: 698.30560, HRMS [M+H]⁺: 698.30661; ¹H-RMN (400 MHz, D₂O): δ 5.72 (s, 1H), 5.42 (s, 1H), 5.21 (s, 1H), 4.40-4.37 (m, 1H), 4.26-4.11 (m, 5H) 4.15-4.14 (m, 1H), 3.91-3.52 (m, 11H), 3.43-3.22 (m, 6H), 2.34 (m, 1H), 1.79 (s, 13H), 1.71 (m, 1H) ¹³C-RMN: (126 MHz, D₂O): δ 181.01 (4C), 123.84 (q, *J*_{CF}= 278,46 Hz, 1C), 108.26 (1C), 96.04 (1C), 95.05 (1C), 84.87 (1C), 82.23 (1C), 81.15 (1C), 78.18 (1C), 73.87 (1C), 73.82 (1C), 72.88 (1C), 70.48 (1C), 69.33 (1C), 69.09 (1C), 67.72 (1C), 67.60 (1C), 67.29 (1C), 60.40 (1C), 59.85 (1C), 54.00 (1C), 51.05 (1C), 50.17 (1C), 49.02 (1C), 40.50 (1C), 29.12 (1C), 23.14 (4C); ¹⁹F RMN (282,26 MHz, D₂O): -98,2 (t, *J* = 9,6 Hz, 3F). [α]_D + 43.5° (*c* 0.33, H₂O)



6'''-N-(2,2-Difluoroéthyle)-paromomycine (2.34b)

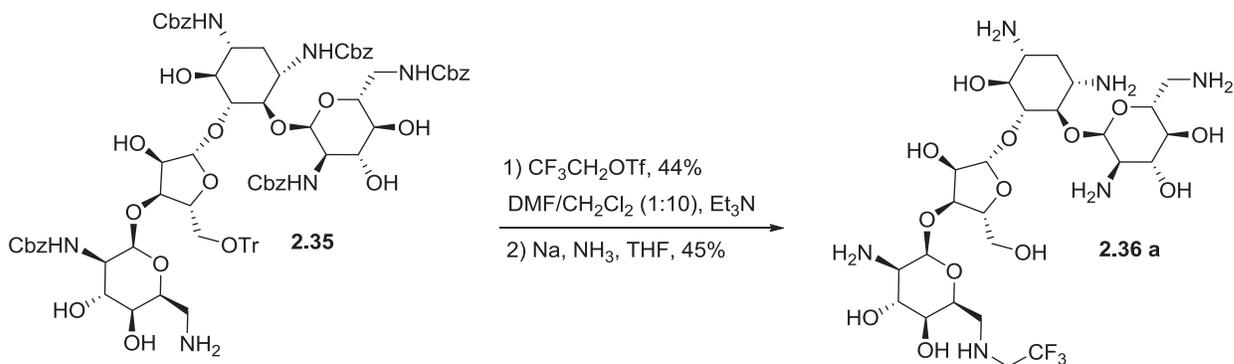
Le composé **2.31b** (0,040 g, 0,0329 mmol) a été dissous dans 5 mL d'une solution de l'AcOH et eau (4 :1). On ajoute à cette solution Pd(OH)₂/C 20% (15 mg, 0.0214 mmol) et on agite vigoureusement sous atmosphère d'hydrogène (ballon de vaudruche) pendant 4 h. On filtre alors sur célite et on lyophilise pour obtenir le produit **2.34 b** (0.026 g, 95%) sous forme d'un sel d'acétate. *m/z* calculé pour C₂₅H₄₆F₂N₅O₁₄ [M+H]⁺ : 680.31603, HRMS [M+H]⁺ : 680.31637; ¹H-RMN (400 MHz, D₂O), δ (ppm): 5.86 (dt, *J*= 54.6 Hz, 4.4 Hz, 1H), 5.75 (s, 1H), 5.43 (s, 1H), 5,23 (1H, s), 4.60-4.57 (m, 1H), 4.30-4.24 (m, 2H), 4.15-3.60 (m, 13H), 3.44-3.26 (m, 7H), 2.40-2.36 (m, 1H), 1.86 (s, 12H), 1,77-1,74 (m, 1H); ¹³C-RMN (101 MHz, D₂O): δ 181.27 (4C), 115.70 (t, *J*_{CF}= 113,28 Hz, 1C), 109.94 (1C), 96.29 (1C), 95.25 (1C), 84.50 (1C), 81.07 (1C), 78.99 (1C), 74.68 (1C), 73.64 (1C), 73.36 (1C), 72.84 (1C), 72.04 (1C), 69.32 (1C), 69.15 (1C), 67.76 (1C), 67.44 (1C), 60.36 (1C), 59.95 (1C), 54.02 (1C), 50.99 (1C), 50.07 (1C), 49.65 (1C), 49.00 (1C), 49.93 (1C), 29.56 (1C), 23.15 (4C) ¹⁹F-RMN (282,26 MHz, D₂O): -124.56 (dt, *J*= 15,5 Hz, 56,1 Hz) [α]_D +32.10° (*c* 0.7, MeOH).



6''-NH₂-Penta-N-Cbz-néomycine (2.35)

Le composé **2.10** (1,2 g, 0,772 mmol) est codistillé 3 fois dans le toluène. Le résidu est dissous dans de l'alcool allylique (20 ml). La solution est alors refroidie à 0°C, puis une solution d'alcoolate d'allyle (2,316 ml, 2,316 mmol) (une solution 1 M est préparée au préalable en ajoutant du sodium métallique à une solution anhydre d'alcool allylique) est ajoutée goutte-à-goutte. La solution est réchauffée à température pièce, puis agitée pendant 16 h. On ajoute quelques gouttes d'une solution saturée de NH₄Cl, puis on réduit sous vide. Le résidu est dissout dans de l'AcOEt et la phase organique est lavée avec une solution de HCl 2N, NaHCO₃, de saumure et finalement séchée sur Na₂SO₄. Le résidu est dissous dans du CH₂Cl₂ puis déposé sur un " tampon de silice " pour le purifier de l'alcool allylique. Une fois l'alcool allylique passé, le composé est assez pur pour être utilisé sans purification supplémentaire. On isole le produit (0,998 g, 80%) sous forme d'une poudre blanche. *m/z* calculé pour C₈₆H₉₄N₆O₂₅ [M+H]⁺: 1611.63469 LRMS: [M+Na]⁺: 1633.7; Le composé précédent (0,8 g, 0,578 mmol) est codistillé 3 fois dans le toluène. Le résidu est dissous dans du THF anhydre. On ajoute de la morpholine (2,53 mL; 0,0289 mol), puis le Pd(PH₃)₄ est ajouté (0,093 g, 0,058 mmol). La réaction est agitée sous argon pendant 16h, puis le solvant est réduit sous vide. Le résidu est dissous dans de l'AcOEt, puis lavé avec une solution de HCl 2N, NaHCO₃, de saumure, séchée sur Na₂SO_{4(s)}. La phase organique est alors réduite et le résidu est purifié par chromatographie éclair (gradient de 0 à 12% MeOH, par bond de 2%) sur silice. On isole le produit **2.35** (0,610 g, 68%) sous forme d'une poudre blanche. *m/z* calculé pour C₈₂H₉₀N₆O₂₃ [M+H]⁺: 1527.61356, LRMS: [M+H]⁺: 1527.8; ¹H-RMN (400 MHz, MeOD): δ 7.99-7.70 (m, 40H), 6.11 (m, 1H), 5.62-5.41 (m, 9H), 4.94-4.93 (m, 1H), 4.64-

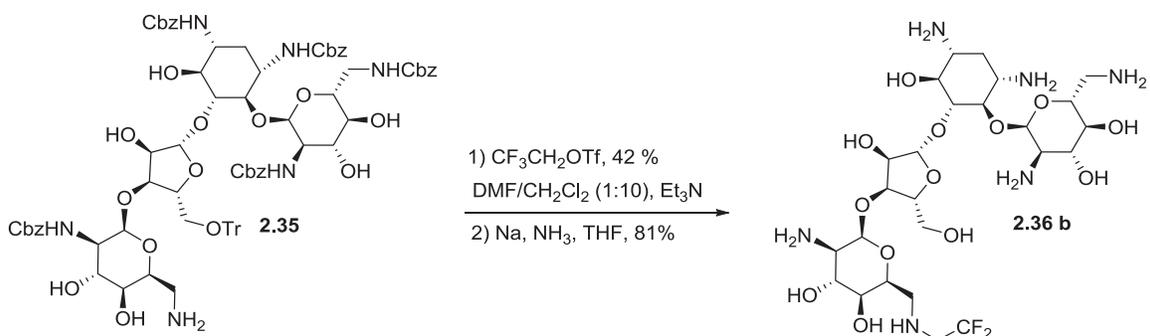
4.63 (m, 1H), 4.50-4.37 (m, 3H), 4.12-3.66 (m, 22H), 3.46-3.42 (m, 1H), 3.26-3.17 (m, 1H), 3.02 (m, 1H), 2.51-2.48 (m, 1H), 1.98-1.93 (m, 1H); ^{13}C -RMN (101 MHz, MeOD) : 157.41-156.62 (5C), 143.71 (3C), 136.54-136.31 (5C), 128.31-126.44 (m, 40C), 109.51 (1C), 98.19 (1C), 97.01 (1C), 86.24 (1C), 85.77 (1C), 80.91 (1C), 80.42 (1C), 77.92 (1C), 76.76 (1C), 73.95 (1C), 73.06 (1C), 71.26 (1C), 70.71 (1C), 69.79 (1C), 68.54 (1C), 66.28-65.71 (5C), 62.42 (1C), 55.19 (1C), 52.43 (1C), 51.42 (1C), 50.91 (1C), 49.99 (1C), 49.07 (1C), 41.18 (1C), 33.56 (1C). $[\alpha]_{\text{D}} +22.10^{\circ}$ (*c* 1.0, MeOH).



6'''-N-(2,2,2-Trifluoroéthyle)-néomycine (2.36a)

Le composé **2.35** (0,100 g, 0,066 mmol) a été dissous dans du toluène et réduit 3 fois à sec. Le composé a alors été dissous dans une solution anhydre de 10:1 CH_2Cl_2 /DMF (10 ml) et refroidis à 0°C . La Et_3N (0,064 mL, 0,458 mmol) a été ajouté puis le $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OTf}$ (0,047 ml, 0,327 mmol) a été ajouté goutte-à-goutte. La réaction est agitée pendant 12 h à température pièce avant d'être parachevée par l'ajout de NH_4Cl aq. La solution est alors extraite 3 fois avec du AcOEt et les phases organiques combinées sont séchées sur Na_2SO_4 et réduites sous vide. Le résidu a été dissous dans un minimum de CH_2Cl_2 puis purifié par chromatographie éclair (100% CH_2Cl_2 à 5% MeOH , par bond de 0.5%). Le composé a été isolé sous forme d'un solide blanc (0,047 g, 44%). m/z calculé pour $\text{C}_{84}\text{H}_{91}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_{23}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1609,61659 LRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1609.7. Le composé (0,035 g, 0,021 mmol) a été dissous dans du THF anhydre (2 mL) et refroidi à -78°C . NH_3 (5 mL) a été condensé à l'aide d'un " Cold Finger ". De petits morceaux de sodium métallique sont alors ajoutés aux ballons jusqu'à ce que la couleur bleu marine persiste. Ensuite, après 15 min on parachève en ajoutant quelques gouttes de NH_4Cl aq. et le solvant est évaporé sous un flux d'argon. On dissout le résidu dans un minimum de solvant et on purifie par chromatographie éclair (2:3:2 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$). On évapore les solvants à basse température, puis on lyophilise pour obtenir **2.36a**, un solide blanc (0,008 g, 45%). Le produit est transformé en sel d'acétate à des fins de caractérisation. Pour ce faire, le produit est dilué dans de l'eau (5 mL) et à cette solution a été ajouté de l'acide acétique glacial (50 μL). La solution est ensuite lyophilisée à nouveau pour isoler le produit sous forme d'un sel d'acétate. m/z calculé pour $\text{C}_{25}\text{H}_{47}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_{13}$ $[\text{M}+\text{Na}^+]$: 719.30509, HRMS $[\text{M}+\text{Na}^+]$: 719.30513; ^1H -RMN (700 MHz, D_2O): δ 5.84-5.81 (s, 1H), 5.28 (bs, 1H), 5.10-5.08 (m, 1H), 4.41-4.39 (m, 1H), 4.32-4.30 (m, 1H), 4.10-4.06

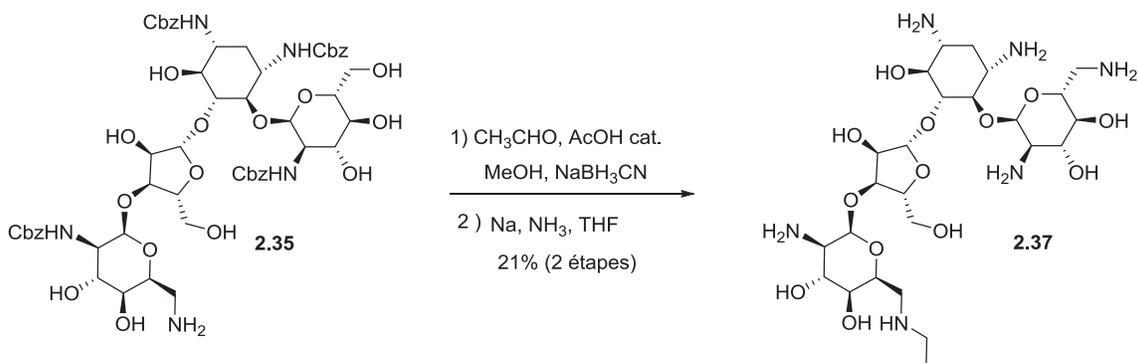
(m, 2H), 3.99-3.96 (m, 1H), 3.92-3.74 (m, 4H), 3.72-3.47 (m, 4H), 3.53-3.49 (m, 1H), 3.44-3.38 (m, 2H), 3.36-3.21 (m, 5H), 3.15-2.81 (m, 3H), 2.30-2.08 (m, 1H), 1.77 (m, 14H), 1.69-1.59 (m, 1H). ^{13}C -RMN (176 MHz, D_2O): δ 180.95 (4C), 124.74 (1C), 110.24 (1C), 95.52 (1C), 95.23 (1C), 85.11 (1C), 81.03 (1C), 74.51 (1C), 73.47 (1C), 73.01 (1C), 72.03 (1C), 71.02-70.92 (1C), 69.07 (1C), 68.32 (1C), 67.76 (1C), 62.44 (1C), 59.67 (1C), 53.68 (1C), 51.01 (1C), 50.21-50.07 (1C), 49.43 (1C), 49.25 (1C), 49.08 (1C), 48.47 (1C), 40.18 (1C), 29.76 (1C), 23.16-22.80 (4C) ^{19}F -RMN (282 MHz, D_2O): δ -124.58 (dt, $J = 56.2, 15.5$ Hz, 1F). $[\alpha]_{\text{D}} 25.7^\circ$ (c 0.333, H_2O).



6'''-N-(2,2-Difluoroéthyle)-néomycine (2.36b)

Le composé **2.35** (0,100 g, 0,066 mmol) a été dissous dans du toluène et réduit 3 fois à sec. Le composé a alors été dissous dans une solution anhydre de 10:1 CH_2Cl_2 /DMF (10 ml) et refroidis à 0°C . La Et_3N (0,064 mL, 0,458 mmol) a été ajoutée puis le $\text{CF}_2\text{CH}_2\text{OTf}$ (0,043 ml, 0,328 mmol) a été ajouté goutte-à-goutte. La réaction est agitée pendant 12 h à température pièce avant d'être parachevée par l'ajout de NH_4Cl aq. La solution est alors extraite 3 fois avec du AcOEt et les phases organiques combinés sont séchés sur Na_2SO_4 et réduites sous vide. Le résidu a été dissous dans un minimum de CH_2Cl_2 puis purifié par chromatographie éclair (100% CH_2Cl_2 à 5% MeOH, par bond de 0.5%). Le composé a été isolé sous forme d'un solide blanc (0,046 g, 42%). m/z calculé pour $\text{C}_{84}\text{H}_{93}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_{23}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1591,62601 LRMS $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1591,7 Le composé (0,035 g, 0,021 mmol) a été dissous dans du THF anhydre (2 mL) et refroidis à -78°C . NH_3 (5 mL) a été condensé à l'aide d'un " Cold Finger ". De petits morceaux de sodium métallique sont alors ajoutés aux ballons jusqu'à ce que la couleur bleu marine persiste. Ensuite, après 15 min on parachève en ajoutant quelques gouttes de NH_4Cl aq. et le solvant est évaporé sous un flux d'argon. On dissous le résidu dans un minimum de solvant et on purifie par chromatographie éclair (2:3:2 CHCl_3 /MeOH/ NH_4OH). On évapore les solvants à basse température, puis on lyophilise pour obtenir **2.36b**, un solide blanc (0,009 g, 81%). m/z calculé pour $\text{C}_{25}\text{H}_{47}\text{F}_2\text{N}_5\text{O}_{14}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 680.31658; $[\text{M}+\text{Na}^+]$: 702.29853, HRMS $[\text{M}+\text{Na}^+]$: 702.30013 ^1H -RMN (700 MHz, D_2O): δ 6.31-6.30 (m, 1H), 5.99 (s, 1H), 5.42 (s, 1H), 5.29 (s, 1H), 4.54-4.52 (m, 1H), 4.43-4.41 (m, 1H), 4.38-4.35 (m, 1H), 4.23-4.20 (m, 2H), 4.07-3.89 (m, 5H), 3.78-3.68 (m, 3H), 3.59-3.41 (m, 9H), 3.17 (m, 1H), 2.47-2.44 (m, 1H), 2.19 (s, 1H), 1.33-1.24 (m, 1H). ^{13}C -RMN (176 MHz, D_2O): δ 118.6 (t, $J_{\text{C}-\text{F}_2}=907.2$ Hz, 1C), 110.24 (1C), 95.607 (1C), 95.16 (1C), 84.83 (1C), 81.25 (1C), 75.98 (1C), 74.77 (1C), 73.50 (1C), 72.67 (1C), 70.75 (1C), 70.48 (1C), 69.39 (1C), 68.18 (1C),

67.66 (1C), 67.03 (1C), 59.98 (1C), 53.60 (1C), 50.89,(1C), 49.98 (1C), 48.92 (1C), 48.53 (1C), 40.24 (1C), 28.53 (1C), 8.28 (1C) ^{19}F -RMN (376 MHz; D_2O): δ -98,1 (t, J = 9,6 Hz, 3F)) $[\alpha]_{\text{D}}$ 33.4 ° (c 0.5, H_2O).



6'''-N-(Éthyle)-néomycine (2.37)

Le composé **2.35** (0,060 g, 0,039 mmol) a été dissous dans un du MeOH (5 ml) anhydre, puis la solution est agitée et refroidie à -78°C . On ajoute une solution d'acétaldéhyde 1 M fraîchement préparée dans le MeOH (0,039 ml, 0.039 mmol) goutte-à-goutte et on laisse agiter pendant 5 minutes. On ajoute ensuite une goutte d'acide acétique 99%, puis le NaBH₃CN 1M goutte-à-goutte. La solution est laissée à -78°C pendant 15 minutes, puis quelques gouttes d'une solution saturée de NH₄Cl ont été ajoutées. Le solvant est réduit, puis le résidu est dissous dans de l'AcOEt. La phase organique est lavée avec une solution de NaHCO₃, de saumure et séchée sur Na₂SO₄. La phase organique est réduite sous vide pour donner un mélange de produit mono et bis alkylé. Le mélange précédent a été dissous dans du THF anhydre (2 mL) et refroidi à -78°C . NH₃ (5 mL) a été condensé à l'aide d'un " Cold Finger ". De petits morceaux de sodium métallique sont alors ajoutés aux ballons jusqu'à ce que la couleur bleu marine persiste. Ensuite, après 15 min on parachève en ajoutant quelques gouttes de NH₄Cl aq. et le solvant est évaporé sous un flux d'argon. On dissout le résidu dans un minimum de solvant et on purifie par chromatographie éclair (2:3:0.5 à 2 :3 :2 CHCl₃/MeOH/NH₄OH). On évapore les solvants à basse température, puis on lyophilise pour obtenir **2.37**, un solide blanc (0,006 g, 21%). Le produit est transformé en sel d'acétate à des fins de caractérisation. Pour ce faire, le produit est dilué dans de l'eau (5 mL) et à cette solution a été ajouté de l'acide acétique glacial (50 μL). La solution est ensuite lyophilisée à nouveau pour isoler le produit sous forme d'un sel d'acétate. m/z calculé pour C₂₅H₄₉N₅O₁₄ [M+H]⁺: 644.33543, [M+Na⁺]: 666.31737, HRMS [M+Na⁺]: 666.31756 ¹H-RMN (700 MHz, D₂O) : δ 5.94 (s, 1H), 5.35 (s, 1H), 5.22 (s, 1H), 4.46-4.37 (m, 1H), 4.31-4.29 (m, 1H), 4.17-4.14 (m, 2H), 3.98-3.90 (m, 3H), 3.86-3.83 (m, 2H), 3.72-3.63 (m, 3H), 3.56-3.55 (m, 1H), 3.52 (s, 1H), 3.46 (dd,

$J = 11.8, 6.5$ Hz, 2H), 3.42-3.29 (m, 5H), 3.17-3.14 (m, 1H), 3.11-3.08 (m, 2H), 2.33-2.31 (m, 1H), 1.82-1.82 (m, 10H), 1.24 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H). ^{13}C -RMN (176 MHz, D_2O): δ 180.95 (4C), 110.24 (1C), 95.31 (1C), 95.18 (1C), 85.06 (1C), 81.20 (1C), 74.88 (1C), 73.35 (1C), 72.63 (1C), 70.96 (1C), 70.12 (1C), 69.28 (1C), 68.23 (1C), 67.64 (1C), 66.97 (1C), 62.46 (1C), 60.08 (1C), 53.66 (1C), 50.80 (1C), 50.08 (1C), 48.56 (1C), 47.51 (1C), 43.60 (1C), 40.34 (1C), 29.04 (1C), 22.99 (4C), 10.42 (1C). $[\alpha]_{\text{D}} 34.9$ °(c 0.25, H_2O).

Chapitre 4

Références

1. Iseman, M.D. Evolution of drug resistant tuberculosis : A tale of two species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1994**, *91*, 2428-2429.
2. 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.
3. Nicolaou, K.C.; Montagnon, T. *Molecules that Changed the World*. Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.
4. "Physiology or Medicine 1945 - Presentation Speech". Nobelprize.org. 2 Nov 2010 http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/press.html
5. *Biochemistry 3th edition*. Voet, D.; Voet J.G. John Wiley & Sons, New-York, **2004**.
6. 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.
7. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1952". Nobelprize.org. 2 Nov 2011 http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1952/
8. Waksman, S. A.; Lechevalier, H. A.; Harris, D. A. Neomycin production and antibiotic properties. *J. Clin. Invest.* **1949**, *28*, 934-939.
9. Frohardt, R. P.; Haskell, T. H.; Ehrlich, J.; Knudsen, M. P. Paromomycin. **1958**, German patent DE1025573, CAN 54:58641.
10. 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.
11. 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.
12. Kondo, S.; Yamamoto, H.; Naganawa, H.; Umezawa, H. Isolation and characterization of lividomycin A inactivated by *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* carrying R factor. *J. Antibiot.* **1972**, *25*, 483-484.
13. Dozzo, P.; Moser, H.E. New aminoglycoside antibiotics *Expert. Opin. Ther. Patents* **2010**, *20*, 1321-1341.

14. Gonzalez III, L.S; Spencer, J.P. Aminoglycosides : A Pratical Review *Am. Fam. Physician.* **1998**, *58*, 1811-1820.
15. 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.
16. Koch, K. F.; Davis, F. A. Structure of nebramycin factor 6, a new aminoglycosidic antibiotic. *Antimicrob. Ag. Chemother.* **1970**, 309-313.
17. 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.
18. 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.
19. Weinstein, M.J.; Marquez, J.A.; Testa, R.T.; Wagman, G.H.; Oden, E.M.; Waitz, J.A. Antibiotic 6640, a new Micromonospora-produced aminoglycoside antibiotic. *J. Antibiot.* **1970**, *23*, 551-554.
20. Munakata, K.; Oda, T.; Mori, T.; Ito, H. Production of antibiotic No. 2230, Japanese Patent No. 45005035, 6 pp. **1970**, CAN 72:131094.
21. A) 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. B) Mason, D.J.; Dietz, A.; Smith, R.M. Actinospectacin, a new antibiotic. I. Discovery and biological properties. *Antibiot. Chemother.* **1961**, *11*, 118-122. C) Walton, J.R. Apramycin, a new aminocyclitol antibiotic: I. *In vitro* microbiological studies *J. Antimicrob. Chemother.* **1978**, *4*, p. 309-313 D) Mann, R.L.; Bromer, W.W.; The Isolation of a Second Antibiotic from *Streptomyces hygroscopicus* *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 2714-2716. E) Pour plus d'exemples d'aminoglycosides atypiques veuillez vous référer à Magnet, S.; Blanchard, J.S. Molecular Insights into Aminoglycoside Action and Resistance. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 477-497.

22. Plotz, P.H.; Davis, B.D. Synergism between streptomycin and penicillin: a proposed mechanism *Science* **1962**, *135*, 1067-1068.
23. A) Green, R.; Noller, H. F. Ribosome and translation *Annual Review of Biochemistry* **1997**, *66*, 679-716. B) Ramakrishnan, V. Unravelling the structure of the ribosome (Nobel Lecture) *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4355-4380.
24. Davis, B.H. Mechanism of Bactericidal Action of Aminoglycosides *Microbiol. Rev.* **1987**, *53*, 341-350.
25. Lynch, S.R.; Puglisi, J.D. Structural Origins of Aminoglycoside Specificity for Prokaryotic Ribosomes *J. Mol. Biol.* **2001**, *306*, 1037-1058.
26. Kohanski, M. A; Dwyer, D. J.; Collins, J. J. How antibiotics kill bacteria: from target to networks *Nature Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 423-435.
27. Wimberly, B.T.; Brodersen, D.E.; Clemons Jr, W. M.; Morgan-Warren, R.J.; Carter, A.P.; Vornheim, C.; Hartsch, T.; Ramakrishnan, V. Structure of the 30S ribosomal subunit *Nature* **2000**, *407*, 327-339.
28. Alberts, S.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Robert, K.; Walter, P. Molecular Biology of the Cell, 3rd edition; **1998**
29. A) Ogle, J.M.; Carter, A.P.; Ramakrishnan, V. Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures *Trends Biochem Sci.* **2003**, *28*, 259-266. B) 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.
30. Berg, J.M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. Biochemistry, 5th edition, New York, W. H Freeman; **2002**.
31. Zaher, S.H., Green, R. Fidelity at the Molecular Level: Lessons from Protein Synthesis *Cell* **2009**, *136*, 746-762.
32. Fourmy, D.; Recht, M.I; Puglisi, J. D Binding of neomycin-class aminoglycoside antibiotics to the A-Site of 16S rRNA *J. Mol. Biol.* **1998**, *277*, 347-362.
33. A) Pape, T., Wintermeyer, W., Rodnina, M.V., Conformational switch in the decoding region of 16S rRNA during aminoacyl-tRNA selection on the ribosome *Nature Struct. Biol.* **2000**, *7*, 104-107. B) Ninio, J. Multiple stages in codon-

- anticodon recognition: double-trigger mechanisms and geometric constraints *Biochimie* **2006**, 88, 963–992.
34. Carter, A.P.; Clemons, W.M.; Brodersen, D.E.; Morgan-Warren, R.J.; Wimberly, B.T., Ramakrishnan, V. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunits and its interactions with antibiotics *Nature* **2000**, 407, 340–348.
 35. Lodmell, J.S. & Dahlberg, A.E. A conformational Switch in *Escherichia coli* 16S Ribosomal RNA During Decoding of Messenger RNA *Science* **1997**, 277, 1262–1267.
 36. Vincens, Q.; Westhof, E. Crystal Structure of Paromomycin docked into the Eubacterial Ribosomal Decoding A Site *Structure* **2001**, 9, 647–658.
 37. Kondo, J; Pachamuthu, K.; Francois, B.; Szychowski, J.; Hanessian, S; Westhof, E. Crystal structure of the bacterial ribosomal decoding site complexed with a synthetic doubly functionalized paromomycin derivative: a new specific binding mode to an a-minor motif enhances in vitro antibacterial activity. *ChemMedChem*. **2007** 11, p. 1631–1638.
 38. Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Hayete, B., Lawrence, C.A. & Collins, J.J. Reveals that treatment of Gram-positive and Gram-negative bacteria with lethal levels of bactericidal antibiotics induces the formation of hydroxyl radicals through a common mechanism involving drug-induced changes in NADH consumption and central metabolism, notably the TCA cycle *Cell* **2007**, 130, 97–810.
 39. Greenwood, D. Antimicrobial drugs: chronicle of a twentieth century medical triumph, Oxford University Press, New-York, **2008**, 342.
 40. S. Hæggman, S.; Löfdahl, S.; Paauw, A.; Verhoef, J.; Brisse, S. Diversity and Evolution of the Class A Chromosomal Beta-Lactamase Gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2004**, 2400–2408.
 41. Giske, C.G.; Monnet, D.L.; Cars, O.; Carmeli, Y. Clinical and Economic Impact of Common Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, 52, 813–821.
 42. A) Klevens, R.M.; Edwards, J.R.; Tenover, F.C.; McDonald, L.C.; Horan, T.; Gaynes, R. Changes in the epidemiology of methicillin-resistant

- Staphylococcus aureus* in intensive care units in US hospitals, 1992–2003. *Clin Infect. Dis.* **2006**, *42*, 389–391 B) Boucher, H.W.; Corey, G.R. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* *Clin. Infect. Dis.* **2008** *46* (Suppl 5) S344–9.
43. Hanberger, H; Garcia- Rodriguez, JA; Antibiotic susceptibility among aerobic gram negative bacilli in intensive care units in European countries. *JAMA* **1999**, *281*, 67-71.
44. Spellberg, B.; Guidos, R.; Gilbert, D.; Bradley, J.; Boucher, H.W.; Scheld, M. W., Bartlett, J. G.; Edwards Jr., J. The Epidemic of Antibiotic-Resistant Infections: A Call to Action for the Medical Community from the Infectious Diseases Society of America *CID (Center for Infectious Diseases)* **2008**, *46*, 155-164
45. Morić, I.; Savić, M., Ilić –Tomić, T.; Vojnović, S.; Bajkić, S.; Vasiljević rRNA Methyltransferase and their Role in Resistance to Antibiotics *J Med Biochem* **2010**, *29*, 165-174
46. A) Bryan, L.E.; Kwan, S. Roles of Ribosomal Binding, Membrane Potential, and Electron transport in Bacterial Uptake of Streptomycin and Gentamicin *Antimicrob. Agents Chemother.* **1983**, *23*, 835-846
47. Schlessinger, D. failure of Aminoglycoside Antibiotics to Kill Anaerobic, Low-pH, and Resistant Cultures *Clin. Microbiol. Rev.* **1988**, *1*, 54-59.
48. Arya, D. P. *Aminoglycoside antibiotics: From Chemical Biology to Drug Discovery* John Wiley & Sons, New-Jersey, **2007**
49. Poole, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance *J. Antimicrob. Chem.* **2005**, *56*, 20–51.
50. A) Valulenko, S.B.; Mobashery, S. Versatility of Aminoglycosides and Prospects for Their Future *Clin. Microbio Rev.* **2003**, *16*, 430-450. B) Mingeot-Leclercq, M.; Glupczynski, Y.; Tulkens, P. M. Aminoglycosides: Activity and Resistance *Antimicrob. Agents. Chemother.* **1999**, *43*, 727-737.
51. Hon, W.; 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

- Antibiotic Resistance Reveals Homology to Eukaryotic Protein Kinases *Cell* **1997**, *89*, 887-895.
52. Wright, G.D.; Thompson, P.R. Aminoglycoside Phosphotransferases: Proteins, Structure, and Mechanism *Frontiers in Bioscience* **1999** *4*, d9-21
53. 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.
54. Ishino, K.; Ishikawa, J.; Ikeda, Y.; Hotta, K. Characterization of a bifunctional aminoglycoside-modifying enzyme with novel substrate specificity and its gene from a clinical isolate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with high arbekacin resistance. *J. Antibiot* **2004**, *57*, 679-686.
55. Sakon, J.; Liao, H.H.; Kanikula, A.M.; Benning, M.M.; Rayment, I.; Holden, H.M. Molecular structure of kanamycin nucleotidyltransferase *Biochemistry* **1993**, *32*, 11977-11984.
56. Guthrie, O.W. Aminoglycoside induced ototoxicity *Toxicology* **2008**, *249*, 91-96
57. Mingeot-Leclercq, M., Tulkens, P.M. Aminoglycosides: Nephrotoxicity, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1003-1012.
58. Dalian, D.; Stratcher, A.; Salvi, R. J. Leupeptin protects cochlear and vestibular hair cells from gentamicin ototoxicity *Hearing Research* **2002**, *164*, 115-126.
59. Priuska, E.M.; Schacht, J. Formation of free radicals by gentamicin and iron and evidence for an iron/gentamicin complex. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *50*, 1749-1752
60. Kawaguchi, H.; Naito, T.; Nakagawa, S.; Fujisawa, K. BB-K 8, A New Semisynthetic aminoglycoside antibiotic *J. Antibiot.* **1972**, *25*, 695-708.
61. Jacoby, G.A.; Blaser, M.J.; Santanam, P.; Hachler, H.; Kayser, F.H.; Hare, R.S.; Miller, G. H Appearance of amikacin and tobramycin resistance due to 4-aminoglycoside nucleotidyltransferase [ANT(4-)-II] in gram-negative pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother* **1990**, *34*, 2381-2386.
62. Kondo, S.; Inumi, K.; Yamamoto, K.; Maeda, K.; Umezawa, H. Synthesis of 1-N-[(S)-4-amino-2-hydroxybutyryl]-kanamycin B and 3'-4'-dideoxykanamycin B active against kanamycin-resistant bacteria. *J. Antibiot.* **1973**, *26*, 412-415.

63. Kondo S, Hotta K. Semisynthetic aminoglycoside antibiotics: Development and enzymatic modifications. *J. Infect. Chemother* **1999**, *5*, 1–9.
64. Page Web consulté le 13 Janvier 2011: <http://www.achaogen.com/news/83/19>
65. A) Endimiani, A.; Hujer, K.M.; Hujer, A.M.; Armstrong, E.S; Choudhary, Y.; Aggen, J.B.; Bonomo, R.A ACHN-490, a Neoglycoside with Potent In Vitro Activity against Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *7*, 332-340. B) Aggen, J.B., Armstrong, E.S., Goldblum, A.A.; Dozzo, P., Linsell, M.S.; Gliedt, M.J.; Hildebrandt, D.J.; Feeney, L.A.; Kubo, A.; Matias, R.D.; Lopez, S.; Gomez, M.; Wlasichuk, K.B., Diokno, R.; Miller, G.H.; Moser, H.E. Synthesis and Spectrum of the Neoglycoside ACHN-490 *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 4636-4642.
66. Umezawa, H; Umezawa, S.; Tsuchiya, T.; Okazaki, Y. 3',4'-Dideoxy-kanamycin B Active Against Kanamycin-resistant *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* *J. Antibiot.* **1971**, *24*, 485-487.
67. Tipson, R.S; Cohen, A. Action of zinc dust and sodium iodide in N, N-dimethylformamide on contiguous, secondary sulfonyloxy groups: a simple method for introducing nonterminal unsaturation *Carbohydr. Res.* **1965**, *1*, 338-340.
68. A) Yamazaki, T.; Matsuda, K.; Sugiyama, H.; Seto, S.; Yamaoka, N. Steric and Electrostatic Effects on the Elimination of 2-and 3-Sulphonyl- oxy-groups from Methyl 4,6-O-Benzylidenehexopyranosides *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1977**, *18*, 1981-1987. B) Öberga, C. T.; Noressona, A.; Delaine, T., Larumbea, A.; Tejlera, J.; Wachenfeldt, H. V.; Nilsson, U. Synthesis of 3-azido-3-deoxy- β -d-galactopyranosides *Carb. Res.* *344*, **2009**, 1284-1286.
69. Takagi, Y.; Miyake, T.; Tsuchiya, T.; Umezawa, S.; Umezawa, H. Synthesis of 3'-deoxykanamycin B *J. Antibiot.* **1973**, *26*, 403-406.
70. Naito, T.; Nakagawa, S.; Abe, Y.; Fujisawa K.; Kawaguchi, H. Aminoglycoside Antibiotics. VIII Synthesis and Activity of 4'-Deoxykanamycin A *J. Antibiotics* **1974**, *27*, 838-850.
71. Voir les references 69 et 70 du présent chapitre

72. Rai, R.; Chang, H.; Chang, C.-W.T. Novel method for the synthesis of 3',4'-dideoxygenated pyranmycin and kanamycin compounds, and studies of their antibacterial activity against aminoglycoside-resistant bacteria. *J. Carbohydrate Chem.* **2005**, *24*, 131-143.
73. Battistini, C.; Franceschi, G.; Zarini, F.; Cassinelli, G.; Arcamone, F.; Sanfilippo, A. Semisynthetic aminoglycoside antibiotics. IV. 3',4'-Dideoxyparomomycin and analogues. *J. Antibio.* **1982**, *35*, 98-101.
74. 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.
75. A) Tsuchiya, T.; Takagi, Y.; Umezawa, S. 1-N acylation of Aminocyclitol Antibiotics via Zinc Chelation and Regiospecific N-Trifluoroacetylation *Tett. #Lett.* **1979**, *51*, 4951-4954. B) 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.
76. Takayuki, N.; Susumu, N.; Soichiro, T. German Patent 2,322,576, **1973**
77. Pan, P.; Chen, G.; Meng, X.; Cheng, Y.; Li, Z.; Li, S. Convenient synthesis of urea-linked hydroxyl-alkylamine derivatives of aminoglycosides, *J. Chin. Pharm. Sc.* **2009**, *18*, 302-312.
78. Hanessian, S.; Pachamuthu, K.; Szychowski, J.; Giguère, A.; Swayze, E.E.; Migawa, M.T.; Francois, B.; Kondo, J.; Westhof, E. Structure-based design, synthesis and A-site rRNA co-crystal complexes of novel amphiphilic aminoglycoside antibiotics with new binding modes: a synergistic hydrophobic effect against resistant bacteria. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *23*, 7097-7101
79. Li, J.; Chen, H.; Chang, H.; Wang, J.; Chang, C-T.W. Tuning the Regioselectivity of the Staudinger Reaction for the Facile Synthesis of Kanamycin and Neomycin Class Antibiotics with N1 Modification *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3061-3064.
80. Travail effectué par le Dr. Kandasamy Pachamuthu lors d'un stage post-doctoral dans le laboratoire du Pr. Stephen Hanessian

81. Garegg, P.J.; Samuelsson, B. One-step conversion of vicinal diols into olefins, using a novel reagent system. *Synthesis* **1979**, *6*, p. 469-470
82. Garegg, P.J. Some Aspects of Regio-, Stereo-, and Chemoselective Reactions in Carbohydrate Chemistry. *Pure & Appl. Chem.* **1984**, *56*, p. 845-858
83. Pakulski, Z.; Zamjski, A. New observations of the Garegg-Samuelsson olefination reaction. *Carbohydr. Res.* **1990**, *205*, p. 410-414
84. Garegg, P.J.; Samuelsson, B. Conversion of Vicinal Diols into Olefins using Triphenylphosphine and Triiodoimidazole. *Synthesis* **1979**, *6*, p. 469-470
85. Aggen, J.M; Linsell, M.S; Goldblum, A; Hildebrandt, D. J.; Kane, T.R.; Dozzo, P.; Gliedt, M.J; Hanessian, S.; Giguère, A.; Grzyb, J., Maianti, J.P Antibacterial aminoglycoside analogs International Patent WO/2010/030704, **2010**
86. Hanessian, S.; Giguère, A.; Grzyb, J.; Maianti, J.P; Saavedra, M. O; Aggen, J. B.; Linsell, M.S.; Goldblum, A.A; Hildebrandt, D. J.; Kane, T. R; Dozzo, P; Gliedt, M. J.; Rowena D. M; Feeney L. A; Amstrong, E. S. Toward Overcoming *Staphylococcus aureus* Aminoglycoside Resistance Mechanisms with a Functionally Designed Neomycin Analogue. *Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *2* (12), pp 924–928
87. Hanessian, S.; Ogawa, T., Takamoto, T. Aminoglycoside antibiotics: Synthetis of peudotrisaccharides derived from neamine and paromamine *Can. J. Chem.* **1978**, *56*, p. 1500-1508
88. Thèse de doctorat de Robert Massé, Université de Montréal, **1975**
89. Par exemple: A) Umezawa, S.; Takagi, Y.; Tsuchiya, T. Studies on Aminosugars. XXVI. A New Method for the Simultaneous Potection of Amino and Hydroxyl Groups in Aminosugars and Aminocyclitols *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1971**, *44*, p. 1411-1415 B) Kumar, V.; Remers, W.A. Aminoglycoside Antibiotics. 1. Regiospecific Partial Syntheses of Ribostamycin and Butirosin B *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, p. 3327-3331 C) Schepadael, A van; Busson, R.; Claes, P. The Selective Protection of Amino Functions in Aminoglycosides: A Review of Possible Approaches *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1992**, *101*, p. 709-718 D) Pan, P.; Chen, G.; Meng, X.; Cheng, Y.; Li, Z.; Li, S. Convenient synthesis of urea-linked

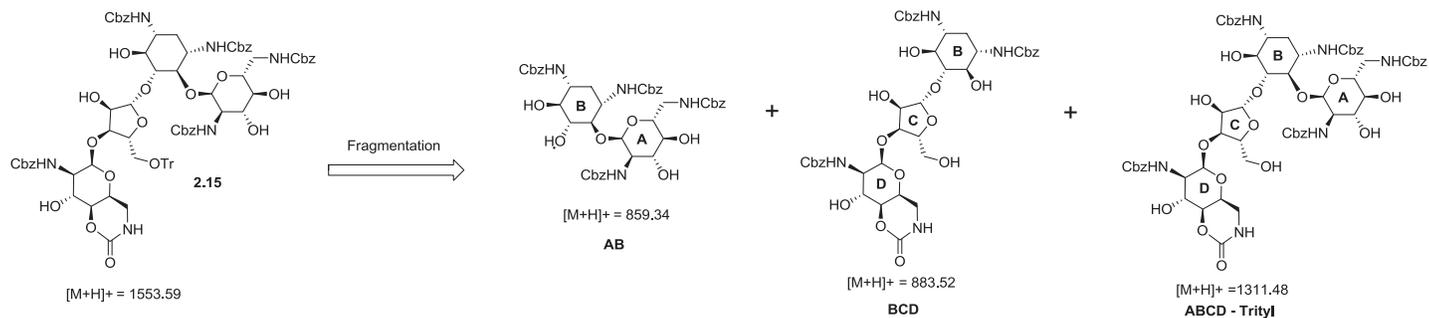
- hydroxyl-alkylamine derivatives of aminoglycosides, *J. Chin. Pharm. Sc.* **2009**, *18* p. 302-312
90. Hanessian, S.; Szychowski, Compos-Reales Pineda, N. B.; Furtos, A., Keillor, J.W. 6-Hydroxy to 6'''-amino tethered ring-to-ring macrocyclic aminoglycosides as probe for APH(3')-IIIa kinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, p. 3221-3225
91. Rai, R.; Chang, H.; Chang, C.-W.T. Novel method for the synthesis of 3',4'-dideoxygenated pyranmycin and kanamycin compounds, and studies of their antibacterial activity against aminoglycoside-resistant bacteria. *J. Carbohydrate. Chem.* **2005**, *24*, 131-143. 2) Battistini, C.; Franceschi, G., Zarini, F.; Cassinelli, G.; Arcamone, F., Sanfilippo, A. Semisynthetic aminoglycoside antibiotics. IV. 3',4'-Dideoxyparomomycin and analogues. *J. Antibio.* **1982**, *35*, 98-101
92. Test de concentration inhibitrice minimale sont effectuées chez Achaogen Inc.
93. Fujisawa K, Hoshiya T, Kawaguchi H. Aminoglycoside antibiotics. VII. Acute toxicity of aminoglycoside antibiotics. *J. Antibiot.* **1974**, *27*, p. 677-681
94. Tsunakwa, M.; Hanada, M.; Tsukiura, H.; Tomita, K.; Tomatsu, K.; Hoshiya, T.; Miyaki, T., Konishi, M., Kawaguchi, H. Inosamycin, A Complex of New Aminoglycoside Antibiotics I. Production, Isolation and Properties. *J. Antibiotics* **1985**, *38*, p. 1302-1312
95. Chen, L.; Hainrichson, M.; Bourdetsky, D.; Mor, A.; Yaron, S.; Baasov., T. Structure-toxicity relationship of aminoglycosides: Correlation of 2'-amine basicity with acute toxicity in pseudo-disaccharide scaffolds. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, p. 8940-8951
96. Shitara, T.; Kobayashi, T.; Tsuchiya, t.; Umezawa, S. Synthesis of 5-deoxy-5-fluoro and 5-deoxy-5,5-difluoro derivatives of kanamycin B and its analogs. Study on structure-toxicity relationships. *Carbohydr. Res.* **1992**, *232*, p. 273-290
97. Schmitz, C.; Hilpert, J.; Jacobsen, C.; Boensch, C.; Christensen, E. I.; Luft, F.C.; Willnow, T.E Megalin Deficiency Offers Protection from Renal Aminoglycoside Accumulation *J. Bio. Chem.* **2002**, *277*, p. 618-622

98. Takamoto, K.; Kawada, M.; Usui, T.; Ikeda, D.; Ishizuka, M.; Takeuchi, T. Inhibitory activity of dome formation in LLC-PK₁ cells is a selective index of aminoglycoside nephrotoxicity. *J Antibiot* **2002**, *55*, p. 605–606
99. Armstrong, E.S.; Feeney, L.A.; Kostryb, C.F. Compositions and Methods for Determining Nephrotoxicity, US Patent, 2009/02/20982, **2009**
100. Baruch, A.; Jeffery, D.A, Bogyo, M. Enzyme activity – it’s all about image *Trends Cell. Biol.* **2004**, *14*, p. 29-34
101. Test de luminescences sont effectuées chez Achaogen Inc.
102. Vincens, Q.; Westhof, E Crystal Structure of Paromomycin docked into the Eubacterial Ribosomal Decoding A Site Structure 2001, *9*, p. 647-658
103. Thèse de doctorat, Jean-Michel Vatelle, Université de Paris-Sud, 1983
104. Thèse de doctorat de Janek Szychowski, Université de Montréal, 2008
105. Morgenthaler, M.; Schweizer, E.; Hoffmann-Röder, A.; Benini, F.; Martin, R.; Jaeschke, G.; Wagner, B.; Fischer, H, Bendels, S.; Zimmerli, D.; Schneider, J.; Diederich, F.; Kansy, M.; Müller, K. Predicting and Tuning Physicochemical Properties in Lead Optimization: Amine Basicities *Chem. Med. Chem.* 2007, *8*, p. 1100-1115
106. Sakamoto, S.; Tsuchiya, T.; Tanaka, A.; Umezawa, S.; Hamada, M.; Umezawa, H. Syntheses of 23-deoxy-23-N-ethyl-23-(2-fluoro-, 2,2-difluoro-, and 2,2,2-trifluoroethyl)amino derivatives of mycaminosyl tylonolide and 4'-deoxymycaminosyl tylonolide. *J. Antibiotics* 1984, *37*, p. 1628-1634

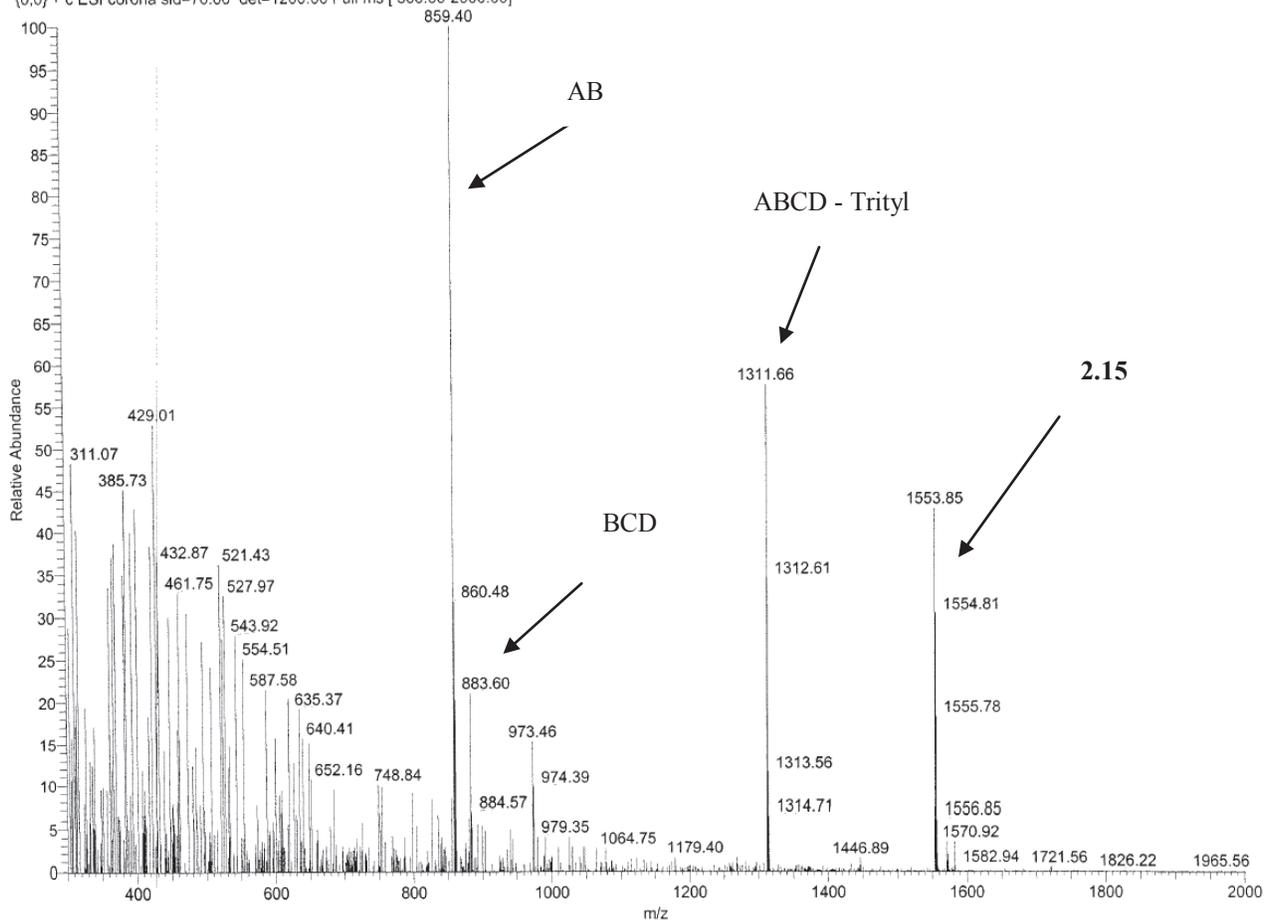
Chapitre 5

Annexes

6'''-4'''-N,O-carbonyle-5''-O-triphénylméthyle-penta-N-Cbz-néomycine (2.15)

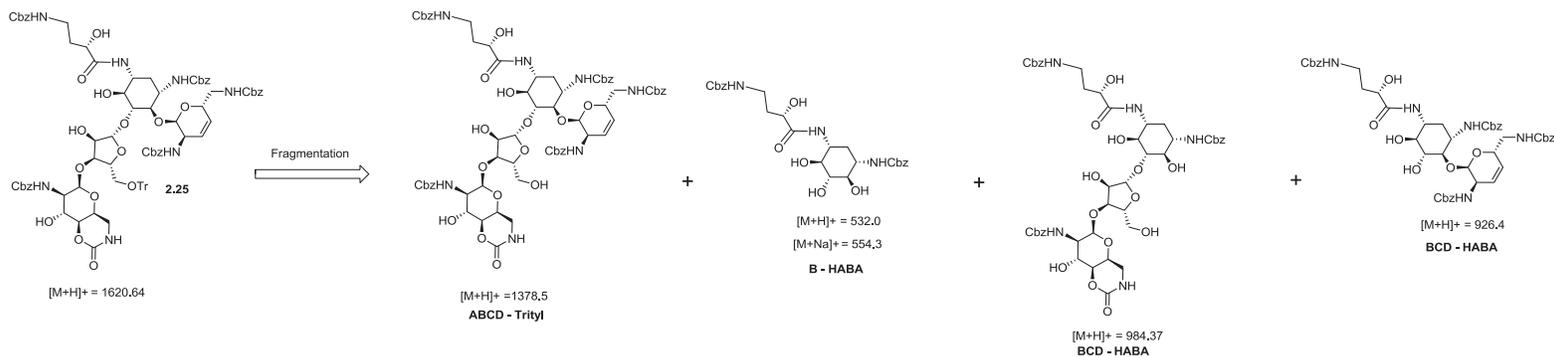


#94-196 RT: 1.30-2.72 AV: 103 SB: 72 0.15-0.70, 2.29-2.72 NL: 2.00E3
(0.0) + c ESI corona sid=70.00 det=1200.00 Full ms [300.00-2000.00]

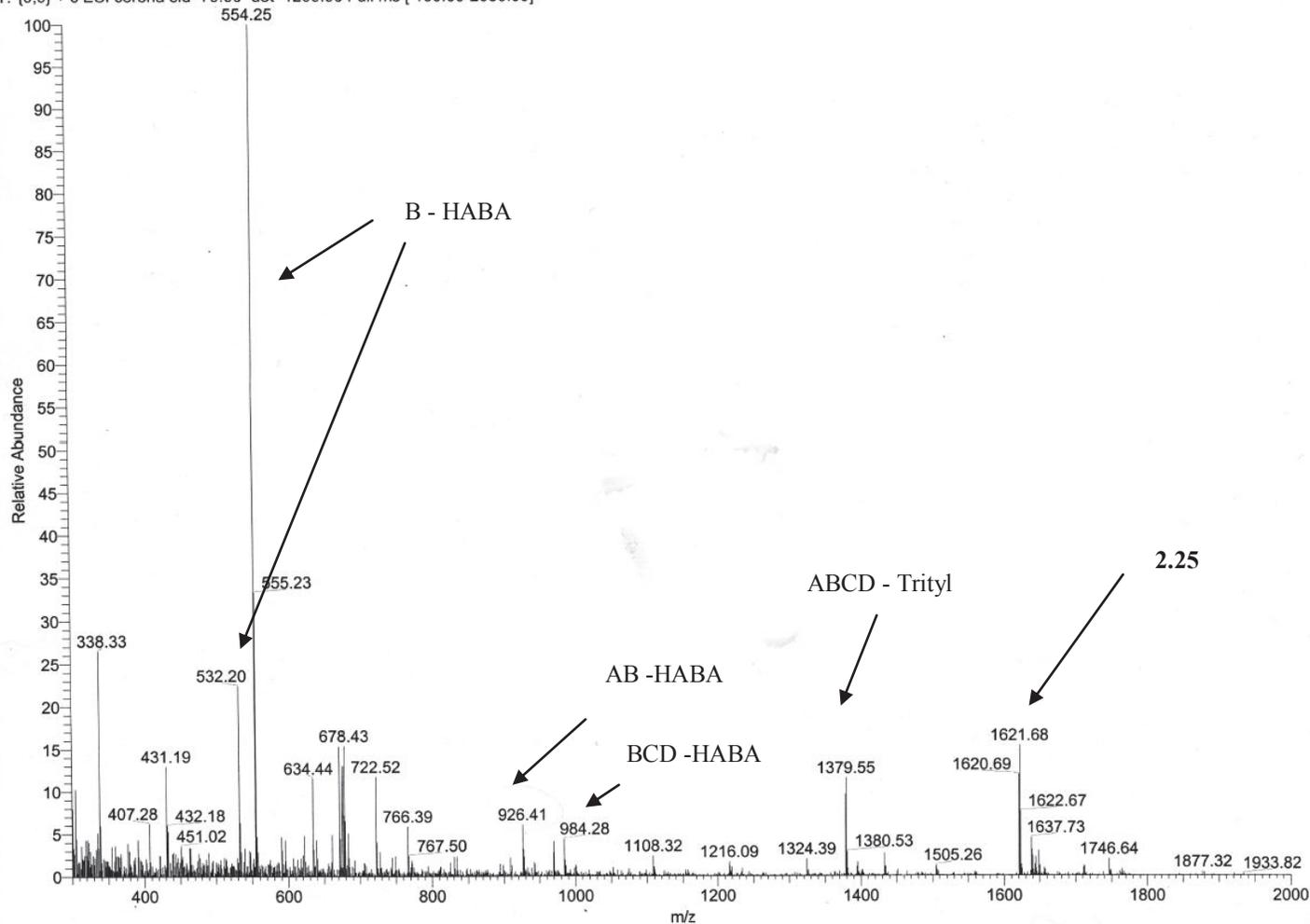


Spectre de masse en mode électrospray positif du composé 2.15

3',4'-didéhydro-6''',4'''-N,O-Carbonyl-N-1-HABA-5''-O-triphénylméthyle-penta-N-Cbz-néomycine (2.25)

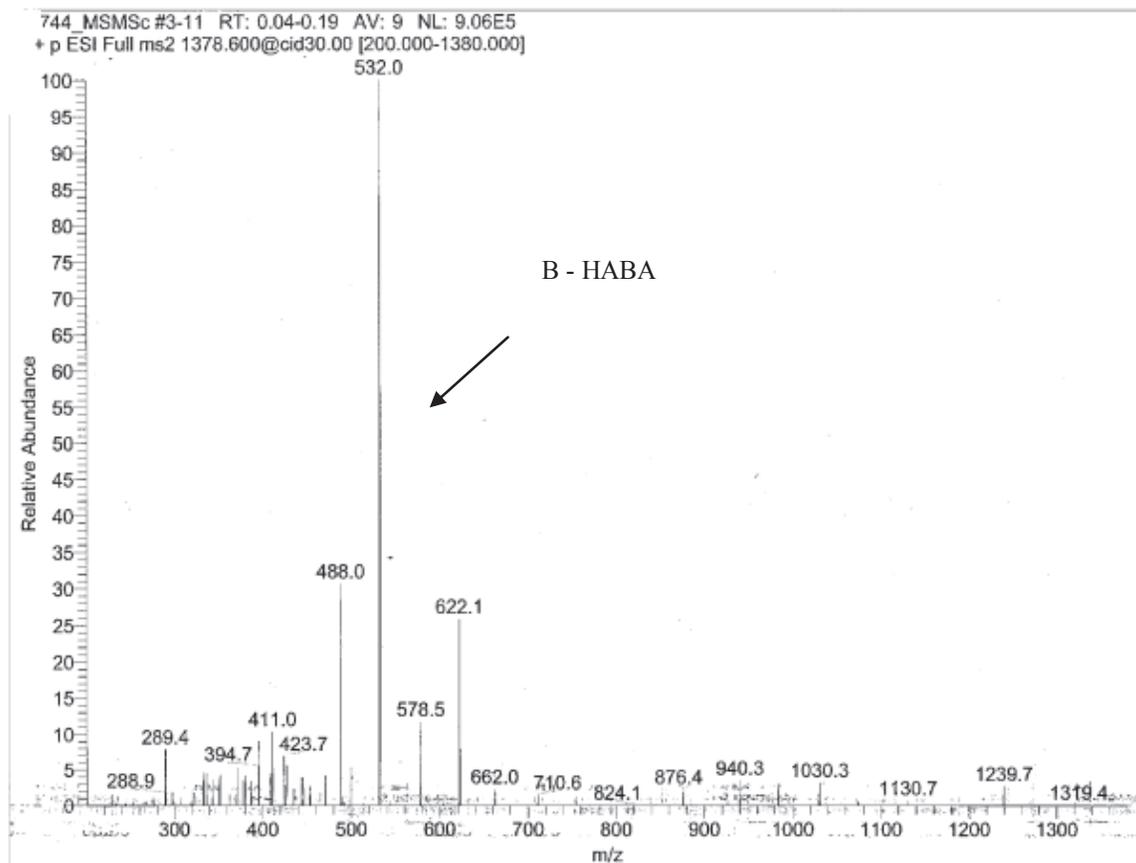
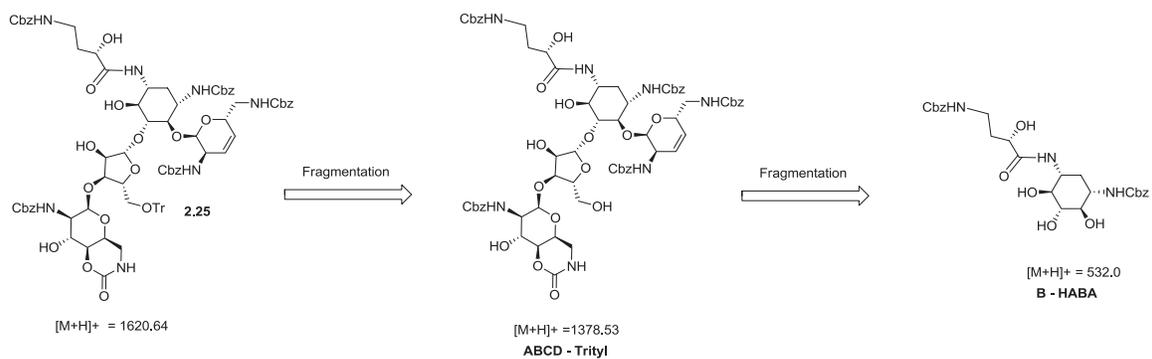


j_080707113437 #96-145 RT: 1.33-2.02 AV: 50 SB: 41 0.15-0.70, 2.02 NL: 2.10E4
 T: {0,0} + c ESI corona sid=70.00 det=1200.00 Full ms [100.00-2000.00]



Spectre de masse en mode électrospray positif du composé 2.25

3',4'-didéhydro-6''',4'''-N,O-Carbonyl-N-1-HABA-5''-O-triphénylméthyle-penta-N-Cbz-néomycine (2.25)



Spectre de masse (MS/MS) en mode électrospray positif du composé 2.25 sur le fragment 1378.6