

UNIVERSITÉ ABOUBEKR-BELKAID TLEMCEM
FACULTÉ DES SCIENCES
DÉPARTEMENT DE CHIMIE

THÈSE DE DOCTORAT D'ÉTAT

EN CHIMIE ORGANIQUE APPLIQUÉE

**ANTAGONISTES DE L'AGRÉGATION PLAQUETTAIRE INDUITE
PAR LE PAF ET INHIBITEURS DE LA RÉPLICATION DU VIH:
SYNTHÈSE ET RELATION STRUCTURE-ACTIVITÉ.**

Soutenue par *OKKACHA BENSAID*

Janvier.2001

Inscrit Sous le N°:

Date: 26 FEV. 2015

Couleur: 941

Devant la commission d'examen représentée par:

- | | |
|--------------------|---|
| - E. TALEB BENDIAB | Professeur (Université de Tlemcen) |
| - KAJIMA MULENGI | Professeur (Université de Tlemcen) |
| - J-J.GODFROID | Professeur (Université Paris 7) |
| - F. HEYMANS | Professeur (Université Paris-7) |
| - A. MESLI | Professeur (Université de Sidi Belabes) |
| - B. TABTI | M. C (Université de Tlemcen) |

200 / 541. 39. 02 / 01



DOY/547-02/01

Remerciements

Inscrit Sous le N°:
Date la: 07 MARS 2011
Code: 4631

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration entre les laboratoires de Pharmacochimie Moléculaire et Système Membranaire (EA 2381) de l'Université Paris-7 Denis Diderot et de Synthèse Organique Appliquée de l'Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen sous les directions respectives de Messieurs les Professeurs Jean-Jacques GODFROID et KAJIMA MULENGI, que je remercie sincèrement pour m'avoir accepté dans leurs laboratoires, pour la confiance et disponibilité qu'ils m'ont toujours accordées. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma très grande reconnaissance.

Les tests anti-VIH ont été réalisés dans le cadre d'une collaboration entre le laboratoire de Pharmacochimie Moléculaire et Système Membranaire (EA 2381) de l'Université Paris-7 Denis Diderot et le laboratoire de Neurovirologie du Commissariat à l'Energie Atomique sous la direction du Professeur Dominique Dormant, que je remercie sincèrement ainsi que tous les chercheurs du laboratoire qui ont contribué aux tests de nos molécules

Les mots me manquent pour exprimer à quel point je suis reconnaissant au Professeur Françoise HEYMANS pour tout ce qu'elle m'a enseigné durant ces années. Vous m'avez encouragé dans toutes mes démarches et su me remotiver dans les moments difficiles. Je vous exprime toute ma gratitude pour le temps que vous avez accordé à la lecture de mon manuscrit et aux critiques constructives dont il a été l'objet.

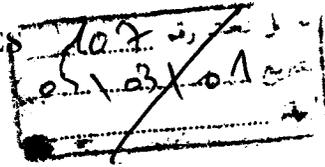
Je tiens à remercier chaleureusement Monsieur le Professeur Sid Ahmed TALEB BENDIAB qui me fait l'honneur de présider cette commission d'examen. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

J'adresse mes remerciements au Professeur Abderrazak MESLI de l'Université Djillali liabes Sidi Bel-abbès et au Docteur Boufeldja TABTI d'avoir bien voulu juger ce travail et faire partie de mon jury.

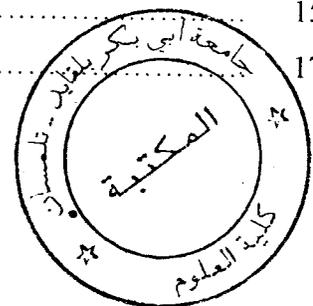
Je remercie le Docteur Chang Zhi Dong pour sa disponibilité et ses précieux conseils sur le contenu de cette Thèse.

J'exprime tous mes remerciements et mes sincères amitiés à toutes les équipes du laboratoire de Pharmacochimie Moléculaire et Système Membranaire (EA 2381) de l'Université Paris-7 Denis Diderot et les chercheurs du laboratoire de Synthèse Organique de l'Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen et tous les enseignants du Département de Chimie de la Faculté des Sciences de l'Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.

TABLE DES MATIERES



	Page
ABREVIATIONS.....	1
AVANT-PROPOS.....	2
CHAPITRE I. LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (VIH) ET LE FACTEUR D'ACTIVATION DES PLAQUETTES (PAF)	
I. SYNDROME IMMUNODEFICITAIRE ACQUIS / VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (SIDA/VIH).....	3
1. Introduction.....	3
2. Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH).....	3
3. Les cellules cibles du VIH.....	6
4. Le cycle de réplication du VIH.....	6
5. Stratégies Thérapeutiques.....	8
5. 1. Inhibiteurs de la transcriptase inverse.....	9
5. 1. 1 Inhibiteurs nucléosidiques.....	9
5. 1. 2 Inhibiteurs non nucléosidiques.....	9
5. 2. Inhibiteurs de la protéase.....	10
5. 3. Autres antirétroviraux agissant au cours des étapes de réplication du cycle du VIH....	11
6. Les thérapies actuelles anti-SIDA.....	12
7. Limites des traitements actuels.....	12
8. Conclusion.....	13
II. LE FACTEUR D'ACTIVATION DES PLAQUETTES (PAF).....	14
1. Introduction.....	14
2. Le récepteur biologique du PAF.....	15
3. Les antagonistes du PAF.....	15
3. 1. Antagonistes analogues à la structure du PAF.....	15
3. 2. Antagonistes de structure différente du PAF.....	15
4. Antagonistes du PAF dérivés de la pipérazine.....	17



**CHAPITRE II. LE FACTEUR D'ACTIVATION DES PLAQUETTES
(PAF) DANS L'INFECTION PAR LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE
HUMAINE (VIH)**

Le Facteur d'Activation des Plaquettes (PAF) dans l'infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH).....	20
1. Introduction.....	20
2. Résultats préliminaires.....	23
3. Objectifs.....	24

CHAPITRE III. CHIMIE

I-SYNTHESE ORGANIQUE.....	27
A/ Procédé général.....	28
1. Cyclisation.....	28
Synthèse des 1,4-dibenzyl-2-éthoxycarbonylpipérazine 1 et 1,4-dibenzyl-2-cyano pipérazine 2	28
2. Réduction.....	29
Synthèse des 1,4-dibenzyl-2-(hydroxyméthyl)pipérazine 4 et 1,4-dibenzyl-2-(amino méthyl)pipérazine 5	29
3. Synthèse des intermédiaires C à fonction carbamate et thiocarbamate en position 2.....	30
a) Synthèse des 1,4-dibenzyl-2-(N,N-dialkyl et N-alkylcarbamoxyloxy)méthyl)pipérazine....	31
b) Synthèse de la 1,4-dibenzyl-2-(N,N-diméthylthiocarbamoxyloxy)méthyl)pipérazine 11	32
4. Synthèse des intermédiaires C à fonction uréate, amide et «carbamate inversé».....	33
a) Synthèse des uréates monosubstitués: 1,4-dibenzyl-2-(N-2,6-diméthylphényluréido méthyl)pipérazine 12 et 1,4-dibenzyl-2-(N-hexyluréidométhyl)pipérazine 13	33
b) Synthèse des uréates disubstitués: 1,4-dibenzyl-2-(N,N-diéthyluréidométhyl)pipérazine 15 et 1,4-dibenzyl-2-(N,N-dipropyluréidométhyl)pipérazine 16	33
c) Synthèse de l'amide et du «carbamate inversé»: 1,4-dibenzyl-2-(2,2-diméthylpropion amidométhyl)pipérazine 17 et 1,4-dibenzyl-2-(isopropoxyloxyloxyaminométhyl) pipérazine 18	34
5. Débenzylation.....	34
Synthèse des dérivés de la pipérazine substitués en position 2.....	34
Cas des composés non soufrés:.....	34

Modes opératoires.....	49
1. Préparation de la 1,4-dibenzyl-2-éthoxycarbonylpipérazine <u>1</u>	49
2. Préparation de la 1,4-dibenzyl-2-cyanopipérazine <u>2</u>	50
3. Préparation de la 2-cyanopipérazine <u>3</u>	50
Réduction.....	51
4. Préparation de la 1,4-dibenzyl-2-(hydroxyméthyl)pipérazine <u>4</u>	51
5. Préparation de la 1,4-dibenzyl-2-(aminométhyl)pipérazine <u>5</u>	52
6. Préparation de la 1,4-dibenzyl-2-(phénoxycarbonyloxyméthyl)pipérazine <u>6</u>	53
Substitution du phénoxy par les amines.....	54
7. Mode opératoire général pour l'obtention des composés <u>7-10</u>	54
8. Préparation de la 1,4-dibenzyl-2-(N,N-diéthylaminocarbamoyloxyméthyl)pipérazine <u>7</u> ..	54
9. Préparation de la 1,4-dibenzyl-(pipéridinocarbonyloxyméthyl)pipérazine <u>8</u>	54
10. Préparation de la 1,4-dibenzyl-2-(pyrrolidinocarbonyloxyméthyl)pipérazine <u>9</u>	55
11. Préparation de la 1,4-dibenzyl-2-(N-butylcarbamoyloxyméthyl)pipérazine <u>10</u>	55
12. Préparation de la 1,4-dibenzyl-2-(N,N-diméthylthiocarbamoyloxyméthyl)pipérazine <u>11</u>	56
13. Préparation de la 1,4-dibenzyl-2-(N-2,6-diméthylphényluréidométhyl)pipérazine <u>12</u>	57
14. Préparation de la 1,4-dibenzyl-2-(N-hexyluréidométhyl)pipérazine <u>13</u>	58
15. Préparation de la 1,4-dibenzyl-2-(phénoxycarbonylaminométhyl)pipérazine <u>14</u>	58
16. Préparation de la 1,4-dibenzyl-2-(N,N-diéthyluréidométhyl)pipérazine <u>15</u>	59
17. Préparation de la 1,4-dibenzyl-2-(N,N-dipropyluréidométhyl)pipérazine <u>16</u>	59
18. Préparation de la 1,4-dibenzyl-2-(2,2-diméthylpropionamidométhyl)pipérazine <u>17</u>	60
19. Préparation de la 1,4-dibenzyl-2-(isopropyloxycarbonylaminométhyl)pipérazine <u>18</u>	61
Débenzylation par hydrogénolyse (H ₂ /Pd/C).....	61
20. Mode opératoire général d'obtention des composés <u>19-29</u>	61
21. Préparation du chlorhydrate de la 2-éthoxycarbonylpipérazine <u>19</u>	62
22. Préparation du chlorhydrate de la 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)pipérazine <u>20</u> ...	62
23. Préparation du 2-(pipéridinocarbonyloxyméthyl)pipérazine <u>21</u>	63
24. Préparation du chlorhydrate de la 2-(pyrrolidinocarbonyloxyméthyl) pipérazine <u>22</u>	63
25. Préparation du chlorhydrate de la 2-(N-butylcarbamoyloxyméthyl)pipérazine <u>23</u>	63
26. Préparation du diacétate de la 1,4-dibenzyl-2-(N-2,6-diméthylphényluréidométhyl) pipérazine <u>24</u>	64
27. Préparation du diacétate de la 2-(N-hexyluréidométhyl)pipérazine <u>25</u>	64
28. Préparation de la 1,4-di-(2,2,2-trichloroéthoxycarbonyl)-2-(N,N-diméthylthio carbamoyloxyméthyl)pipérazine <u>30</u>	67
33. Préparation du chlorhydrate de la 2-(N,N-diméthylthiocarbamoyloxyméthyl) pipérazine <u>31</u>	67
Amidification.....	68
34. Mode opératoire général pour obtenir les composés <u>32-44</u>	68
35. Préparation de la 2-(éthoxycarbonyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine <u>32</u> ...	68
36. Préparation de la 2-cyano-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine <u>33</u>	69

benzoyl)pipérazine <u>44</u>	75
48. Préparation de la 2-(hydroxyméthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine <u>45</u> ...	76
49. Préparation de la 2-(N,N-diéthylthiocarbamoyloxyméthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxy benzoyl)pipérazine <u>46</u>	77
50. Préparation de la 2-(propanoyloxyméthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl) pipérazine <u>47</u>	78
51. Préparation de la 2-(phénoxycarbonyloxyméthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl) pipérazine <u>48</u>	78
52. Préparation de la 3-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1-(3,4,5-triméthoxybenzoyl) pipérazine <u>49</u>	79
53. Préparation de la 3-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1-triphénylméthylpipérazine <u>50</u>	80
54. Préparation de la 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)-4- triphénylméthylpipérazine <u>51</u>	80
55. Préparation de la 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1-(3,4,5-triméthoxybenzoyl) pipérazine <u>52</u>	81
56. Préparation de la 3-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1-(3,4,5-triméthoxythio benzoyl)pipérazine <u>53</u>	82
57. Préparation de la 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1-(3,4,5-triméthoxythio benzoyl)pipérazine <u>54</u>	82
58. Préparation de la 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxythio benzoyl)pipérazine <u>57</u>	83
59. Préparation de la 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-4-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)-1- (3,4,5-triméthoxythiobenzoyl)pipérazine <u>55</u>	83
60. Préparation de la 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1-(3,4,5-triméthoxythio benzoyl)-4-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine <u>56</u>	84
61. Préparation de la 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1,4-di-(3,4-diméthoxybenzoyl) pipérazine <u>58</u>	85
62. Préparation de la 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1,4-di-(2,4,-diméthoxybenzoyl) pipérazine <u>59</u>	86
63. Préparation de la 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1,4-dibenzoyl)pipérazine <u>60</u>	86

CHAPITRE IV. BIOLOGIE	
I-Activité anti-PAF	88
1. Introduction.....	88
2. Méthode expérimentale.....	88
2.1. Préparation de plaquettes de lapin.....	88
2.2. Mesure de l'agrégation plaquettaire.....	88
2.2.1. Principe.....	88
2.2.2. Protocole expérimental.....	89
II-Activité anti-VIH	89
III-Résultats et discussions	90
1/ Modification du substituant R en position 2 de la pipérazine.....	60
a) Partie amine de la fonction carbamate.....	91
b) Enchaînement des atomes du groupement carbamate.....	91
c) Modification du groupement fonctionnel carbamate.....	91
d) Autres groupements fonctionnels.....	93
2/ Modification des substituants en position 1 et 4 de la pipérazine.....	94
3/ Composés soufrés.....	95
a) Fonction thiocarbamate du substituant R.....	96
b) Fonction thiocarbamide en position 1 et/ou en position 4 de la pipérazine.....	97
IV-Conclusion et perspectives	98
Le point sur le mode d'action	99
BIBLIOGRAPHIE	101

ANNEXEStructures et nomenclature des composés 1 à 60

Substances anti-sida courantes actuellement disponibles

Publications et communications



ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNdb	ADN double brin
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CI ₅₀	Concentration d'inhibition à 50%
DE ₅₀	Dose effectrice 50 %
EGTA	Acide éthylènebis(oxyéthylènenitro)diaminetétra acetique
gp	Glycoprotéine
IgE	Immunoglobulines E
IN	Intégrase
LTR	Long Terminal Repeat
MDM	Macrophages dérivés des monocytes
PAF	Facteur activateur des plaquettes
PR	Protéase
PRP	Plasma riche en plaquettes
RNase	Ribonucléase
rpm	Rotation par minute
SNC	Système nerveux central
TI	Transcriptase inverse
TNF- α	Facteur nécrosant de tumeur de type α (tumor necrosis factor)
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VIH-1	Virus de l'immunodéficience humaine de type 1
VIH-2	Virus de l'immunodéficience humaine de type 2

Avant-propos

Le virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) est l'agent infectieux responsable du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) et ses cibles cellulaires principales sont les lymphocytes T CD4+ dans le sang et les macrophages dans les tissus.

L'une des complications majeures survenant au cours du SIDA, la susceptibilité aux infections opportunistes mise à part, est l'atteinte du système nerveux central (SNC). Au moins 50 % des individus infectés par le VIH développent des dysfonctionnements neurologiques, et 10 à 30 % de ces patients présentent des troubles cérébraux plus importants dont la forme la plus grave est l'encéphalopathie à VIH ou démence associée au SIDA.

L'infection par le VIH s'accompagne d'un syndrome inflammatoire chronique et les atteintes neurologiques sont en partie la conséquence de cette inflammation. En effet, au sein du SNC, les cellules de la lignée macrophagique infectées par le virus sécrètent des agents pro-inflammatoires tels que le «facteur nécrosant des tumeurs alpha» (TNF- α) et le «facteur d'activation des plaquettes» (PAF) connu comme l'un des plus puissant médiateur de l'allergie et de l'inflammation et tous deux, PAF et TNF- α , sont neurotoxiques.

La majorité des anti-rétroviraux connus à ce jour permettent de diminuer efficacement la charge virale dans le sang, cependant ils ne traversent que très peu la barrière hémato-encéphalique (BHE). Ils sont donc incapables d'atteindre les réservoirs de virus que constituent les tissus cérébraux, si bien qu'après une période de répit après cessation des traitements, l'organisme se trouve de nouveau envahi par le virus qui s'est multiplié dans le cerveau.

Dans les années 90, une collaboration entre le Laboratoire de Pharmacochimie Moléculaire de l'Université Paris 7 – Denis Diderot, spécialiste du PAF, de ses antagonistes et de son récepteur, et le service de Neurovirologie du Commissariat à l'Energie Atomique (CEA) a permis de mettre en évidence l'activité anti-VIH-1/Ba-L, sur monocytes/macrophages infectés, de certains antagonistes du PAF, de nature pipérazinique et c'est le double objectif d'améliorer l'efficacité et de comprendre le mécanisme d'action de ces composés qui constitué la motivation de cette thèse.

CHAPITRE I

**SYNDROME IMMUNODEFICITAIRE ACQUIS / VIRUS DE
L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (SIDA / VIH) ET LE FACTEUR
D'ACTIVATION DES PLAQUETTES (PAF)**



I-SYNDROME IMMUNODEFICITAIRE ACQUIS / VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE (SIDA / VIH)

1. Introduction

En 1981 Gottlieb (1) décrit l'apparition de pneumonies à pneumocystis carinii associées à un très faible taux de lymphocytes T CD4+. En 1983, le VIH-1 est isolé et reconnu comme l'agent étiologique du SIDA par Luc Montagnier et son équipe à l'Institut Pasteur de Paris (2). En 1986, le VIH-2 est découvert (3).

Le SIDA est une maladie caractérisée par une insuffisance fonctionnelle du système immunitaire de l'organisme consécutif à l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). La perte des fonctions immunitaires finit par entraîner l'apparition d'un syndrome clinique et provoque la mort par des infections opportunistes (pneumonies, méningites, etc) et des cancers. L'entrée du VIH dans le système nerveux central (SNC) amène une démence associée au SIDA, qui se caractérise par des dysfonctionnements cognitif et moteur (4).

2. Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)

Le VIH appartient à la famille des rétrovirus, découverte à la fin des années 1970. Il se caractérise par la possibilité paradoxale, de transcrire sa molécule d'ARN (génomme du virus) en une molécule d'ADN viral dans la cellule infectée grâce à une enzyme (la transcriptase inverse). Ceci est à l'encontre de l'ensemble des autres cellules vivantes qui ne peuvent transmettre leur code génétique qu'en le transcrivant dans le sens ADN vers ARN. Deux autres caractéristiques du VIH permettent d'expliquer la défaillance de la réponse immunitaire de l'hôte infecté. D'une part, la latence: l'ADN viral constitué s'intègre ensuite par chacune de ses deux extrémités (LTR) dans le chromosome de la cellule infectée. Ce provirus se comporte alors comme un des gènes de la cellule. Il peut rester silencieux: il est alors transmis aux cellules descendantes à chaque mitose, et les gènes du VIH temporairement endormis, lui confèrent une invisibilité antigénique. La mesure de la charge virale a pu cependant montrer qu'un degré variable de multiplication existait déjà au cours de cette période et, donc qu'il s'agit plus d'une latence clinique que biologique. L'information

généétique est transmise sous forme d'ARN messager, puis traduite en protéines virales. D'autre part, la variabilité génétique: elle dépend d'un patient à un autre, et même chez un même patient, à des époques différentes. Elle concerne certains gènes: env, nef, tat et rev. Les figures 1 et 2, représentent respectivement la structure de la particule virale, et l'organisation génomique du VIH. Le tableau 1 donne la fonction des protéines constitutives du VIH.

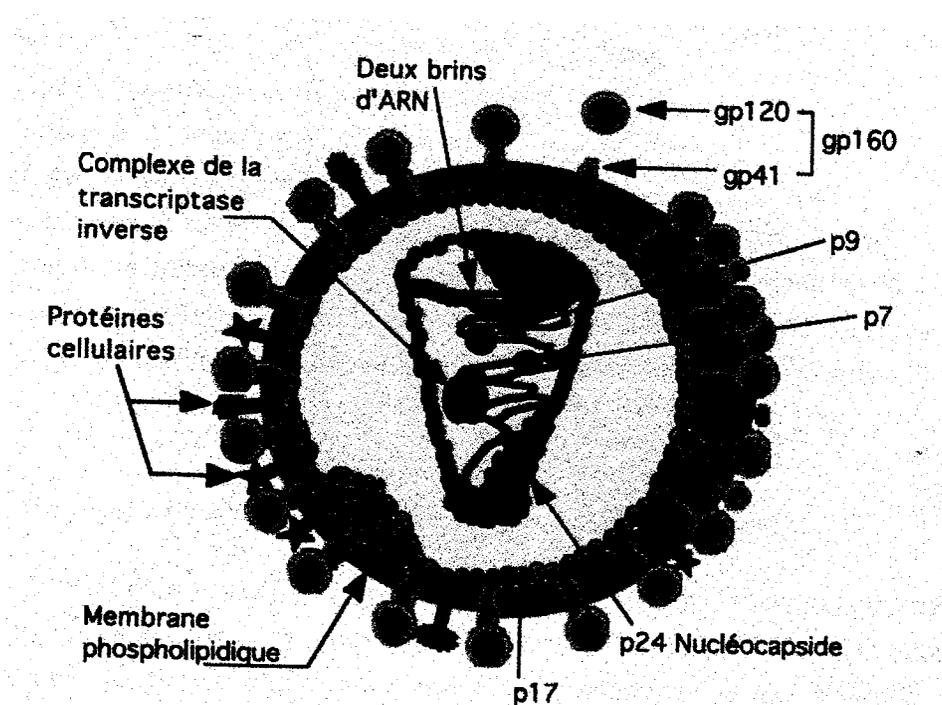


Figure 1: Structure schématique de la particule virale du VIH

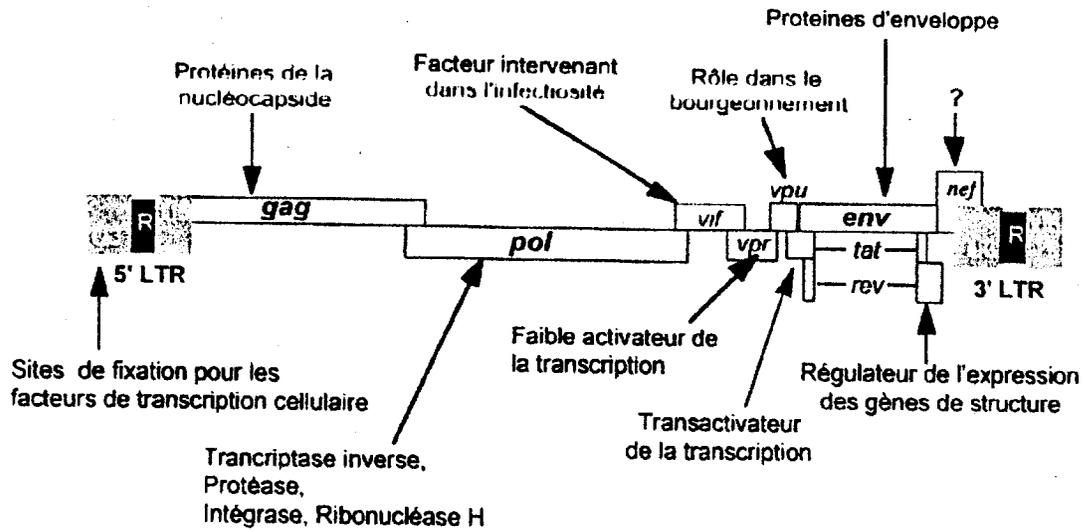


Figure 2: Organisation génomique du VIH

Tableau 1: Fonction des protéines constitutives du VIH

GENES	PROTEINES	Protéines maturées	FONCTION
Gènes de Structure			
Gag	pr 55 ^{gag}	p25 p18	Protéine majeure de la nucléocapside Protéine matrice nécessaire à l'intégrité de la particule virale
Gag-Pol	pr 160 ^{gag-pol}	p13 TI p55 et p66 IN p34 (2p11) PR 2p12	Encapsidation de l'ARN viral Transcription inverse et digestion du brin de l'ADN viral Intégration du double brin d'ADN au sein du génome cellulaire Maturation post-traductionnelle des précurseurs protéiques
Env	Glycoprotéine d'enveloppe Glycoprotéine Transmembranaire	gp120 gp41	Interaction avec le récepteur CD4 Protéine initiatrice de la fusion entre le viron et la cellule cible
Gènes de régulation essentiels			
Tat	Tat	p14	Transactivation
Rev	Rev	p19	Translocation nucléaire des ADN viraux
Nef	Nef	p26	Controversée
Gènes de régulation non essentiels			
Vif	Vif	p23	Accroît l'infectivité des virions (mécanisme à préciser)
Vpu	Vpu (VIH-1)	p15	Favorise le relargage des virions
Vpx	Vpx (VIH-2, VIS)	p15	Favorise l'infectivité des virions
Vpr	Vpr	p18	Favorise la réplication virale

3. Les cellules cibles du VIH

Les cellules cibles du VIH sont principalement le lymphocyte T CD4⁺ et les macrophages / monocytes (5, 6). D'autres cellules sont infectables, en particulier les cellules dendritiques au sein du système nerveux central (SNC).

4. Le cycle de réplication du VIH

Le cycle biologique de réplication du VIH comprend plusieurs étapes précoces et tardives (**Figure 3**). Les étapes précoces sont la reconnaissance spécifique du récepteur cellulaire CD4⁺, l'entrée du virus dans la cellule par fusion avec la membrane plasmique conduisant à la libération de la capsidie rétrovirale dans le cytoplasme, la rétrotranscription de l'acide ribonucléique (ARN) viral en acide désoxyribonucléique (ADN) double brin, la translocation nucléaire de cet ADN proviral, et son intégration au sein du génome cellulaire. Les étapes tardives représentent la synthèse des protéines virales, l'encapsidation et la dimérisation de l'ARN viral, et enfin le bourgeonnement de la particule virale (7-8).

Étapes précoces: l'infection par le VIH nécessite, tout au moins pour les lymphocytes T CD4⁺ et les macrophages, des interactions de haute affinité entre la glycoprotéine gp 120 du virus et le récepteur cellulaire CD4. Cette liaison induit un changement conformationnel qui expose une région particulière de la gp 120, la boucle V3. Très probablement après le clivage de la boucle V3 par des protéases cellulaires, la membrane plasmique fusionne avec l'enveloppe virale permettant ainsi l'entrée de la nucléocapsidie dans le cytoplasme. La rétrotranscription débute probablement à l'intérieur de la capsidie virale et s'achève dans la cellule hôte. Elle fait intervenir la transcriptase inverse (TI), une ADN polymérase ARN-dépendante qui synthétise un brin d'ADN négatif, complémentaire de l'ARN viral. Pendant l'élongation du premier brin d'ADN et la formation d'un hybride ADN:ARN, l'ARN est digéré grâce à l'activité RNase H de la TI. La synthèse du brin d'ADN positif aboutit à la synthèse d'un ADN double brin (ADN db) dont chacune des deux extrémités porte un LTR (9). Cet ADN db peut être sous forme linéaire ou circulaire, mais seule cette dernière est capable de s'intégrer au sein du génome cellulaire. Au cours de cette synthèse, la TI

peut commettre de nombreuses erreurs, ce qui semble la cause majeure de la variabilité génétique des lentivirus, et conduire dans de nombreux cas à la formation de provirus défectifs (10). L'intégration du provirus au sein du génome cellulaire s'effectue après migration de l'ADN viral sous la forme d'un complexe nucléoprotéique. De ce fait, à aucun moment, le génome viral n'est exposé aux nucléases cellulaires. L'intégration se traduit par une réaction concertée de clivage et de ligation régie par l'intégrase. Les étapes ultérieures du cycle biologique suivent les voies cellulaires classiques et sont donc dépendantes du niveau d'activation cellulaire. La transcription de l'ADN viral est sous le contrôle de l'ADN polymérase II cellulaire. Elle débute au niveau de la région R du LTR située à l'extrémité 5' du génome et se termine au niveau de la même région du LTR de l'extrémité 3' qui possède le site de polyadénylation.

Etapas tardives: les ARN messagers ainsi synthétisés suivent deux voies différentes: 1) des épissages multiples permettent de synthétiser des précurseurs protéiques; 2) aucun épissage ne se fait et ces ARN sont incorporés dans les particules virales à naître comme support de l'information génétique. Les ARN épissés sont traduits grâce à la machinerie traductionnelle de la cellule hôte. Les polyprotéiques ainsi synthétisés sont myristilés, glycosylés et clivés par une protéase virale ou cellulaire. L'assemblage de toutes les protéines de structure débute près de la membrane cellulaire. Les deux copies d'ARN viral et toutes les protéines virales s'accumulent à la surface interne de la membrane cellulaire au niveau du site de bourgeonnement. Les particules virales quittent la cellule par bourgeonnement et poursuivent leur maturation avant d'infecter une autre cellule.

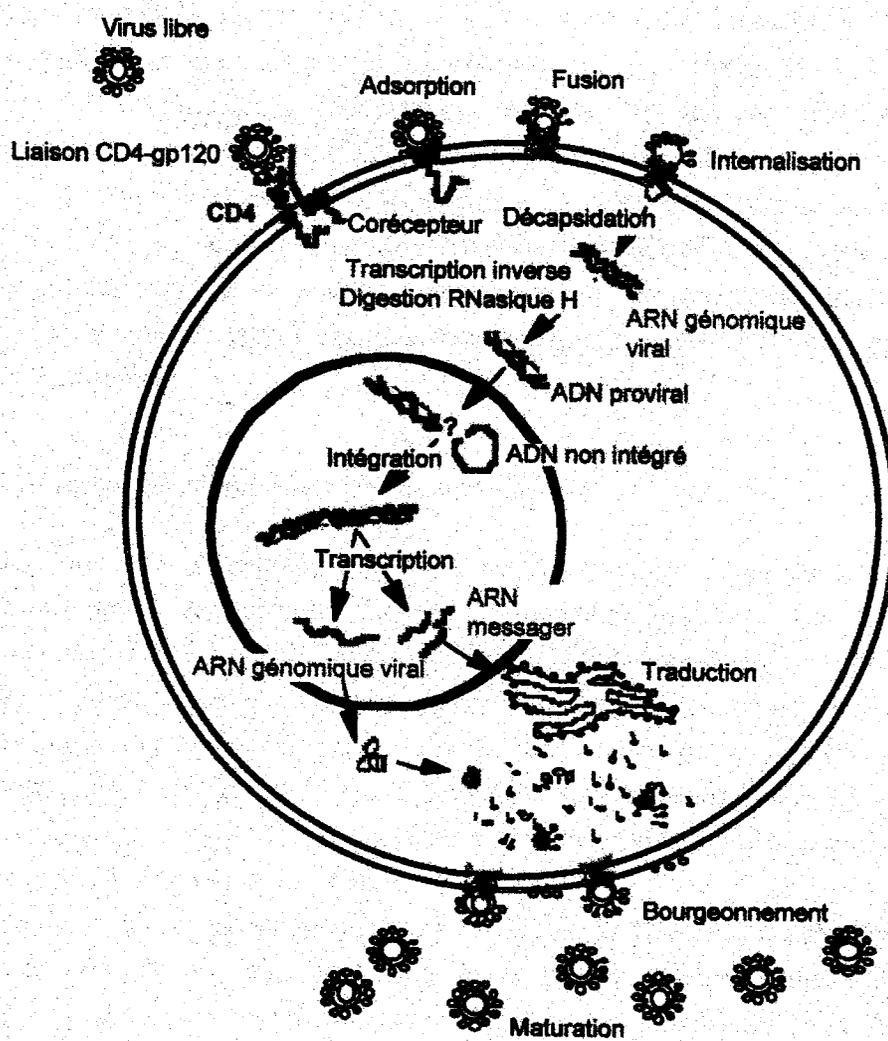


Figure 3: Le cycle biologique du VIH

5. Stratégies Thérapeutiques

Pour mettre au point des médicaments antiviraux contre le VIH, les chercheurs ont ciblé le cycle de réplication du VIH. Toutes les étapes de réplication du cycle du VIH sont des cibles thérapeutiques potentielles. Cependant ce sont la transcriptase inverse (TI) et la protéase virale, qui sont les plus visées (11-16).



5. 1. Inhibiteurs de transcriptase inverse

Ces produits inhibent la transcriptase inverse, enzyme nécessaire à la conversion de l'ARN du génome viral en ADN. On distingue deux types de structures:

5. 1. 1. Inhibiteurs nucléosidiques

Ce sont des dérivés nucléosidiques qui agissent en stoppant l'élongation de la chaîne d'ADN viral par un mécanisme de compétition vis-à-vis des nucléoside-5'-triphosphates endogènes. La première molécules anti-SIDA découverte en 1984 (17) est l'azidothymidine (AZT; 3'-azido-3'-déoxythymidine). Depuis 1987, d'autres analogues ont été découverts tels que: la didanosine (ddi; 2',3'-didéoxyinosine), la zalcitabine (ddc; 2',3'-didéoxycytidine)...etc. Les structures de quelques inhibiteurs nucléosidiques sont représentées à la **figure 4**.

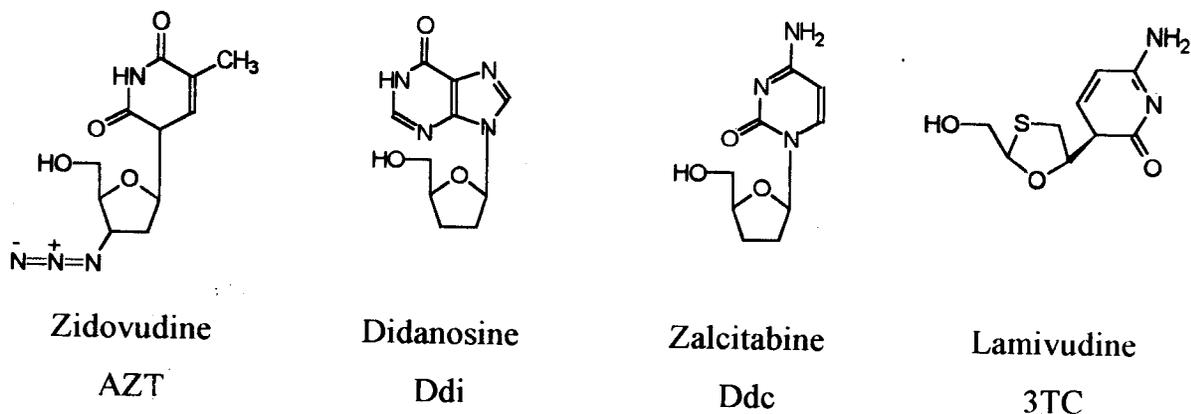
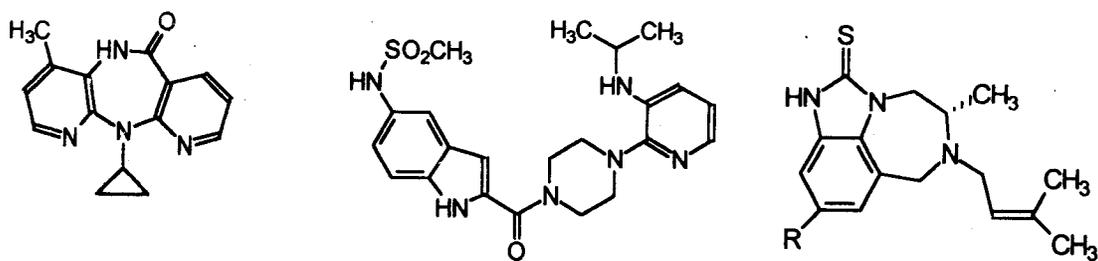


Figure 4: Inhibiteurs de transcriptase inverse nucléosidiques

5. 1. 2. Inhibiteurs non nucléosidiques

Le premier composé non nucléosidique décrits ayant une activité inhibitrice de la transcriptase inverse est la névirapine (dipyridodiazépinone), puis vint un dérivé pipérazinique, la delavirdine, et des tétrahydro-imidazobenzodiazépinones (TIBO). Des études tridimensionnelles basées sur l'analyse de la diffraction aux rayons X des cristaux de transcriptase inverse complexée à la névirapine montrent que ce composé agit directement sur l'enzyme en se fixant au niveau d'une poche hydrophobe très proche du site actif, bloquant ainsi son activité. Les structures de quelques inhibiteurs non nucléosidiques sont représentées à la **figure 5**.



Névirapine

Delavirdine

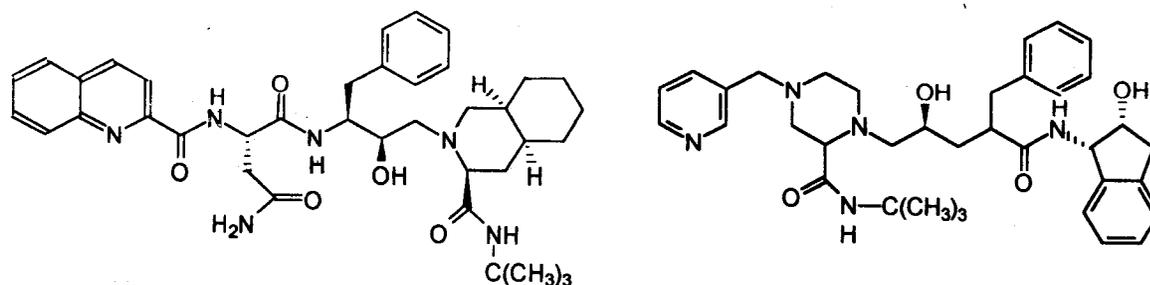
Composés TIBO

R = H R82150

R = Cl R82913

Figure 5: Inhibiteurs de transcriptase inverse non nucléosidiques**5. 2. Inhibiteurs de la protéase**

Ces substances agissent sur des phases plus tardives du cycle biologique du VIH, en inhibant la protéase virale, qui intervient dans la maturation des protéines et l'assemblage du virion. Cette inhibition se fait par liaison au site actif de la protéase. Exemples: saquinavir et indinavir. Les structures de quelques inhibiteurs de la protéase sont représentées à la **figure 6**.



Saquinavir

Indinavir

Figure 6: Inhibiteurs de la protéase

5. 3. Autres antirétroviraux agissant au cours des étapes de réplication du cycle du VIH

Plusieurs molécules sont en cours d'évaluation *in vitro*. Seules sont décrites celles qui sont entrées en phase d'essai clinique ou qui constituent un pôle important de la recherche d'antirétroviraux (11,12a). On peut citer notamment:

- 1- Les molécules polymériques sulfatées comme le sulfate de dextrane (**figure 7**), et le polysulfate de pentosane, inhibent *in vitro* la réplication du VIH en empêchant l'adsorption du virus à la surface cellulaire. Bien que leur toxicité sur la cellule-hôte soit faible, leur utilisation *in vivo* se heurte aux propriétés anticoagulantes de certaines d'entre elles, et à leur faible durée de vie plasmatique.
- 2- Les inhibiteurs, visant l'activité de la RNase H de la TI et qui interviennent lors de la dégradation de l'ARN en hybride ADN.
- 3- Les inhibiteurs de tat et rev (gènes régulateurs du virus). Par exemple, la benzodiazépine (Ro 5-3335, **figure 7**), bloque spécifiquement la transactivation du génome du VIH par la protéine Tat. En culture cellulaire, elle inhibe aussi bien la réplication virale, dans un cycle lytique, que la production de particules dans des cellules chroniquement infectées.
- 4- Les inhibiteurs de l'intégrase, la seule enzyme virale dont aucun inhibiteur n'est actuellement mis sur le marché. Néanmoins le 5CITEP, 1-(5-chloroindol-3-yl)-3-hydroxy-3-(2H-tétrazol-5-yl)-propénone est encore à l'étape expérimentale (12b).

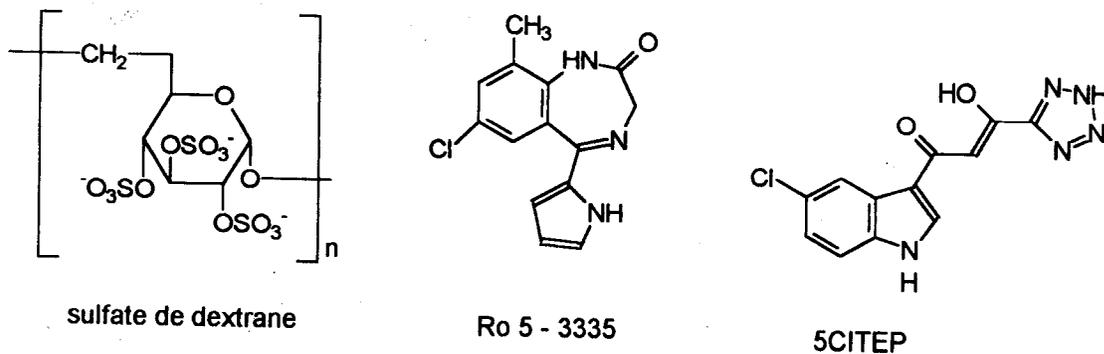


Figure 7: Structure d'autres antirétroviraux

6. Les thérapies actuelles anti-SIDA

D'importants progrès ont été réalisés depuis peu à la fois dans la compréhension de la physiopathologie de l'infection par le VIH et dans son traitement. Les molécules anti-SIDA actuellement disponibles se divisent en 2 classes:

1. Les inhibiteurs de la transcriptase inverse:

1. 1. Inhibiteurs nucléosidiques tels que la Zidovudine (AZT), la Didanosine (ddI), la Zalcitabine (ddC), la Lamivudine (3TC), la Stavudine (d4T) et l'Abacavir (1592U89).

2. 2. Inhibiteurs non nucléosidiques tels que la Nevirapine, la Delavirdine et l'Efavirenz.

2. Les inhibiteurs de la protéase tels que le Saquinavir, le Ritonavir, l'Indinavir, le Nelfinavir et l'Amprénavir (VX-478).

Les structures, les noms et les références bibliographiques de tous ces médicaments sont résumés en annexe.

L'efficacité d'un médicament anti-SIDA est déterminée par l'évaluation de la charge virale dans le sang et du nombre de cellules CD4+ circulantes. Sur ces 2 critères, les antiviraux actuels sont efficaces parfois seuls, mais plus souvent en combinaison: la trithérapie (2 inhibiteurs de transcriptase inverse et un inhibiteur de protéase) ou encore la quadrithérapie, association de 4 médicaments.

7. Limites des traitements actuels

1. Tous les antirétroviraux connus à ce jour entraînent la sélection de mutants résistants qui peuvent être mis en évidence sous la pression de sélection en cultures (11,18).

2. Aucune de ces molécules n'est exempte d'effets secondaires (nausées, vomissements, anémie.....).

3. La majorité des drogues ne traversent que peu la barrière hémato-encéphalique (BHE), donc sont incapables d'atteindre efficacement le cerveau (19). Or les macrophages du cerveau sont des réservoirs de virus, et peuvent donc alimenter l'organisme de nouveau virus.

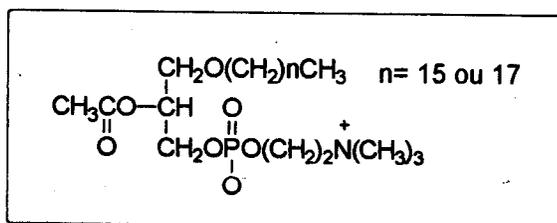
8. Conclusion

Les polythérapies antirétrovirales assurent une diminution nette de la charge virale plasmatique et une remontée du nombre de lymphocytes T CD4+ circulants chez 50 à 60% des patients. Toutefois, le virus n'est pas éliminé de l'organisme, même si aucune trace de réplication virale ne persiste dans le compartiment sanguin. A l'heure actuelle, il semble donc que ces traitements ne permettent pas une éradication du virus. Enfin, les fonctions immunitaires des patients traités ne sont restaurées que partiellement. Il est donc important de développer des thérapeutiques adjuvantes aux traitements antirétroviraux, ayant pour but d'améliorer les fonctions immunitaires.

II-LE FACTEUR D'ACTIVATION DES PLAQUETTES (PAF)

1. Introduction

Le facteur d'activation des plaquettes (Platelet-Activating Facteur, PAF) est un phospholipide éther dérivé des phospholipides membranaires découvert en 1972 par Benveniste (20), dont la structure 1-O-alkyl-2-(R)-acétyl-glycéro-3-phosphorylcholine a été déterminée par hémi-synthèse par Demopoulos (21) et Benveniste (22). Sa synthèse totale a été réalisée par Godfroid (23) et Heymans (24,25).



Structure du PAF

Le PAF naturel est un mélange variable suivant son origine cellulaire de chaînes majoritairement à 16 et 18 carbones, dont les propriétés biologiques sont identiques. Il existe sous forme à 18 carbones (80%) et à 16 carbones dans les cellules humaines et le plasma.

Le PAF est présenté à l'origine comme un facteur soluble sécrété par les basophiles de lapin préalablement sensibilisé aux immunoglobulines E (IgE) (20), et capable d'induire l'agrégation des plaquettes sanguines.

Le PAF est reconnu comme l'un des plus puissants médiateurs de l'inflammation, et est impliqué dans un grand nombre de processus physiopathologiques, tels que l'asthme, l'allergie, les désordres vasculaires cardiaques et cérébraux et le rejet de greffe. La bibliographie complète concernant ses effets biologiques est présentée dans les ouvrages généraux (26-28).

2. Le récepteur biologique du PAF

L'interaction du PAF avec son récepteur spécifique semble une étape clef dans l'expression de ces fonctions biologiques. L'existence de sites spécifiques du PAF a été confirmée sur les plaquettes, les leucocytes et des tissus d'origines diverses (cerveau, poumon, etc.....) chez l'homme, et dans diverses espèces animales (29-31).

L'existence d'un site récepteur à haute affinité pour le PAF dans la membrane cellulaire est confirmée par:

- la très faible concentration nécessaire pour une activité significative (<0,1 nM);
- la désensibilisation subséquente à l'action du médiateur;
- l'énantiospécificité de l'activité sur les plaquettes, le PAF (synthétique) dans sa conformation naturelle (R) étant 1000 fois plus actif que l'énantiomère (S) (32);
- la fixation (binding) de PAF marqué au tritium ($[^3\text{H}]$ PAF) (33).

3. Les antagonistes du PAF

Depuis sa découverte, son identification et son implication dans divers processus physiopathologiques, une grande variété d'antagonistes spécifiques du PAF, naturels et synthétiques ont été développés. On cite deux grandes classes:

3. 1. Antagonistes analogues à la structure du PAF

Il portent un squelette glycérol de nature phospholipidique ou non. Des modifications structurales du PAF ont permis de passer d'une activité agoniste à une activité antagoniste (**figure 8**) (34-37).

3. 2. Antagonistes de structure différente du PAF

On distingue des composés naturels, comme des dérivés des terpènes, Ginkgolide (BN52022), extrait des feuilles de Ginkgo biloba, d'origine chinoise (38) et des lignanes (Kadsurenone), isolés de plantes chinoises et brésiliennes (39). Des composés synthétiques, par exemple des néolignanes (L-652-731) (40), le SRI 63 441 (41), des triazolothiénobenzodiazépines (WEB) (42) (**figure 9**), et des composés dérivés de la pipérazine, qui seront développés dans le paragraphe suivant.

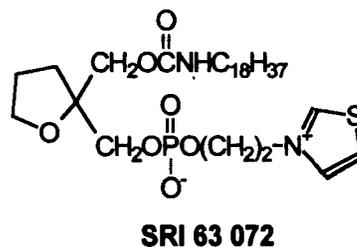
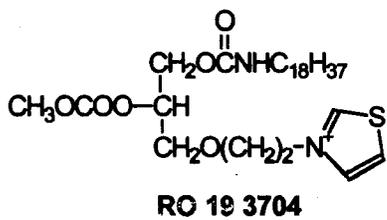
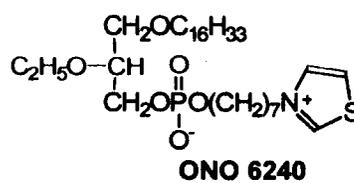
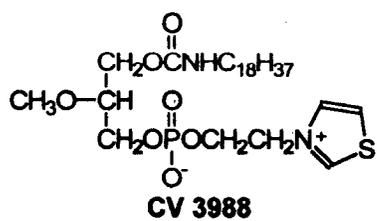


Figure 8: Antagonistes analogues à la structure du PAF

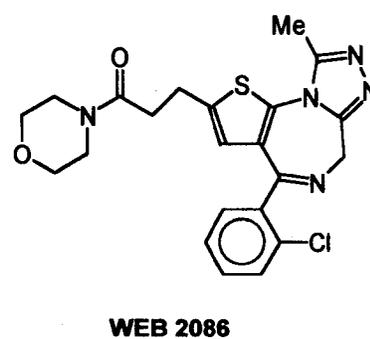
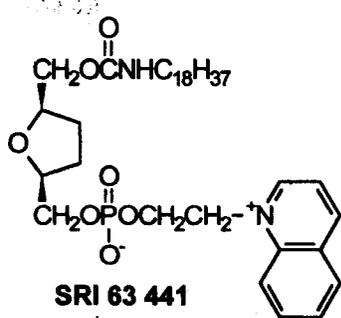
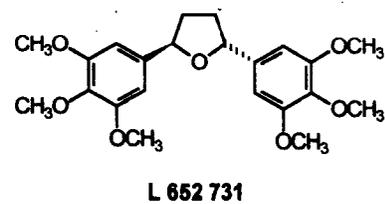
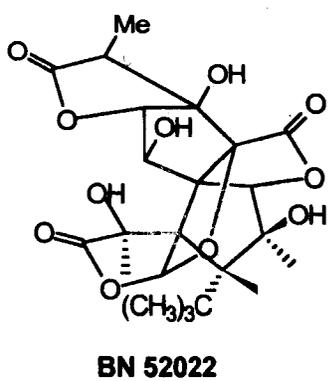


Figure 9: Antagonistes de structure différente du PAF

4. Antagonistes du PAF dérivés de la pipérazine

Le laboratoire du Professeur Godfroid s'est investi depuis une dizaine d'années dans l'étude structure-activité (lipophilie, distribution électronique, et modélisation moléculaire) des molécules agonistes et antagonistes du PAF, ce qui a permis à G. Dive et J.J. Godfroid la mise au point d'un premier modèle de récepteur biologique du PAF à "cache-oreilles" bipolaire représenté **figure 10** (43-44). Le récepteur du PAF comporte un volume cylindrique d'un diamètre de 10 à 12 Å polarisé, présentant une poche hydrophobe à environ 5 Å d'une extrémité polaire. Ce modèle amélioré par la suite, a conduit au récepteur biologique multipolaire représenté **figure 11** (45), comportant six zones polaires distantes de 10-12 Å, 14 Å, 6,5-7 Å et une poche hydrophobe à environ 5 Å, grâce à la synthèse d'une série d'antagonistes du PAF de nature pipérazinique (46-48), ce sont des 1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazines substituées en position 2 (**figure 12**). Le calcul des potentiels 3-d de ces antagonistes montre l'existence de deux potentiels électrostatiques négatifs localisés à 180° distants de 12 Å créés par les groupes méthoxy et deux potentiels électrostatiques négatif à 6,5 Å générés par les carbonyles des fonctions amides (**figure 13**). Ces structures se logent dans le site du récepteur biologique du PAF créant ainsi une compétition avec le PAF, d'où un effet antagoniste. Le substituant R permet une meilleure affinité et un positionnement optimal de la molécule.

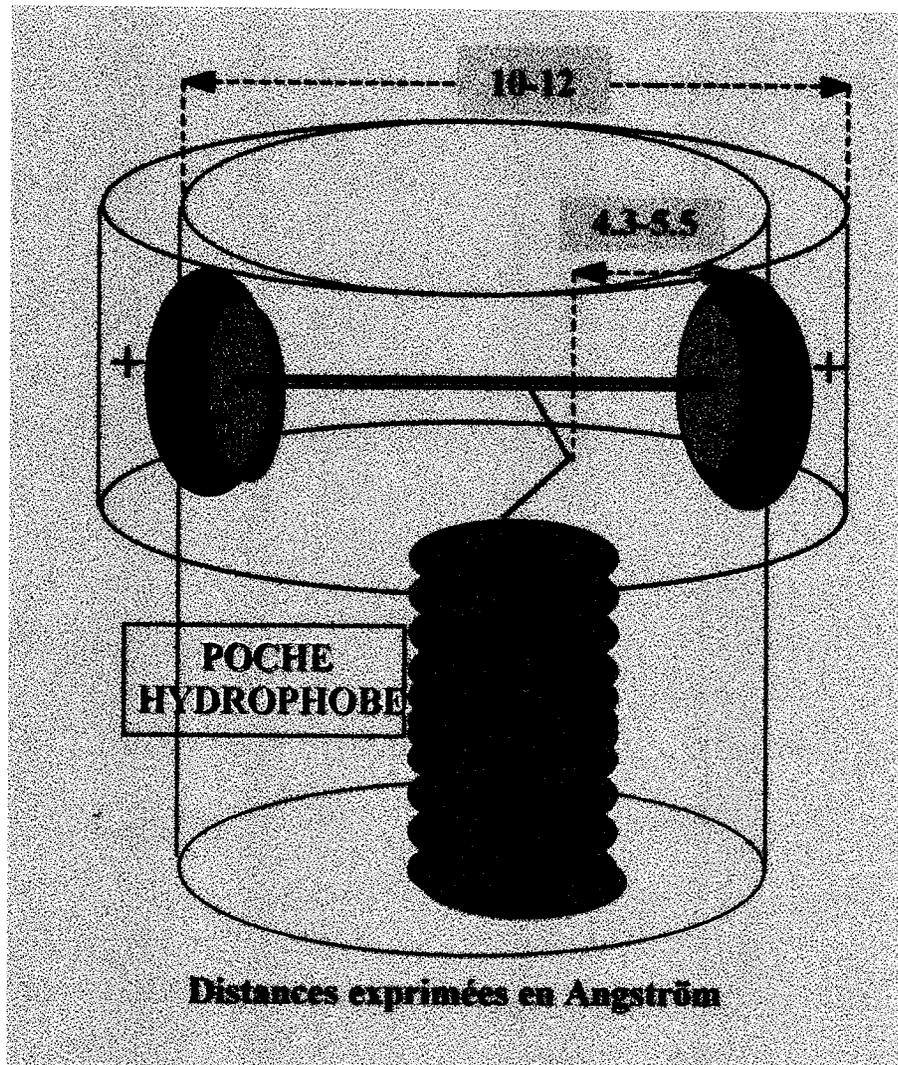


Schéma 10: Modèle du récepteur du PAF

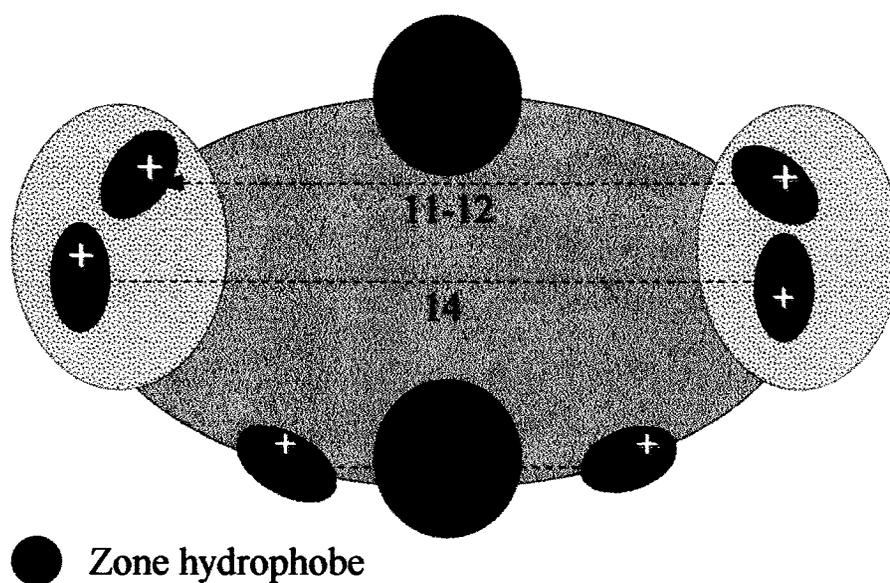
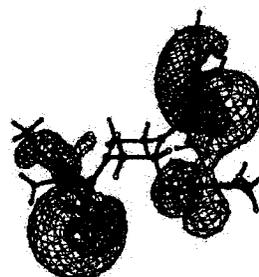
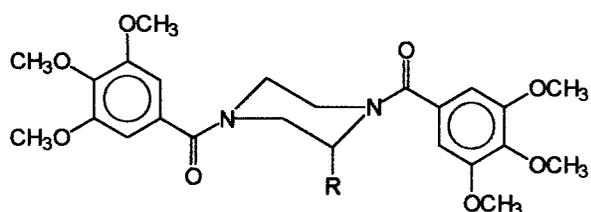


Schéma 11: Modèle du récepteur mutipolaire du PAF



**Schéma 12: Antagonistes du PAF
dérivés de la pipérazine**

**Schéma 13: Potentiel électrostatique 3-d
d'un antagoniste du PAF dérivé de la
pipérazine**



CHAPITRE II

**LE FACTEUR D'ACTIVATION DES PLAQUETTES (PAF) DANS
L'INFECTION PAR LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE**

(VIH)



Le Facteur d'Activation des Plaquettes (PAF) dans l'infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)

1. Introduction

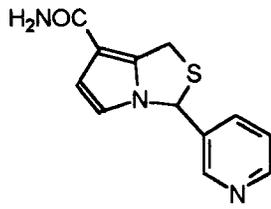
L'infection par le VIH est associée à un syndrome inflammatoire et des dysfonctionnements neurologiques. Ces événements tissulaires pathophysiologiques sont tous deux déclenchés par la coopération productive des macrophages infectés par le VIH et/ou des macrophages activés, qui sécrètent des taux élevés de cytokine pro-inflammatoire, le TNF- α , et de PAF (49). Dans le SNC des patients atteints de démence associée au VIH, le nombre des macrophages qui expriment l'ARNm codant pour le TNF- α est élevé en comparaison avec celui des patients infectés par le VIH, mais qui ne présentent pas de démence. De même, le taux de PAF est élevé dans le fluide cérébro-spinal des patients présentant une démence et un système immunitaire altéré (50). Etant donné que l'infection directe des neurones par le VIH est peu probable et que le TNF- α et le PAF sont tous deux neurotoxiques, il existe un consensus pour admettre que le dysfonctionnement neuronal et l'apoptose sont provoqués par ces facteurs solubles libérés par les macrophages ou par les cellules apparentées dans le SNC, la microglie (51). Le PAF est probablement l'élément clé de ce phénomène parce que l'apoptose neuronale due au TNF- α peut être diminuée aussi bien par la PAF acétylhydrolase (50), la principale enzyme responsable du catabolisme du PAF, que par des antagonistes du récepteur du PAF (50). Bloquer les effets pathologiques du PAF pourrait donc constituer une étape charnière dans le traitement de la démence et du syndrome inflammatoire associés au SIDA (52). Des tissus tels que le cerveau sont des sites de réplication du VIH et peuvent servir de réservoir au virus. Le TNF- α amplifie la production du VIH-1 dans les macrophages infectés tandis que le PAF paraît augmenter la synthèse du TNF- α (53-55). Par conséquent, il est assez digne d'intérêt d'intervenir dans la transduction du signal pour lequel le PAF sert de médiateur afin de voir si cela mène à réduire la réplication du VIH dans les tissus. L'efficacité toute relative dans les tissus, et en particulier dans le SNC, des anti-rétroviraux utilisés actuellement chez les patients infectés par le VIH (56) aurait à gagner à la thérapie adjuvante qu'apportent les antagonistes du PAF.

Selon Weissman et coll. (57) et Naour et coll. (58), des antagonistes du récepteur du PAF tels que le RP55778, [(+)-3-(3-pyridyl)-1H,3H-pyrrolo-[1,2-c]thiazole-7-carboxamide] (Rhône-Poulenc, **figure 14**), énantiomère actif (+) du mélange racémique du RP 48740 (59) et inhibiteur de la synthèse du TNF- α (60), qui ont montré *in vitro* des effets anti-VIH sur lignées cellulaires de monocytes infectés par le VIH ou sur des macrophages dérivés de monocytes (MDM), pourraient constituer des produits potentiellement utiles dans le traitement de l'infection au VIH.

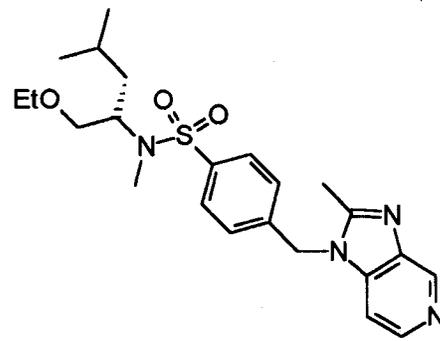
L'effet inhibiteur relativement puissant du RP55778 ($DE_{50} = 50 \mu\text{M}$) sur la réplication du VIH-1-DAS, un isolat primaire de VIH à tropisme macrophagique, pourrait autoriser son utilisation comme adjuvant dans le traitement du SIDA (58). De plus un article récent a montré que le Lexipafant (BB-882, **figure 14**), un antagoniste du PAF, qui réduit la défaillance de l'organe et supprime certains aspects de la réponse inflammatoire dans la pancréatite aiguë (61) est en phase d'essais cliniques I-II dans le traitement de la démence due au SIDA (62).

Vers la fin des années 80, le Laboratoire de Pharmacochimie Moléculaire spécialiste du PAF, des anti-PAF et du récepteur du PAF a démontré que des dérivés de la 1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine (**figure 14**) étaient capables d'inhiber *in vitro* les effets du PAF sur l'agrégation plaquettaire, et par conséquent pouvaient être utilisés dans les pathologies dans lesquelles ce médiateur lipidique est impliqué (63). Considérant le rôle des macrophages dans l'infection par le VIH et les processus inflammatoires, dans le SNC, nous avons entrepris, en collaboration avec le Laboratoire de Neurovirologie du CEA, de rechercher les effets anti-VIH éventuels de plusieurs antagonistes du récepteur du PAF de nature pipérazinique (**figure 14**) sur des cultures de MDM infectées par la souche de référence VIH-1/Ba-L à tropisme macrophagique.

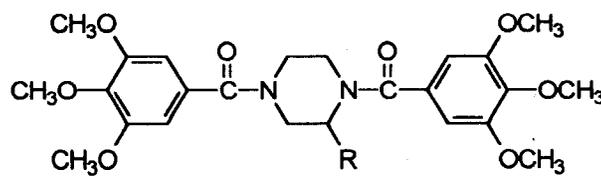
Les résultats préliminaires obtenus sont présentés dans le paragraphe suivant.



RP-55778



BB-882

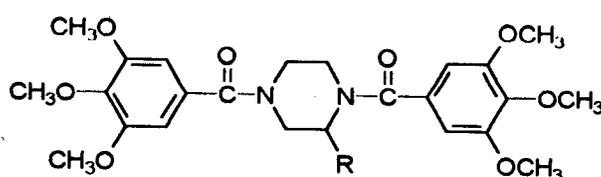


**Antagonistes du PAF dérivés
de la 1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine**

Figure 14

2. Résultats préliminaires

Des antagonistes du PAF dérivés de la pipérazine de structure:



ont été testés sur des macrophages dérivés de monocytes (MDM) infectés par la souche de référence à tropisme macrophagique HIV-1 / Ba-L. Les résultats biologiques, regroupés dans le **tableau 2** par ordre croissant de lipophilie du substituant R (f_R) calculé selon Rekker et coll. (64), ont permis de faire les constatations suivantes:

Tableau 2

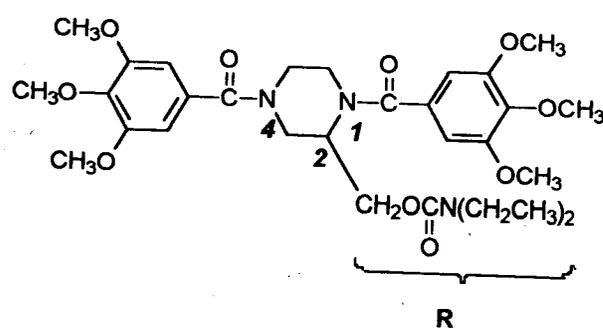
N°	R	f_R^a	Anti-PAF ^b (CI ₅₀ , μM)	Anti-VIH ^c (% d'inhibition)
PMS 601		0,564	8	95
a		0,853	0,13	52
b		1,372	1	74
c		1,526	0,1	25
d		1,602	0,37	66
e		1,891	0,28	-2

^a Lipophilie du substituant R, calculée par la méthode de Rekker et coll (64). ^b Inhibition de l'agrégation plaquettaire induite par le PAF sur plasma riche en plaquettes (PRP) de sang de lapins New Zealand. CI₅₀ = concentration molaire provoquant une inhibition de 50% de l'agrégation maximale, déterminée à partir de courbes "effet-dose", voir chapitre IV. ^c Pourcentage d'inhibition de la réplication du VIH-1 à la dose de 100 μM, évaluée par la mesure de l'activité de la transcriptase inverse dans les surnageants de culture de monocytes / macrophages infectés par l'isolat VIH-1/Ba-L.

- 1) Certains de ces composés, en plus de leur activité anti-PAF, sont dotés d'une activité anti-VIH considérable. Ainsi, le **PMS 601** inhibe à 95% la réplication, à la dose de 100 μM .
- 2) Il n'y a pas de corrélation entre les deux activités, anti-PAF et anti-VIH. Ainsi, le meilleur antagoniste du PAF de cette série, l'ester **c**, présente une activité anti-VIH qui n'est que de 25%.
- 3) La fonction carbamate semble un groupement très favorable pour une double activité qu'il soit bisubstitué (**PMS 601** et composé **d** (66%)), ou monosubstitué (composés **a** et **b**) qui présentent des activités anti-VIH respectives de 52 et 74%.
- 4) La lipophilie du substituant R (f_R) apparaît moins importante pour l'activité anti-PAF que dans l'activité anti-VIH. Ainsi les composés **a - e** dont la lipophilie de R varie de 1 à 2 unités de logP présentent des activités anti-PAF comparables, tandis que le composé **e**, le plus lipophile, est totalement dépourvu d'activité anti-VIH.
- 5) Le **PMS 601**, composé le plus actif comme anti-VIH de la série, présente la contribution à la lipophilie de son groupement R la plus faible (0,5 unité de logP).

3. Objectifs

A la lumière de ces résultats encourageants, notre travail a consisté à synthétiser des analogues du **PMS 601** avec le double objectif d'améliorer l'activité et d'en comprendre le mécanisme d'action. Des modifications structurales susceptibles de faire varier les différents paramètres, lipophilie, distribution électronique et/ou effet stérique ont donc été envisagées. Elles sont développées dans le paragraphe suivant.



PMS 601

1/ Modification du substituant R en position 2 de la pipérazine

Les résultats préliminaires ayant révélé un optimum de lipophilie de 0,5 unité de logP pour le substituant R, nous avons apporté des modifications sur ce substituant tout en gardant une lipophilie aux alentours de cette valeur.

a) Modification au niveau de la partie amine de la fonction carbamate:

Nous avons introduit des amines cycliques telles que la pipéridine et la pyrrolidine et une amine linéaire, la n-butylamine.

b) Modification de l'enchaînement des atomes du groupement carbamate:

Afin de vérifier l'influence de la position de l'oxygène et de l'azote sur les activités, nous les avons inversés, ce qui nous a amenés à la synthèse du dérivé dans lequel $R = CH_2-NH-CO-O-CH(CH_3)_2$.

c) Modification du groupement fonctionnel carbamate:

- introduction de la fonction amide: $R = CH_2-NH-CO-C(CH_3)_3$

- substitution de l'oxygène par NH. La fonction uréate est soit monosubstituée sur le 2^{ème} azote ($R = CH_2-NH-CO-NH-R'$) avec R' linéaire (n-hexyle) ou aromatique (2,6-diméthylphényle), soit disubstituée ($R = CH_2NHCONEt_2$) La structure obtenue est analogue au **PMS 601** mais de lipophilie inférieure. Ce la nous a conduits à préparer un autre composé avec $R = CH_2NHCONPr_2$, de lipophilie plus proche de celle du **PMS 601**.

- modification de R: nous avons testé les intermédiaires réactionnels dont la lipophilie de R est variable, soit inférieure à celle du **PMS 601** tels que nitrile ($R = CN$) et alcool ($R = CH_2OH$), soit supérieure: phényle carbonate ($R = CH_2OCOPh$). Enfin pour vérifier que l'activité médiocre sur le VIH de l'ester c (dans les résultats préliminaires) n'était pas due à sa trop grande lipophilie, nous avons préparé et testé l'ester isolipophile du **PMS 601**, le propionate ($R = CH_2OCOEt$).

2/ Modification des substituants en position 1 et 4 de la pipérazine

Des travaux précédents du laboratoire ayant démontré l'implication du nombre et de la position des méthoxyles sur l'activité anti-PAF (65), nous avons voulu voir quel était leur rôle dans l'activité anti-VIH. C'est pourquoi nous avons modifié le

nombre et la position des méthoxyles sur les "cache-oreilles" en préparant des analogues du **PMS 601** sans OMe ou avec seulement 2 OMe, soit en positions 2,4 soit en positions 3,4 des benzoyles.

3/ Composés soufrés

Le soufre est présent dans beaucoup de composés biologiquement actifs (66) et peut apporter un plus par rapport à l'oxygène, soit par sa lipophilie plus importante, soit par son volume, soit par son caractère électronique différent. Nous avons entrepris de remplacer un ou plusieurs carbonyles du **PMS 601** par leur équivalent thiocarbonyle, soit au niveau de R (fonction thiocarbamate, $R = CH_2OCSNEt_2$ et $R = CH_2OCSNMe_2$), soit au niveau de la fonction amide (thioamide en position 1, 4 ,ou les deux.

Toutes ces molécules ont été testées *in vitro* pour leur activité anti-PAF et anti-VIH. La synthèse et l'étude biologique sont développés dans les chapitres suivants.

De la discussion des résultats, de nouvelles hypothèses permettent une ouverture vers des perspectives à exploiter.

Une partie de ce travail a déjà fait l'objet de deux publications et de plusieurs communications (67-74). L'autre partie est en cours de rédaction pour publication.

CHAPITRE III

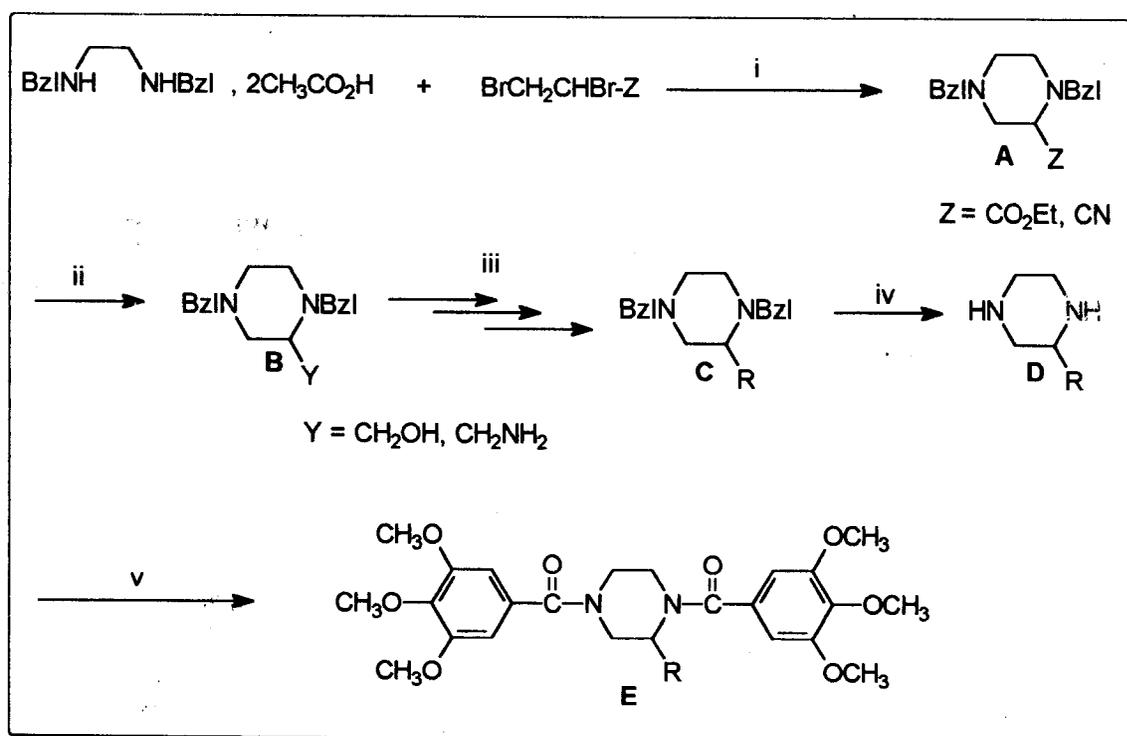
CHIMIE



I-SYNTHESE ORGANIQUE

Les analogues structuraux du PMS 601 ont, dans leur majorité, été préparés selon la stratégie décrite dans le schéma I. Une réaction de cyclisation permet d'obtenir la 1,4-dibenzylpipérazine substituée en position 2 par un groupement attracteur ($-\text{CO}_2\text{Et}$ ou $-\text{CN}$), composés A. La fonction ester (ou nitrile) est alors réduite en fonction alcool (ou amine), composés B. Ces derniers subissent diverses réactions selon la nature du substituant R en position 2 désirée, composés C. Elles sont décrites dans les schémas I.1 et I.2. La débenzylation des composés C conduit aux pipérazines substituées D. Enfin, une réaction d'amidification par le chlorure de 3,4,5-triméthoxybenzoyl permet d'aboutir aux produits finaux E.

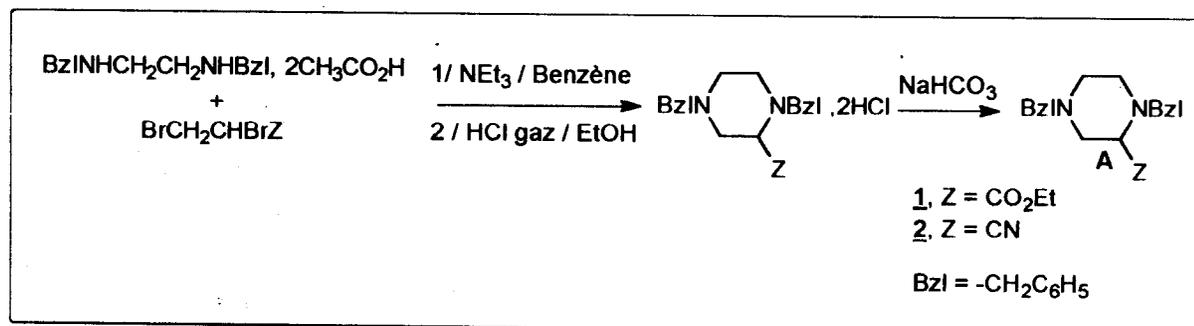
Schéma I: Synthèse des 1,4 di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazines substituées en position 2



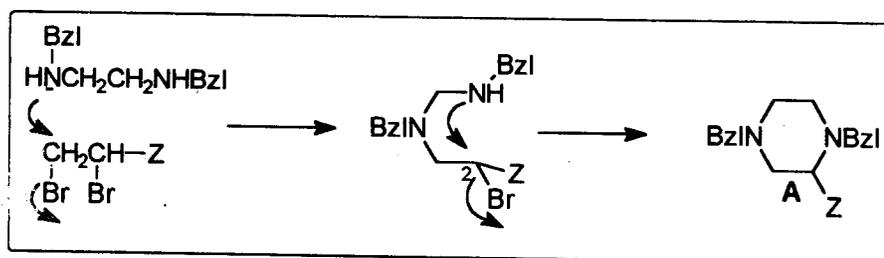
i) Benzène / NEt_3 . ii) LiAlH_4 / Ether. iii) voir schémas I.1 et I.2. iv) H_2 / Pd-C ou 1. $\text{Cl}_3\text{CCH}_2\text{COCl}$ / DMF, 2. Zn / $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$. v) 3,4,5-(CH_3O) $_3\text{C}_6\text{H}_2\text{COCl}$ / NEt_3 / CH_2Cl_2 .

A/ Procédé général

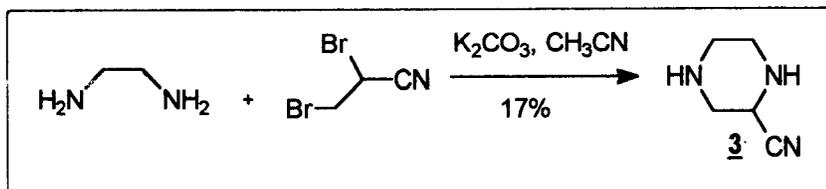
1. Cyclisation

Synthèse des 1,4-dibenzyl-2-éthoxycarbonylpipérazine **1** et 1,4-dibenzyl-2-cyanopipérazine **2**

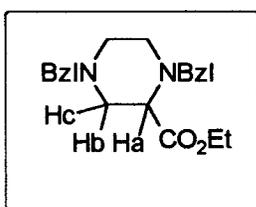
La cyclisation selon la méthode de Jucker et coll. (75) du diacétate de 1,4-dibenzyléthylène diamine soit avec le 2,3-dibromopropionate d'éthyle (Z = CO₂Et) ou le 2,3-dibromopropionitrile (Z = C≡N) conduit respectivement à l'ester **1** et au nitrile **2**. La formation des chlorhydrates permet leur isolement à l'état de solides et leur purification par recristallisation. Dans les deux cas, les rendements sont bons grâce au caractère attracteur du groupement Z. Des essais réalisés avec Z = CH₂OH, alkyle ou aryle ont mené à la formation de nombreux produits secondaires (76). L'effet attracteur de Z intervient surtout au niveau de la fermeture du cycle en augmentant la charge positive partielle du carbone en α qui le porte, ce qui favorise l'attaque nucléophile du deuxième azote.



Un autre essai, la cyclisation de l'éthylène diamine sur le 2,3-dibromo propionitrile donne la 2-cyanopipérazine **3** en quantité trop faible, ce qui justifie l'utilisation de la dibenzyléthylène diamine.



En RMN ^1H , les protons en position 2 (Ha) et 3 (Hb, Hc) de la pipérazine ont été attribués après irradiation de l'ester **1** à 3,225 ppm, ce qui a conduit aux valeurs trouvées ci-dessous.



$$\delta \text{ Ha} = 3,23 \text{ ppm, dd, } J_{ab} = 6 \text{ Hz, } J_{ac} = 3 \text{ Hz}$$

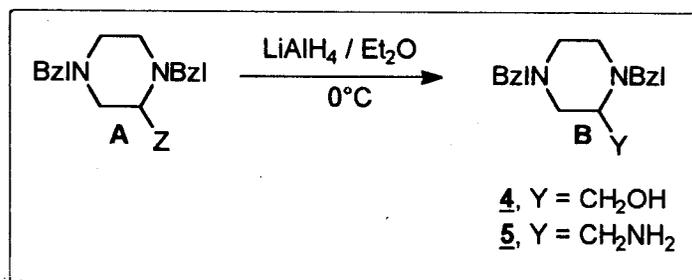
$$\delta \text{ Hb} = 2,67 \text{ ppm, dd, } J_{bc} = 11 \text{ Hz, } J_{ab} = 6 \text{ Hz}$$

$$\delta \text{ Hc} = 2,51 \text{ ppm, dd, } J_{bc} = 11 \text{ Hz, } J_{ac} = 3 \text{ Hz}$$

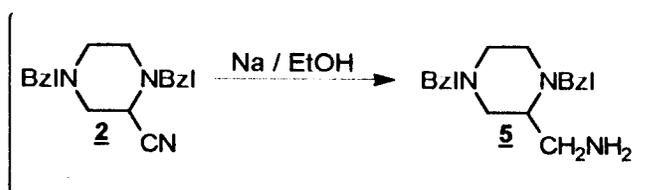
2. Réduction

Synthèse des 1,4-dibenzyl-2-(hydroxyméthyl)pipérazine **4** et 1,4-dibenzyl-2-(aminométhyl)pipérazine **5**

Nous avons utilisé LiAlH_4 (77,78) aussi bien pour la réduction de l'ester **1** ($\text{Z} = \text{CO}_2\text{Et}$) en alcool **4** ($\text{Y} = \text{CH}_2\text{OH}$) que pour celle du nitrile **2** ($\text{Z} = \text{CN}$) en amine **5** ($\text{Y} = \text{CH}_2\text{NH}_2$).



Nous avons aussi essayé le procédé de Ladenburg (79), pour réduire le nitrile 2 en amine 5 en utilisant le sodium dans l'éthanol. Le résultat obtenu est pratiquement le même.

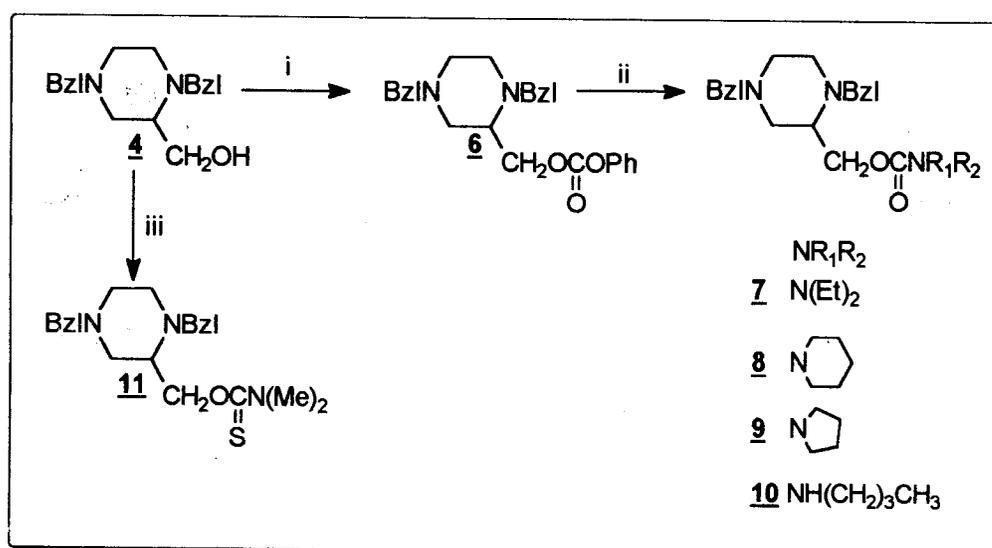


L'alcool 4 et l'amine 5 ont été caractérisés en IR par la bande O-H visible à 3371cm^{-1} pour 4 et les bandes NH_2 à 3378 et 3289cm^{-1} pour 5 et par la présence en RMN ^1H , des protons échangeables de l'alcool lors de l'addition de D_2O à $3,74\text{ ppm}$ et de l'amine à $1,34\text{ ppm}$.

3. Synthèse des intermédiaires C à fonction carbamate et thiocarbamate en 2

L'introduction de ces fonctions a été réalisée selon le schéma réactionnel ci-dessous (schéma I.1).

Schéma I.1: Synthèse des intermédiaires carbamate et thiocarbamate



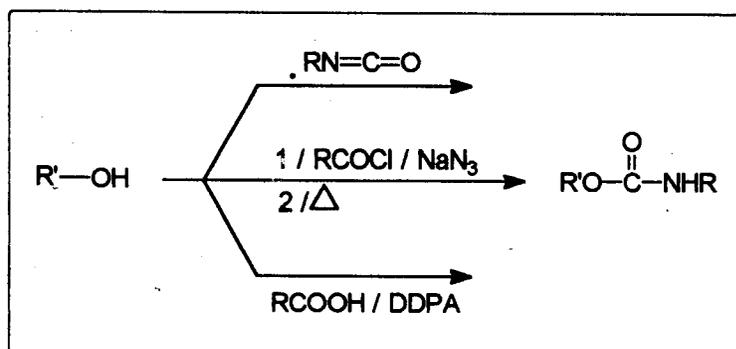
i) $\text{PhOCOCl} / \text{NEt}_3 / \text{CH}_2\text{Cl}_2$. ii) HNR_2 . iii) 1. NaH / DMF , 2. $\text{ClCSN}(\text{Me})_2$.

Handwritten: HNR₂

Handwritten signature:

a) Synthèse des 1,4-dibenzyl-2-(N,N-dialkyl et N-alkylcarbamoyloxyméthyl) pipérazine

Le passage de la fonction alcool à la fonction carbamate est réalisé classiquement par condensation d'un isocyanate. Les isocyanates commerciaux sont utilisés directement (80). Les autres peuvent être préparés *in situ*, à partir soit de l'acide carboxylique correspondant et du diphenylphosphorazide soit du chlorure d'acide et d'un azide (81).



Cependant, ces réactions ne permettent pas d'obtenir les carbamates bisubstitués sur l'azote. C'est pourquoi, nous avons préféré utiliser la méthode de Takatani (82), qui permet de préparer les carbamates mono ou bisubstitués en passant par un intermédiaire isolable, le carbonate 6. Celui-ci est obtenu par action du chloroformiate de phényle sur l'alcool 4. La substitution à reflux du groupe phénoxy labile par différentes amines secondaires telles que la diéthylamine, la pipéridine et la pyrrolidine ou primaire comme la n-butylamine, conduit respectivement aux carbamates 7 à 10.

En IR, ces composés sont caractérisés par la bande C=O du carbamate, qui apparaît entre 1695 et 1712 cm^{-1} , à une position inférieure à celle de la bande C=O du carbonate 6, à 1758 cm^{-1} . En RMN ^1H , les protons CH_2O résonent dans l'intervalle 4,38-4,10 ppm sous forme d'un doublet de doublet, avec des constantes de couplage $J_{\text{gem}} = \sim 13$ Hz, J_{vic} et $J_{\text{vic}} = \sim 4$ et 8 Hz.

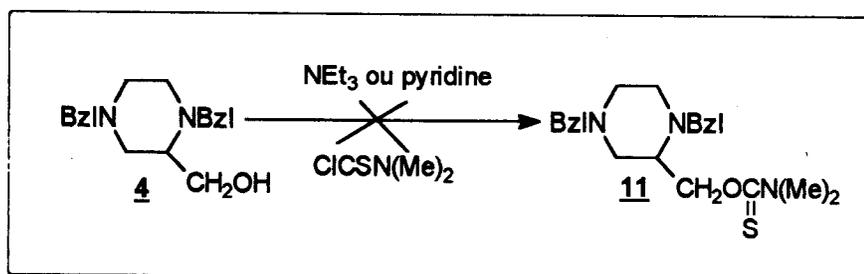
12

à confirmer

b) Synthèse de la 1,4-dibenzyl-2-(N,N-diméthylthiocarbamoyloxyméthyl) pipérazine 11

La fonction thiocarbamate de 11 a été obtenue par action de NaH sur l'alcool 4 suivie du traitement de l'alcoolate correspondant, intermédiaire non isolable, par le chlorure de diméthylthiocarbamoyle.

Des essais de réaction directe de l'alcool 4 avec le chlorure de diméthylthiocarbamoyle en présence soit de triéthylamine soit de pyridine n'ont pas abouti. On récupère l'alcool 4 de départ.

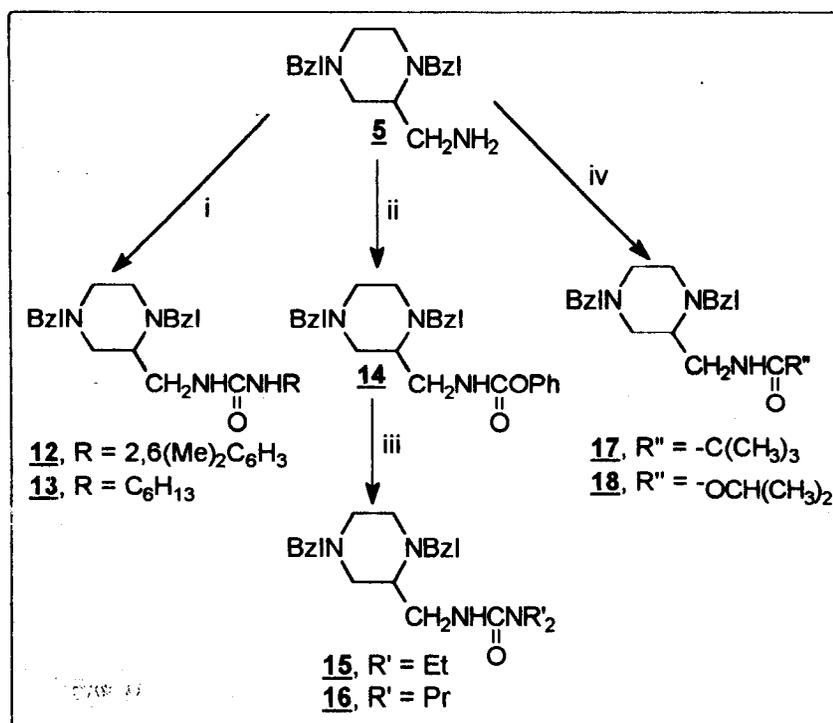


L'introduction de cette fonction a aussi été réalisée à un stade plus avancé de la synthèse et sera décrite plus loin.

4. Synthèse des intermédiaires C à fonctions uréate, amide et «carbamate inversé»

Ils sont obtenus à partir de l'amine **5** selon le schéma I.2.

Schéma I.2: Synthèse des intermédiaires uréates, amide et «carbamate inversé»



i) RN=C=O / Et₂O. ii) PhOCOCl / Pyridine / CH₂Cl₂. iii) HNR'₂. iv) ClCOR'' / toluène ou CH₂Cl₂.

a) Synthèse des uréates monosubstitués: 1,4-dibenzyl-2-(N-2,6-diméthylphényl uréidométhyl)pipérazine **12** et 1,4-dibenzyl-2-(N-hexyluréidométhyl)pipérazine **13**

Pour la préparation des dérivés de l'urée qui ne portent qu'un seul substituant (**12** et **13**), nous avons adapté la méthode de Castro (83) et condensé sur l'amine **5** soit le 2,6-diméthylphénylisocyanate (**12**), soit l'hexylisocyanate (**13**).



b) Synthèse des uréates disubstitués: 1,4-dibenzyl-2-(N,N-diéthyluréidométhyl) pipérazine **15** et 1,4-dibenzyl-2-(N,N-dipropyluréidométhyl) pipérazine **16**

La méthode précédente ne permet pas d'obtenir les dérivés de l'urée bisubstitués sur le même azote. Pour préparer les composés **15** et **16**, nous avons encore une fois adapté la méthode de Takatani (82).

L'action du chloroformiate de phényle sur l'amine **5** conduit au carbamate **14**, et la substitution du groupe phénoxy par la diéthylamine ou la dipropylamine conduit respectivement aux composés **15** et **16**.

c) Synthèse de l'amide et du «carbamate inversé»

1,4-dibenzyl-2-(2,2-diméthyl propionamidométhyl)pipérazine **17 et 1,4-dibenzyl-2-(isopropyloxycarbonyl aminométhyl)pipérazine **18****

Le traitement de l'amine **5** par le chlorure de 2,2-diméthylpropionyle conduit à l'intermédiaire amide **17**, et le chloroformate d'isopropyle permet d'aboutir au «carbamate inversé» **18**.

5. Débenzylation

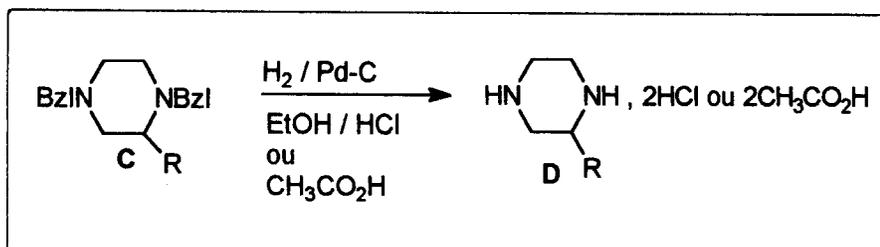
Synthèse des dérivés de la pipérazine substitués en position 2

Selon que l'intermédiaire dibenzylé **C** comporte ou non du soufre sur l'appendice en 2, deux méthodes ont été utilisées.

Cas des composés non soufrés:

La débenzylation par hydrogénolyse catalysée par le charbon palladié selon le procédé de Jucker (75) est réalisée sous pression d'hydrogène, à 40°C dans un appareil de PARR. L'état d'avancement de la réaction est suivi en vérifiant la pression de H₂ et en contrôlant par chromatographie sur couche mince (CCM), toutes les 3 heures, la disparition du produit de départ.

A température ambiante ou quand la pression de H₂ est faible, la réaction est plus lente. En revanche, sa vitesse augmente en milieu acide. Ceci est dû probablement à la fragilisation de la liaison (N-Bzl), à cause de la protonation de l'azote de la pipérazine. Nous avons adopté ce procédé pour la majorité des composés **D** qui sont donc obtenus sous forme de sels.



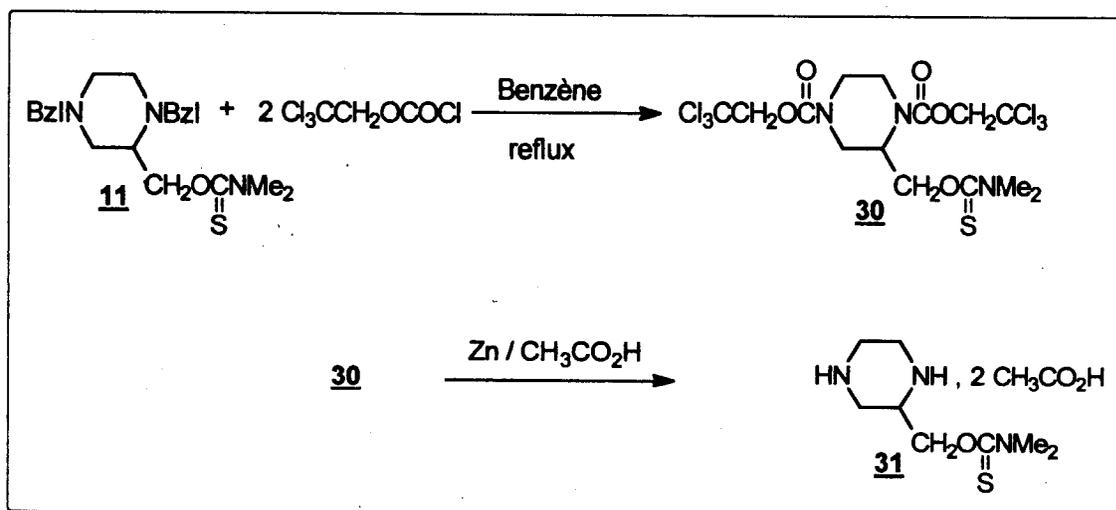
C	R	D	C	R	D
<u>1</u>	CO ₂ Et	<u>19</u>	<u>13</u>	CH ₂ NHCONH-C ₆ H ₁₃	<u>25</u>
<u>7</u>	CH ₂ OCONEt ₂	<u>20</u>	<u>15</u>	CH ₂ NHCONEt ₂	<u>26</u>
<u>8</u>	CH ₂ OCON 	<u>21</u>	<u>16</u>	CH ₂ NHCONPr ₂	<u>27</u>
<u>9</u>	CH ₂ OCON 	<u>22</u>	<u>17</u>	CH ₂ NHCOC(CH ₃) ₃	<u>28</u>
<u>10</u>	CH ₂ OCONHBu	<u>23</u>	<u>18</u>	CH ₂ NHCOOCH(CH ₃) ₂	<u>29</u>
<u>12</u>	CH ₂ NHCONH 	<u>24</u>			

En IR, la bande à 1600 cm⁻¹ (C-C aromatique) caractéristique du groupe benzylique disparaît, pour faire place aux bandes caractéristiques des N⁺H₂ à 2700 et 2800 cm⁻¹. En RMN¹H, tous les spectres montrent la disparition du signal caractéristique des protons aromatiques aux alentours de 7 ppm et l'apparition d'un signal aux alentours de 10 ppm des protons de la diamine protonée N⁺H₂.

Cas du composé soufré 11:

Synthèse de la 2-(N,N-diméthylthiocarbamoyloxyméthyl)pipérazine 31

La présence du soufre dans le composé 11 désactive le catalyseur. Afin de pallier cette difficulté, nous avons adopté la méthode de débenzylation de Reinecke (84).



L'action du chlorure de 2,2,2-trichloroéthoxycarbonyl substitue les benzyles et donne l'intermédiaire **30**. Ce dernier, traité par de la poudre de zinc dans l'acide acétique, conduit au composé débenzylé **31** sous forme de sel.

Le composé **30** montre en IR la disparition de la bande C=C aromatique à 1600 cm^{-1} au profit de la bande carbonyle à 1723 cm^{-1} . Dans le composé **31**, la bande large NH de la pipérazine apparaît à 3345 cm^{-1} . En RMN ^{13}C le C=S, et le C=O du composé **30** résonnent respectivement à 187,00 et 153,16 ppm.

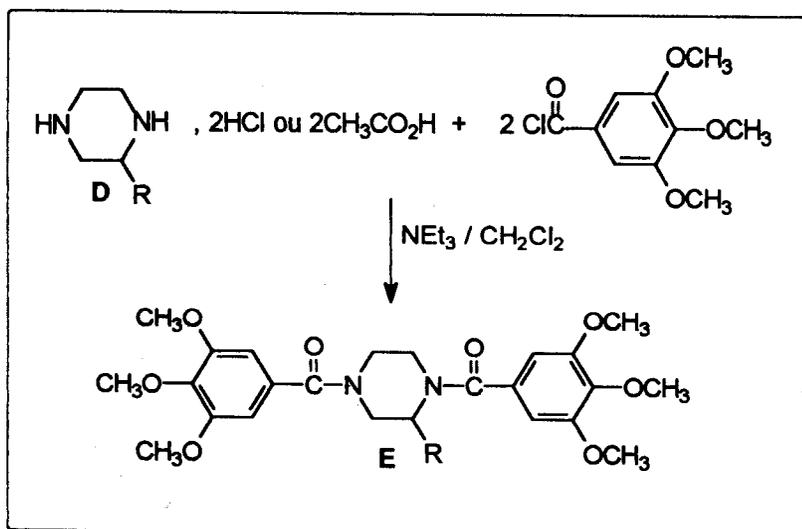
6. Amidification

Synthèse des 1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazines substituées en position 2 (composé)E

Ces composés sont obtenus par action du chlorure de 3,4,5-triméthoxybenzoyle sur les sels des pipérazines substituées en position 2 **D**, un excès de triéthylamine permettant de libérer *in situ* les fonctions amine secondaire de leur sel et de neutraliser l'acide chlorhydrique dégagé.

Les produits finaux sont purifiés sur colonne de gel de silice, et/ou par recristallisation. Une difficulté rencontrée lors de la purification réside dans l'élimination difficile du chlorure d'acide excédentaire qui ne s'hydrolyse que très lentement en acide. Ce problème est aisément réglé par l'addition de quelques

millilitres d'éthanol avant traitement et extraction. L'ester qui en résulte est beaucoup plus facile à éliminer.



D	R	E	D	R	E
<u>3</u>	C≡N	<u>33</u>	<u>25</u>	CH ₂ NHCONH-C ₆ H ₁₃	<u>39</u>
<u>19</u>	CO ₂ Et	<u>32</u>	<u>26</u>	CH ₂ NHCONEt ₂	<u>40</u>
<u>20</u>	CH ₂ OCONEt ₂	<u>34</u>	<u>27</u>	CH ₂ NHCONPr ₂	<u>41</u>
<u>21</u>	CH ₂ OCON 	<u>35</u>	<u>28</u>	CH ₂ NHCOC(CH ₃) ₃	<u>42</u>
<u>22</u>	CH ₂ OCON 	<u>36</u>	<u>29</u>	CH ₂ NHCOOCH(CH ₃) ₂	<u>43</u>
<u>23</u>	CH ₂ OCONHBu	<u>37</u>	<u>31</u>	CH ₂ NHCSNMe ₂	<u>44</u>
<u>24</u>	CH ₂ NHCONH- 	<u>38</u>			

Les composés terminaux **E** sont caractérisés en IR par la présence des bandes carbonyle, amide, carbamate, urée, ester, qui sont présentées dans le **tableau 3**.

Tableau 3

N°	R	C=O ₁ ^a cm ⁻¹	C=O ₂ ^b cm ⁻¹	N°	R	C=O ₁ ^a cm ⁻¹	C=O ₂ ^b cm ⁻¹
<u>32</u>	CO ₂ Et	1635	1735	<u>39</u>	CH ₂ NHCONH-C ₆ H ₁₃	1621	1631
<u>33</u>	C≡N	1660	*	<u>40</u>	CH ₂ NHCONEt ₂	1619	1634
<u>34</u>	CH ₂ OCONEt ₂	1630	1700	<u>41</u>	CH ₂ NHCONPr ₂	1617	1636
<u>35</u>	CH ₂ OCON 	1631	1694	<u>42</u>	CH ₂ NHCOC(CH ₃) ₃	1618	1690
<u>36</u>	CH ₂ OCON 	1622	1694	<u>43</u>	CH ₂ NHCOOCH(CH ₃) ₂	1622	1717
<u>37</u>	CH ₂ OCONHBu	1620	1717	<u>44</u>	CH ₂ NHCSNMe ₂	1623	/
<u>38</u>	CH ₂ NHCONH 	1624	1651				

* C=O₁: carbonyle de l'amide en positions 1, 4 de la pipérazine. ^b C=O₂: (carbonyle de l'amide, ester, carbamate ou de l'urée du substituant R en position 2 de la pipérazine). * CN (nitrile) à 2224 cm⁻¹.

En RMN ¹H, les protons OCH₃ apparaissent sous forme de 1, 2, ou 3 pics très intenses, ceux de la pipérazine sous forme de massifs. Les déplacements chimiques sont repris dans le tableau 4 suivant:

Tableau 4

N°	δ (H aroma, ortho) ppm; multi; 4H	δ (OCH ₃) ppm; multi; 18H	δ H de la pipérazine; multi; 7H
<u>32</u>	6,59; s	3,81 et 3,79; 2s	(5,40-4,30) et (3,10-2,60); 2m
<u>33</u>	6,57; s	3,81 et 3,79; 2s	5,41; 4,47-4,03 et 3,45-2,28; 3m
<u>34</u>	6,57; s	3,80 et 3,79 2s	(5,10-3,90) et (3,30-2,50); 2m
<u>35</u>	6,60; s	3,80; sl	(5,30-4,00) et (3,60-2,70); 2m
<u>36</u>	6,57; s	3,81; sl	(5,30-4,00) et (3,60-2,30); 2m
<u>37</u>	6,58 et 6,57; 2s	3,80 et 3,79 2s	(4,60-3,90) et (3,60-2,60); 2m
<u>38</u>	6,58 et 6,56; 2s	3,80; 3,79; 3,75 et 3,54; 4s	(5,50-4,90) et (3,20-2,60); 2m
<u>39</u>	6,61 et 6,59; 2s	3,81; 3,79 et 3,78; 3s	(5,10-3,90) et (3,70-2,60); 2m
<u>40</u>	6,61; s	3,82 et 3,79; 2s	(4,14) et (3,60-2,60); 2m
<u>41</u>	6,60 et 6,58; 2s	3,82 et 3,79; 2s	(4,50-3,95) et (3,60-3,30); 2m
<u>42</u>	6,60 et 6,59; 2s	3,80; 3,79; 2s	(5,10-4,00) et (3,70-2,80); 2m
<u>43</u>	6,60 et 6,58; 2s	3,81; 3,79 et 3,70; 3s	(4,60-3,90) et (3,70-2,70); 2m
<u>44</u>	6,58 et 6,59; 2s	3,82; 3,80 et 3,79; 3s	(5,40-3,90); (3,70-3,35) et (3,20-2,30); 3m

Ce tableau montre de plus que le substituant R en position 2 de la pipérazine n'a aucune influence sur le déplacement chimique des protons aromatique et des méthoxyles.

En RMN ^{13}C , ce sont les carbones des carbonyles qui sont les plus déblindés et leurs déplacements chimiques sont indiqués dans le **tableau 5**.

Tableau 5

N°	R	C=O ₁ ^a ppm	C=O ₂ ^b ppm	N°	R	C=O ₁ ^a ppm	C=O ₂ ^b ppm
<u>32</u>	CO ₂ Et	171,13; 170,54	169,08	<u>39</u>	CH ₂ NHCONH-C ₆ H ₁₃	171,43; 170,84	158,43
<u>33</u>	C≡N	171,16; 170,32	*	<u>40</u>	CH ₂ NHCONEt ₂	171,43; 170,95	157,04
<u>34</u>	CH ₂ OCONEt ₂	170,80; 170,64	155,08	<u>41</u>	CH ₂ NHCONPr ₂	171,43; 170,95	157,43
<u>36</u>	CH ₂ OCON 	170,76	153,26	<u>42</u>	CH ₂ NHCOC(CH ₃) ₃	171,10; 170,77	178,81
<u>37</u>	CH ₂ OCONHBu	170,83	155,65	<u>43</u>	CH ₂ NHCOOCH(CH ₃) ₂	170,97; 170,67	156,22
<u>38</u>	CH ₂ NHCONH- 	171,24; 170,79	156,84	<u>44</u>	CH ₂ NHCSNMe ₂	170,65	*

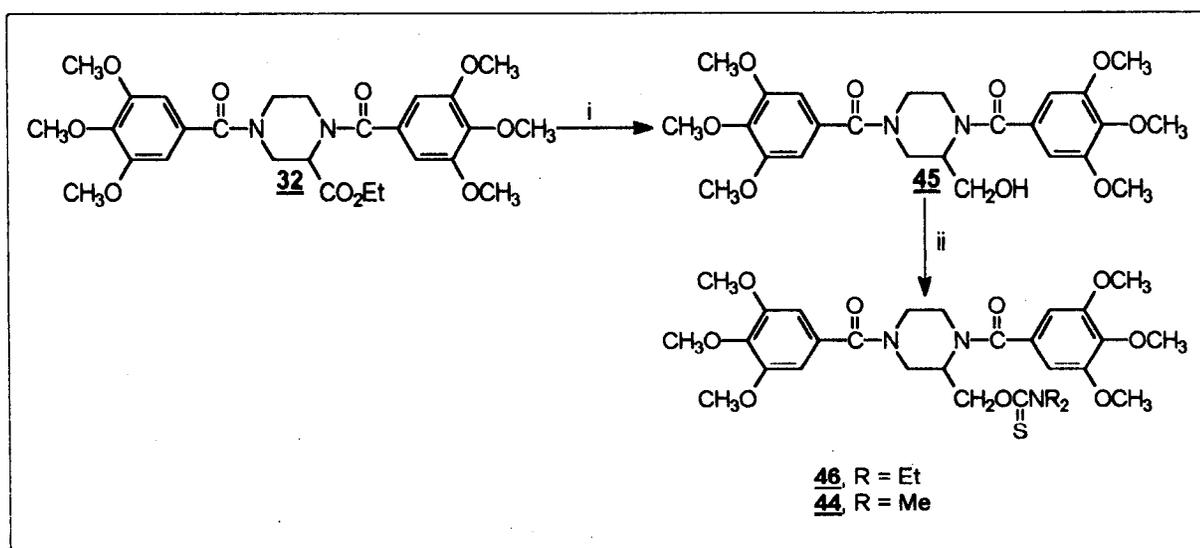
^a C=O₁: carbonyle de l'amide en positions 1, 4 de la pipérazine. ^b C=O₂: carbonyle de l'amide, ester, carbamate ou de l'urée du substituant R en position 2 de la pipérazine. * le carbone du nitrile (CN) apparaît à 116,90 ppm et celui du thiocarbamate (C=S) à 186,88 ppm.

Il est à noter que le substituant R, en position 2, a pour effet de dissocier les carbonyles des amides en position 1 et 4 sous forme de deux pics très proches.

7. Introduction tardive de la fonction thiocarbamate. Préparation des 2-(N,N-diméthylthiocarbamoyloxyméthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine 44 et 2-(N,N-diéthylthiocarbamoyloxyméthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine 46

L'introduction de la fonction thiocarbamate (R = CH₂OCSNR₂) a pu être réalisée aussi selon le schéma réactionnel ci-dessous. La réduction de l'ester 32 par NaBH₄, réducteur doux, donne l'alcool correspondant la 2-(hydroxyméthyl)-1,4-di-

(3,4,5-triméthoxybenzoyl) pipérazine **45**. Transformé par NaH en alcoolate, il réagit avec du chlorure de di(méthyl ou éthyl)thiocarbamoyle pour conduire respectivement aux composés **44** et **46**.



i) $\text{NaBH}_4 / \text{MeOH}$. ii) 1. NaH / DMF , 2. $\text{ClCSNR}_2 / \text{DMF}$.

L'alcool **45** est caractérisé en IR par la bande O-H à 3370 cm^{-1} .

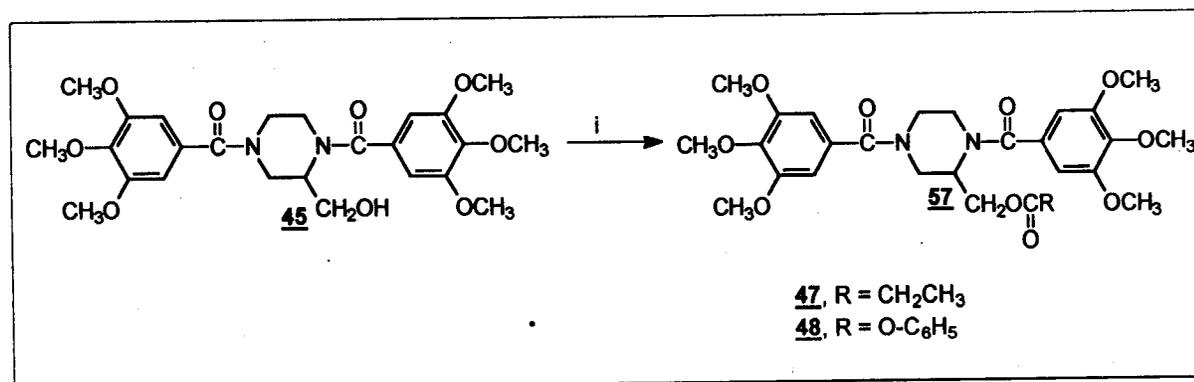
En RMN^1H , le proton de l'alcool **45**, échangeable avec D_2O , apparaît dans la région de 3,90 ppm.

En RMN^{13}C , le carbone de la fonction thiocarbamate est visible à 186,30 et 186,88 ppm dans les composés **46** et **44** respectivement. Celui du CH_2OH de l'alcool **45** est plus blindé (59,16 ppm) que celui du $\text{CH}_2\text{OC}=\text{S}$ des composés **46** et **44** (66,53 et 66,38 ppm).

8. Fonctions ester et carbonate

Synthèse des 2-(propanoyloxyméthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl) pipérazine **47** et 2-(phénoxy-carbonyloxyméthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl) pipérazine **48**

Ces composés ont été obtenus par action du chlorure de propionyle et du chloroformiate de phényle sur l'alcool **35**.



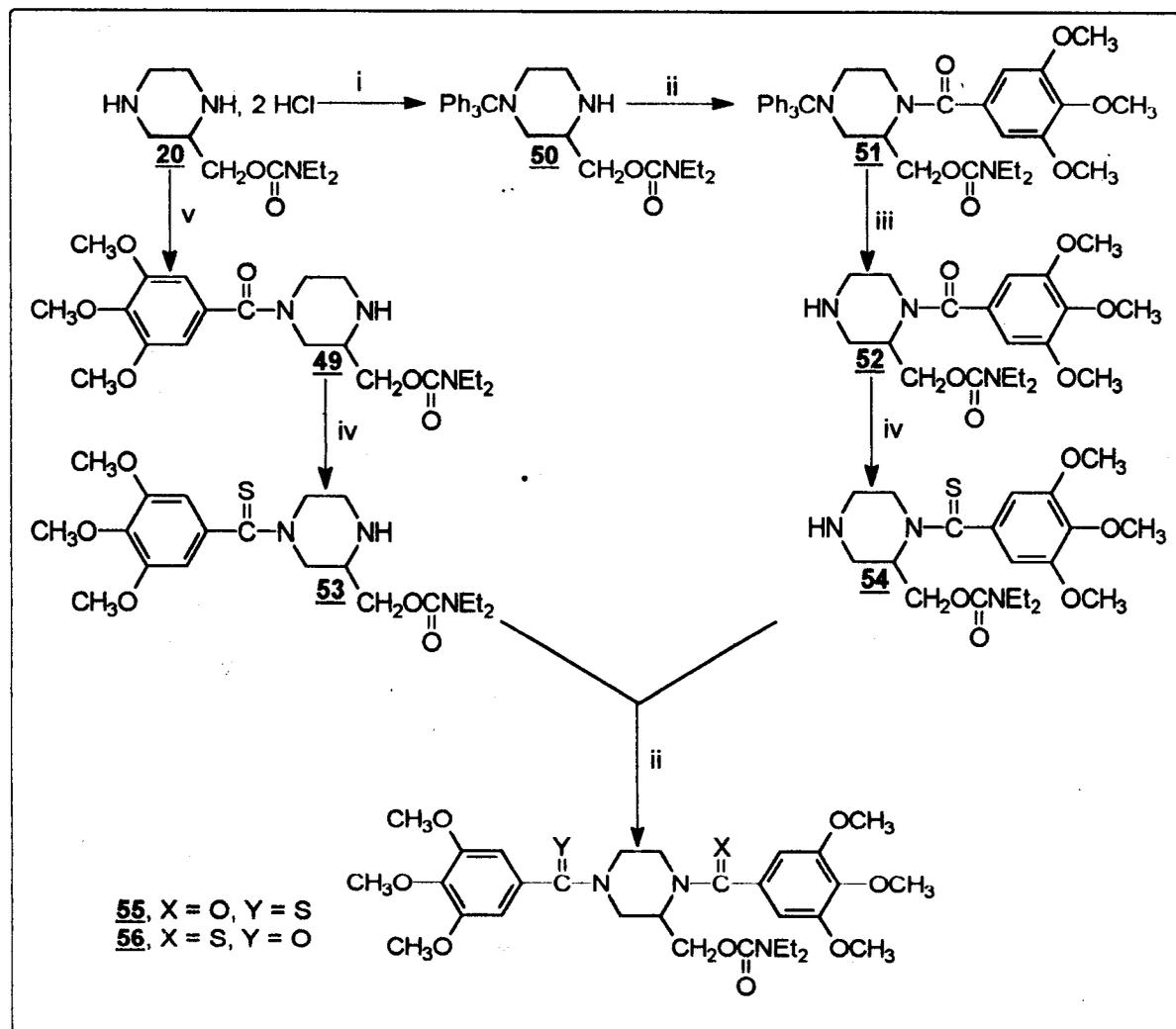
i) Cl COR / NEt₃ ou pyridine / CH₂Cl₂.

Comme nous l'avons déjà constaté auparavant, le substituant R en position 2 de la pipérazine influe peu sur les déplacements chimiques des protons de la pipérazine et des substituants en positions 1 et 4. Nous avons retrouvé pour ces signaux des valeurs proches dans les composés 47 et 48. Pour caractériser les substituants en position 2 de la pipérazine, on observe en IR, la bande carbonyle de l'ester 47 à 1746 cm⁻¹ et celle du carbonate 48 à 1768 cm⁻¹. En RMN ¹H, les protons du CH₂O de l'ester 47 sont plus déblindés que dans le carbonate 48, avec des δ de 4,26 et 4,07 ppm respectivement. Les protons du méthylène (CH₂CO) de 47 résonent à 2,16 ppm, ceux de CH₃ à 1 ppm et les protons aromatiques de 48 à 7,14 ppm.

B/ Modifications en position 1 et/ou 4

Introduction de la fonction thiocarbamide

Dans un premier temps, l'objectif est d'obtenir des pipérazines substituées soit en position 1 soit en 4. L'azote 4 est plus réactif que l'azote 1, principalement à cause de la gêne stérique induite par le substituant en position 2. Pour substituer l'azote en 1, la stratégie adoptée est décrite dans le schéma II.

Schéma II: Synthèse des composés soufrés **55** et **56**

i) $\text{Ph}_3\text{CCl} / \text{NEt}_3 / \text{CH}_2\text{Cl}_2$. ii) $3,4,5\text{-(CH}_3\text{O)}_3\text{C}_6\text{H}_2\text{COCl} / \text{NEt}_3 / \text{CH}_2\text{Cl}_2$. iii) HCl / MeOH . iv) réactif de Lawesson / THF . v) $3,4,5\text{-(CH}_3\text{O)}_3\text{C}_6\text{H}_2\text{COCl} / \text{NEt}_3 / \text{CH}_2\text{Cl}_2$ ($-5^\circ, 0^\circ\text{C}$).

1. Amidification sélective de la pipérazine substituée en position 2

Synthèse des 3-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1-(3,4,5-triméthoxybenzoyl) pipérazine **49** et 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1-(3,4,5-triméthoxybenzoyl) pipérazine **52**

L'amidification directe en position 4 du cycle pipérazinique (composé **49**) est réalisée grâce à l'addition lente d'un seul équivalent de chlorure de 3,4,5-triméthoxybenzoyle à la diamine **20**, à basse température.

Pour obtenir l'analogue en position 1 (composé **52**), nous nous sommes inspirés du procédé d'Applegate et coll. (85,86) en trois étapes. La première consiste à protéger

l'azote en position 4 du cycle pipérazinique, par le groupe trityle encombrant, introduit par action du chlorotriphénylméthane (composé **50**). La deuxième étape est l'amidification qui conduit au composé **51**. L'amine en position 4 est enfin «déprotégée» par traitement de ce dernier avec l'acide chlorhydrique en milieu alcoolique.

En IR, les composés **49** et **52** sont caractérisés par la présence des bandes C=O du carbamate à 1695 et 1693 cm^{-1} et de l'amide à 1625 et à 1632 cm^{-1} respectivement. Les bandes de l'amine apparaissent à 3260 cm^{-1} pour le composé **49** et 3330 cm^{-1} pour le composé **52**. En RMN¹H, les protons du CH₂O de **52** sont plus déblindés que leurs homologues dans **49**, et résonent respectivement à 4,29 et 3,83 ppm sous forme de massifs. Le proton NH est visible à 1,82 ppm dans **49** et à 1,37 ppm dans **52**.

2. Transformation de l'amide en thiocarbamide

Elle est réalisée par action du réactif de Lawesson (87,88). Et permet l'obtention du thiocarbamide **53** et de son analogue **54**.

3. Substitution du deuxième azote

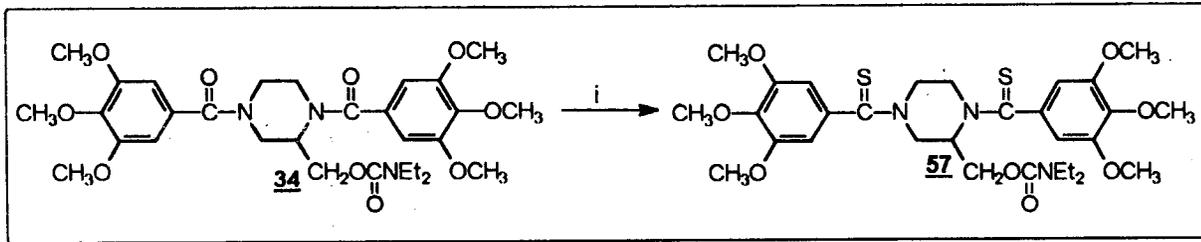
Synthèse des 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1-(3,4,5-triméthoxythio benzoyl)-4-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine **55 et 2-(N,N-diéthylcarbamoyl oxyméthyl)-1-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)-4-(3,4,5-triméthoxythiobenzoyl) pipérazine **56****

L'amidification du deuxième azote des thiocarbamides **53** et **54** par le chlorure de 3,4,5-triméthoxybenzoyle conduit aux produits terminaux **55** et **56**.

4. Cas du dithiocarbamide

Synthèse de la 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1,4-(3,4,5-triméthoxythio benzoyl)pipérazine **57**

Ce composé est obtenu en utilisant deux équivalents de réactif de Lawesson sur l'analogue diamide **34**.



i) réactif de Lawesson / THF à 0°C.

Les caractéristiques IR, RMN¹H et RMN¹³C des composés sulfurés 55, 56 et 57, sont données dans les tableaux 6 (IR), 7 (RMN¹H) et 8 (RMN¹³C).

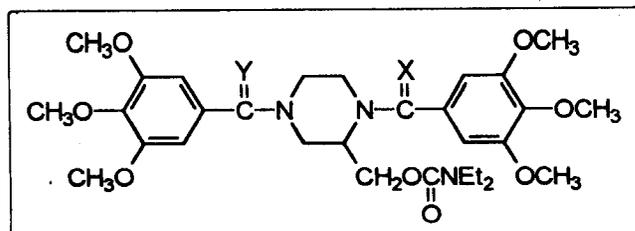


Tableau 6

N°	X	Y	C=O ₁ ^a cm ⁻¹	C=O ₂ ^b cm ⁻¹
<u>55</u>	S	O	1699	1642
<u>56</u>	O	S	1691	1631
<u>57</u>	S	S	1701	-

^a C=O₁ de la fonction carbamate.

^b C=O₂ de la fonction amide.

L'influence du soufre sur les déplacement chimiques des hydrogènes aromatiques a été observée par comparaison avec la diamide 34.

Tableau 7

N°	δ (H arom, Ortho) ppm; multi; 4H	δ (OCH ₃) ppm; multi; 18H	δ H de la pipérazine; multi; 7H
<u>55</u>	6,58; s, (COAr) et 6,28, sl, (CSAr)	3,78 et 3,77; 2s	(5,10-4,00) et (3,70-2,60); 2m
<u>56</u>	6,58; s, (COAr) et 6,45; sl (CSAr)	3,77; sl	(5,30-4,50) et (3,70-2,60); 2m
<u>57</u>	6,49; sl, (CSAr)	3,80; sl	(5,80-3,90) et (3,60-2,10); 2m
<u>34</u>	6,57; s, (COAr)	3,80 et 3,79 ; 2s	(5,10-3,90) et (3,30-2,50); 2m

On observe que les protons aromatiques en ortho de l'amide sont déblindés par rapport à ceux en ortho de la thiocarbamide.

Tableau 8

N°	C=S ppm	C=O ₁ ^a ppm	C=O ₂ ^b ppm
<u>55</u>	202,53	155,04	170,66
<u>56</u>	202,23	155,00	170,54
<u>57</u>	202,94 ; 202,64	154,93	-

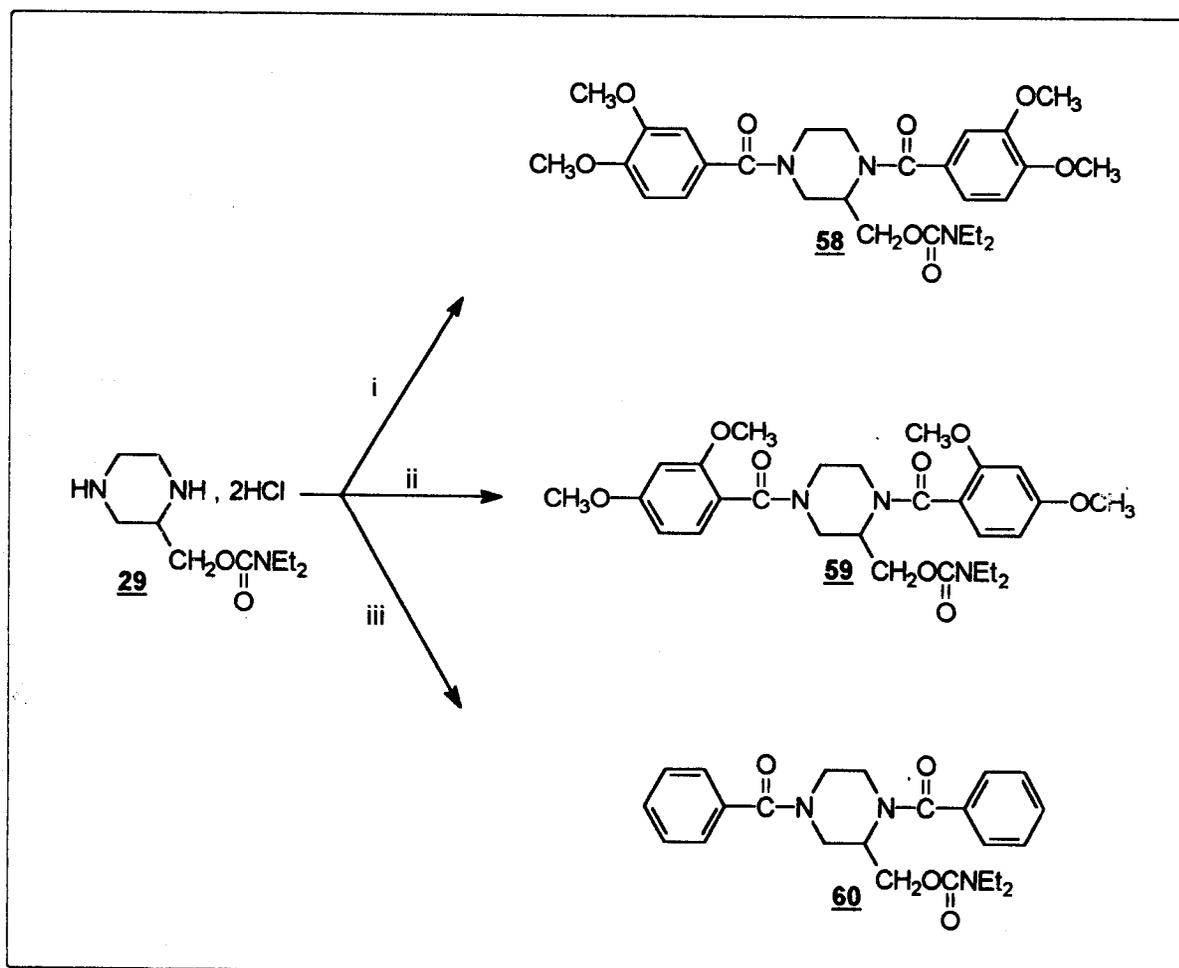
^a C=O₁ de la fonction carbamate.

^b C=O₂ de la fonction amide.

C/ Présence et position des méthoxyles

Synthèse des 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1,4-di-(3,4-diméthoxybenzoyl) pipérazine **58**, 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1,4-di-(2,4-diméthoxybenzoyl) pipérazine **59** et 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1,4-dibenzoylpipérazine **60**

Ces composés sont obtenus par acylation de la diamine **20** par le chlorure de (3,4 ou 2,4)-diméthoxybenzoyle et le chlorure de benzoyle respectivement selon le schéma III.

Schéma III: Synthèse des composés **58**, **59** et **60**

i) 3,4-(CH_3O) $_2\text{C}_6\text{H}_3\text{COCl}$ / NEt_3 / CH_2Cl_2 . ii) 2,4-(CH_3O) $_2\text{C}_6\text{H}_3\text{COCl}$ / NEt_3 / CH_2Cl_2 . iii) $\text{C}_6\text{H}_5\text{COCl}$ / NEt_3 / CH_2Cl_2 .

En ce qui concerne leur caractérisation, les différences par rapport au composé **34** sont les suivantes:

1. Douze protons des méthoxyles résonant à 3,84 et 3,75 ppm sous forme de singulet large pour **58** et **59**.
2. Les hydrogènes aromatiques apparaissent à 6,95 ppm (H_2 arom), 6,92 ppm (H_5 arom, doublet, $J = 8\text{Hz}$), 6,79 ppm (H_6 arom, doublet, $J = 8\text{Hz}$) dans le composé **58** et dans le **59** on les observe à 7,12 ppm (H_3 arom, massif) et 6,44 ppm (H_5 et H_6 arom, massif).
3. Dans le composé **60**, les protons aromatiques sont plus déblindés et résonent à 7,34 ppm.

Les modes opératoires sont décrits en détail dans la partie suivante ainsi que toutes les caractéristiques physico-chimiques.

II-PARTIE EXPERIMENTALE

Techniques expérimentales

La chromatographie analytique sur couche mince (CCM) est réalisée sur des feuilles plastiques recouvertes d'une couche de gel de silice 60F254 d'une épaisseur de 0,25 mm, prêtes à l'emploi, fournies par Merck.

Les chromatographies préparatives sur colonne utilisent le gel de silice de granulométrie 0,063-0,200 mm, fourni par Merck.

Les points de fusion (Pf) ont été mesurés à l'aide d'un appareil à point de fusion digital (ELECTROTHERMAL).

Les spectres d'absorption dans l'infrarouge (IR) ont été enregistrés sur un appareil GENESIS SERIES FTIR (ATI-MATTSON, 4000-600 cm^{-1}).

Les spectres de résonance magnétique nucléaire RMN du proton et du carbone 13 ont été enregistrés sur appareil BRÜCKER AC, à 200 MHz avec des échantillons en solution dans le chloroforme (CDCl_3), l'eau (D_2O), ou le diméthyle sulfoxyde (DMSO-d_6) deutérés. Les données spectrales en RMN¹H sont présentées dans l'ordre: déplacement chimique, nombre de protons, multiplicité, constante(s) de couplage en Hertz et attribution. Les déplacements chimiques sont données en ppm, l'hexaméthylsiloxane (HMDS) étant pris comme référence. La multiplicité des signaux est indiquée par les abréviations suivantes: s, singulet; sl, singulet large; d, doublet; t, triplet; q, quadruplet; m, multiplet ou massif.

Les microanalyses ont été effectuées par le Service Régional de microanalyse de l'Université Paris VI.

Modes opératoires

1. Préparation de la 1,4-dibenzyl-2-éthoxycarbonylpipérazine **1**

Dans un erlen rodé de 1 litre équipé d'un réfrigérant surmonté d'une ampoule à addition, et placé dans un bain d'huile thermostaté, sont introduits 54 g (149,8 mmoles) de diacétate de 1,4-dibenzyléthylènediamine et 100 ml de triéthylamine dans 375 ml de benzène. On chauffe à 40°C sous agitation jusqu'à dissolution, puis une solution de 42,9 ml (295,1 mmoles) de 2,3-dibromopropionate d'éthyle dans 150 ml de benzène est additionnée goutte à goutte. Le mélange est chauffé à reflux pendant 3 h, sous agitation. Après refroidissement et filtration du solide, le benzène et la triéthylamine en excès sont évaporés. Le résidu est repris dans le chloroforme, lavé à l'eau, séché, puis évaporé. Le produit est dissous dans 100 ml d'éthanol et on fait barboter un courant de HCl gazeux jusqu'à saturation de la solution. L'addition d'éther fait précipiter solide qui est récupéré par filtration. On obtient ainsi 40 g de chlorhydrate de la 1,4-dibenzyl-2-éthoxycarbonylpipérazine **1** sous forme de cristaux blancs. Rdt = 61%; Pf = 179,1°C.

20 g de ce chlorhydrate sont neutralisés par une solution saturée de bicarbonate de sodium. La solution aqueuse est extraite 3 fois avec 50 ml d'éther diéthylique. La phase organique est lavée à l'eau distillée, puis séchée sur MgSO₄. Après filtration et évaporation de l'éther, on obtient 15,32 g de 1,4-dibenzyl-2-éthoxycarbonylpipérazine **1** sous forme d'une huile visqueuse. Rdt = 93%; Rf = 0,2 (éther de pétrole / éther, 80 : 20, v / v).

IR ν_{\max} (film) : 3027 (C-H arom), 2808 (C-H), 1736 (C=O), 1602 (C=C arom) cm⁻¹.

RMN¹H (CDCl₃) δ ppm: 7,18 (10H, m, H arom), 4,08 (2H, q, $J=7$ Hz, OCH₂), 3,51 (1H, d, $J=13,3$ Hz, CH-Ph), 3,48 (1H, d, $J=13,3$ Hz, CH-Ph), 3,47 (1H, d, $J=13,2$ Hz, Ph-CH), 3,31 (1H, d, $J=13,2$ Hz, Ph-CH), 3,23 (1H, dd, $J=3$ et 6 Hz, H-C₂ de la pipérazine), 2,97-3,02 (1H, m, 1H de la pipérazine), 2,67 (1H, dd, $J=11$ et 6 Hz, H-C₃ de la pipérazine), 2,51 (1H, dd, $J=11$ et 3 Hz, H-C₃ de la pipérazine), 2,26-2,43 (3H, m, 3H de la pipérazine), 1,12 (3H, t, $J=7$ Hz, CH₃).

RMN¹³C (CDCl₃) δ ppm: 171,89 (C=O), 138,04 ; 137,83 ; 128,88 ; 128,70 ; 128,01 ; 126,86 (C arom), 62,55 (CH de la pipérazine), 62,42 ; 60,11, 59,41 ; 55,32 ; 52,93 ; 48,39 (OCH₂, CH₂ benzyle, CH₂ de la pipérazine), 14,10 (CH₃).

2. Préparation de la 1,4-dibenzyl-2-cyanopipérazine 2

Le composé 2 est préparé de la même manière que le composé 1 mais à partir de 32 g (150,3 mmoles) de 2,3-dibromopropionitrile. Le chlorhydrate de 2 est obtenu sous forme de cristaux blancs 47,7 g; Rdt = 87%; Pf = 287°C. La neutralisation de 20 g de ce chlorhydrate conduit à 14 g de 2 sous forme d'une huile visqueuse qui cristallise dans l'hexane. Rdt = 88%; Pf = 61,7°C; Rf = 0,58 (CH₂Cl₂ / MeOH, 80 : 20, v / v).

IR ν max (KBr): 3028 (C-H arom), 2819 (C-H), 2225 (CN), 1602 (C=C arom), cm⁻¹.

RMN¹H (CDCl₃) δ ppm: 7,34-7,14 (10H, m, H arom), 3,67 (1H, d, J=13 Hz, CH-Ph), 3,41 (1H, d, J=13 Hz, CH-Ph), 3,55 (1H, d, J=10 Hz, CHPh), 3,52 (1H, m, HC-CN), 3,49 (1H, d, J=10 Hz, CH-Ph), 2,87-2,13 (6H, 2m, H de la pipérazine).

RMN¹³C (CDCl₃) δ ppm: 137,44 ; 136,43 ; 129,08 ; 128,69 ; 128,51 ; 128,32 ; 127,65 ; 127,19 (C arom), 116,20 (C=N), 61,91 ; 59,90 (CH₂ benzyle), 51,89 (CH de la pipérazine), 54,02 ; 52,23 ; 49,23 (CH₂ de la pipérazine).

3. Préparation de la 2-cyanopipérazine 3

Dans un erlen rodé de 250 ml équipé d'un réfrigérant, sont introduits 2,2 ml (33 mmoles) d'éthylènediamine, 3,3 ml (33,17 mmoles) de 2,3-dibromopropionitrile, 90 ml d'acétonitrile et 18,4g de K₂CO₃. Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant une nuit, puis chauffé à reflux pendant 2 h. Après refroidissement, filtration du solide et évaporation du solvant, le résidu est purifié sur colonne de gel de silice, avec un mélange CH₂Cl₂ / MeOH, 90 : 10, v / v. On obtient 0,65 g de produit 3. Rdt = 17%; Rf = 0,12 (CH₂Cl₂ / MeOH, 90 : 10, v / v).

IR ν max (film): 3330 ; 3201 (2NH), 2836 (C-H), 2224 (CN) cm^{-1} .

RMN¹H 60 MHz (CDCl_3) δ ppm: 3,90 (1H, m, 1H de la pipérazine), 3,03 (3H, m, 3H de la pipérazine), 2,87 (3H, m, 3H de la pipérazine), 2,47 (2H, sl, 2NH).

Réduction

4. Préparation de la 1,4-dibenzyl-2-(hydroxyméthyl)pipérazine **4**

Dans un erlen rodé de 500 ml surmonté d'une ampoule à addition, 1,25 g (33 mmoles) de LiAlH_4 sont agités dans 50 ml d'éther diéthylique, et la suspension est maintenue à 0°C dans un bain de glace. Une solution de 15 g (44,38 mmoles) de 1,4-dibenzyl-2-éthoxycarbonylpipérazine **1**, dans 50 ml d'éther est ajoutée goutte à goutte. Le mélange est maintenu sous agitation à 0°C pendant une heure, puis à température ambiante pendant une nuit. Il est ensuite dilué avec 100 ml d'éther et l'excès de LiAlH_4 est détruit par addition d'eau distillée goutte à goutte. Après filtration de l'hydroxyde d'aluminium formé, la phase organique est lavée, séchée MgSO_4 , puis évaporée. Le résidu cristallisé dans l'hexane. On obtient ainsi 7,82 g de cristaux blancs de 1,4-dibenzyl-2-(hydroxyméthyl)pipérazine **4**. Rdt = 60%; Pf = 74,8°C; Rf = 0,16 (CHCl_3 / MeOH, 98 : 2, v / v).

IR ν max (KBr): 3371 (O-H), 3050 (C-H arom), 2800(C-H), 1602 (C=C arom) cm^{-1} .

RMN¹H (CDCl_3) ppm: 7,20 (10H, m, H arom), 3,99-3,87 (2H, m, CH_2O), 3,74 (sl, OH échangeable), 3,53-3,35 (4H, m, $2\text{CH}_2\text{Ph}$), 2,93-2,79 (1H, m, 1H de la pipérazine), 2,63-2,22 (6H, 2m, 6H de la pipérazine).

RMN¹³C (CDCl_3) δ ppm: 138,42 ; 137,56 ; 129,09 ; 128,81 ; 128,29 ; 127,17 ; 127,03 (C arom), 63,13 ; 62,08 ; 57,96 ; 55,97 ; 52,42 ; 49,77 (CH_2OH , CH_2 benzyle, CH_2 de la pipérazine), 58,49 (CH de la pipérazine).

5. Préparation de la 1,4-dibenzyl-2-(aminométhyl)pipérazine 5

Ce composé a été préparé selon deux méthodes de synthèse.

1^{ère} méthode:

Dans un erlen rodé de 500 ml surmonté d'une ampoule à addition, 6 g de LiAlH_4 sont agités dans 150 ml d'éther diéthylique et le mélange est maintenu à 0°C dans un bain de glace. Une solution de 15,5 g (53,26 mmoles) de 1,4-dibenzyl-2-cyanopipérazine 2, dans 50 ml d'éther est ajoutée goutte à goutte. Le mélange est maintenu sous agitation pendant 5 h à température ambiante. L'excès de LiAlH_4 est alors détruit par addition d'eau distillée goutte à goutte. Après filtration de l'hydroxyde d'aluminium formé, la phase organique est lavée avec une solution de NaOH 20%, séchée sur MgSO_4 , puis évaporée. Le résidu est purifié sur colonne de gel de silice avec un mélange de CH_2Cl_2 / MeOH , 70 : 30, v / v. On obtient 11,77 g de produit 5. Rdt = 75%; Rf = 0,48 (CHCl_3 / MeOH / NH_4OH , 80 : 20 : 0,50, v / v / v).

2^{ème} méthode:

Dans un erlenmeyer de 500 ml muni d'un réfrigérant plongé dans un bain d'huile thermostaté, on introduit 24,7 g (85 mmoles) de 1,4-dibenzyl-2-cyanopipérazine 2 dans 200 ml d'éthanol absolu. On chauffe à 40°C , puis on ajoute progressivement 7,85 g (341,4 mmoles) de sodium et le mélange est chauffé à reflux pendant 3 h. Après refroidissement, on additionne 19,5 ml d'acide acétique glacial et 60 ml d'éther. Le solide est filtré, le filtrat évaporé et le résidu obtenu, repris à l'éther est lavé à l'eau. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , puis concentrée sous vide. Après purification sur colonne de gel de silice avec un mélange de CH_2Cl_2 / MeOH , 70 : 30, v / v. La masse de 5 obtenue est de 16,1 g. Rdt= 64 %; Rf = 0,35 (CHCl_3 / MeOH , 80 : 20, v / v).

IR v max (film): 3378 ; 3289 (NH_2), 3026 (C-H arom), 2804 (C-H), 1602 (C=C arom) cm^{-1} .

RMN¹H (CDCl_3) δ ppm: 7,26 (10H, m, H arom), 3,92 (1H, d, $J=13,4$ Hz, Ph-CH), 3,40 (1H, d, $J=13,1$ Hz, Ph-CH), 3,33 (1H, d, $J=13,1$ Hz, Ph-CH), 3.14 (1H, d, $J=13,4$

Hz, Ph-CH), 2,92 (1H, dd, $J=6$ et 13,3 Hz, CH-NH_2), 2,68-2,06 (8H, m, CH-NH_2 , 7H de la pipérazine), 1,34 (2H, sl, NH_2).

RMN¹³C (CDCl₃) δ ppm: 138,52 ; 137,81 ; 128,65 ; 128,39 ; 127,85 ; 127,82 ; 126,61 ; 126,49 (C arom), 62,77 ; 57,35 ; 55,21 ; 52,28 ; 50,31 ; 40,99 (CH_2 benzyle, CH_2 de la pipérazine, CH_2NH_2), 60,77 (CH de la pipérazine).

6. Préparation de la 1,4-dibenzyl-2-(phénoxy-carbonyloxyméthyl)pipérazine **6**

Dans un erlen rodé de 250 ml, surmonté d'une ampoule à addition et placé dans un bain de glace, on refroidit à 0°C une solution de 7,14 g (24,12 mmoles) de 1,4-dibenzyl-2-(hydroxyméthyl)pipérazine **4** dans 150 ml de CH_2Cl_2 et 7 ml de triéthylamine. Après addition, goutte à goutte, de 4,57 g (29,20 mmoles) de chloroformiate de phényle dans 25 ml de CH_2Cl_2 , le mélange est agité pendant 1 h à 0°C, puis 3 h à température ambiante. La phase organique est lavée une fois avec une solution saturée de NaHCO_3 , puis à l'eau jusqu'à neutralité et séchée sur MgSO_4 . Après filtration et évaporation du CH_2Cl_2 , le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice en utilisant un mélange d'éther de pétrole / éther, 80 : 20, v / v. La masse de **6** obtenue est de 5,7 g. Rdt = 57%; $R_f = 0,32$ (éther de pétrole / éther, 50 : 50, v / v).

IR ν max (film): 3062(C-H arom), 2954 (C-H), 1758 (C=O), 1599(C=C arom) cm^{-1} .

RMN¹H (CDCl₃) δ ppm: 7,27-7,00 (15H, m, H arom), 4,42-4,34 (2H, m, CH_2O), 3,85 (1H, d, $J=13$ Hz, HC-Ph), 3,44-3,29 (2H, m, Ph- CH_2), 3,32, (1H, d, $J=13$ Hz, HC-Ph), 2,81-2,79 (1H, m, $\text{CH-CH}_2\text{O}$), 2,66-2,50 (2H, m, 2H de la pipérazine), 2,37-2,22 (4H, m, 4H de la pipérazine).

RMN¹³C (CDCl₃) δ ppm: 153,55 (C=O), 151,04 ; 138,72 ; 138,04 ; 129,37 ; 128,91 ; 128,65 ; 128,18 ; 127,00 ; 126,91 ; 125,93 ; 120,96 (C arom), 67,34 ; 62,84 ; 58,55 ; 55,34 ; 52,61 ; 49,48 (CH_2 benzyle, CH_2 de la pipérazine, CH_2O), 58,08 (CH de la pipérazine).

Substitution du phénoxy par les amines**7. Mode opératoire général pour l'obtention des composés 7-10**

Dans un ballon surmonté d'un réfrigérant, et placé dans un bain d'huile, on dissout du 1,4-dibenzyl-2-(phénoxycarbonyloxyméthyl)pipérazine 5 dans l'amine correspondante. Le mélange est chauffé à reflux pendant 48 h. Après refroidissement et évaporation de l'amine en excès, le résidu est repris au CHCl_3 et lavé à l'eau jusqu'à pH neutre. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée. La purification est effectuée par chromatographie sur colonne de gel de silice.

8. Préparation de la 1,4-dibenzyl-2-(N,N-diéthylaminocarbamoyloxyméthyl) pipérazine 7

Le composé 7 est obtenu à partir de 7 g (16,83 mmoles) de 1,4-dibenzyl-2-(phénoxycarbonyloxyméthyl)pipérazine 6, et 20 ml de diéthylamine. Il est purifié sur colonne de gel de silice avec CH_2Cl_2 / MeOH, 97 : 3, v / v. La masse récupérée est de 4,9 g. Rdt = 74% ; Rf = 0,2 (CH_2Cl_2 / MeOH, 98 : 2, v / v).

IR ν max (film): 3084 (C-H arom), 2808 (C-H), 1702 (C=O), 1602 (C=C arom) cm^{-1} .

RMN¹H (CDCl_3) δ ppm: 7,27-7,09 (10H, m, H arom), 4,33 (1H, dd, $J=4$ et 12 Hz CHOC=O), 4,12 (1H, dd, $J=8$ et 12 Hz, CHOC=O), 3,96 (1H, d, $J=13$ Hz, HC-Ph), 3,41 (2H, m, Ph- CH_2), 3,31 (1H, d, $J=13$ Hz, HC-Ph), 3,12 (4H, m, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, 2,72-2,57 (3H, m, 3H de pipérazine), 2,48-2,41 (1H, m, 1H de la pipérazine), 2,28-2,16 (3H, m, 3H de la pipérazine), 1,09 (6H, m, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

RMN¹³C (CDCl_3) δ ppm: 155,64 (C=O), 139,03 ; 138,13 ; 128,97 ; 128,71 ; 128,10 ; 126,88 ; 126,76 (C arom), 64,16 ; 62,93 ; 58,47 ; 55,88 ; 53,01 ; 50,03 (CH_2 benzyle, CH_2 de la pipérazine, CH_2O), 59,09 (CH de la pipérazine), 41,72 ; 41,14 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 13,95 ; 13,48 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

9. Préparation de la 1,4-dibenzyl-(pipéridinocarbonyloxyméthyl)pipérazine 8

Le composé 8 est obtenu à partir de 1 g (2,4 mmoles) de 1,4-dibenzyl-2-(phénoxy-carbonyloxyméthyl)pipérazine 6, et 15 ml de pipéridine. Il est purifié sur colonne de gel de silice (CH_2Cl_2 / MeOH, 98 : 2, v / v). Sa masse est de 0,65 g. Rdt = 66%; Rf = 0,3 (CH_2Cl_2 / MeOH, 95 : 5, v / v).

IR v max (film): 3084 (C-H arom), 2937(C-H), 1695 (C=O), 1603 (C=C arom) cm^{-1} .

RMN¹H (CDCl_3) δ ppm: 7,22-7,05 (10H, m, H arom), 4,30 (1H, dd, $J=11,1$ et 4,4 Hz, HCOC=O), 4,10 (1H, dd, $J=11,1$ et 6 Hz, HCOC=O), 3,88 (1H, d, $J=13,5$ Hz, HC-Ph), 3,42-3,21 (7H, m, PhCH₂, CH-Ph, 2NCH₂ de la pipéridine), 2,67-2,15 (7H, 3m, 7H de la pipérazine), 1,36-1,16 (6H, m, 3CH₂ de la pipéridine).

RMN¹³C (CDCl_3) δ ppm: 154,83 (C=O), 153,76 ; 137,92 ; 128,64 ; 128,44 ; 127,95 ; 127,53 ; 126,59 ; 126,51 (C arom), 63,81 ; 62,62 ; 58,20 ; 55,43 ; 52,75 ; 49,55 (CH₂ de la pipérazine, CH₂O, CH₂ benzyle, CH₂ de la pipérazine), 58,52 (CH de la pipérazine), 44,41 (NCH₂ de la pipéridine), 25,30 (NCH₂CH₂ de la pipéridine), 24,03 (NCH₂CH₂CH₂ de la pipéridine).

10. Préparation de la 1,4-dibenzyl-2-(pyrrolidinocarbonyloxyméthyl)pipérazine 9

Le composé 9 est obtenu à partir de 3,12 g (7,5 mmoles) de 1,4-dibenzyl-2-(phénoxy-carbonyloxyméthyl)pipérazine 6, et 10 ml de pyrrolidine. Il est purifié sur colonne de gel de silice (CH_2Cl_2 / MeOH, 99 : 1, v / v). Sa masse est de 1,48 g. Rdt = 50%; Rf = 0,38 (CHCl_3 / MeOH, 95 : 5, v / v).

IR v max (film): 3030 (C-H arom), 1696 (C=O), 1593 (C=C arom) cm^{-1} .

RMN¹H (CDCl_3) δ ppm: 7,20 (10H, m, H arom), 4,25 (2H, m, CH₂OCO), 3,87 (1H, d, $J=13$ Hz, HC-Ph), 3,40-3,30 (3H, m, CH-Ph, CH₂Ph), 2,90-2,05 (11H, 2m, 2NCH₂ de la pyrrolidine, 7H de la pipérazine), 1,80 (4H, m, N(CH₂CH₂)₂ de la pyrrolidine).

11. Préparation de la 1,4-dibenzyl-2-(N-butylcarbamoxyloxyméthyl)pipérazine 10

Le composé 10 est obtenu à partir de 5 g (12 mmoles) de 1,4-dibenzyl-2-(phénoxy-carbonyloxyméthyl)pipérazine 6, et 15 ml de butylamine. Il est purifié sur colonne de gel de silice avec (CH₂Cl₂ / MeOH, 95 : 5, v / v). La masse obtenue est de 4 g. Rdt = 84%; Rf = 0,24 (CH₂Cl₂ / MeOH, 97 : 3, v / v).

IR ν max (film): 3339 (NH), 1712 (C=O), 1602 (C-C arom) cm⁻¹.

RMN¹H (CDCl₃) δ ppm: 7,17 (10H, m, H arom), 4,68 (1H, sl, NH), 4,25 (1H, dd, $J=11,3$ et $3,8$ Hz, HCOC=O), 4,20 (1H, dd, $J=11,3$ et $5,5$ Hz, HCOC=O), 3,92 (1H, d, $J=13,5$ Hz, HC-Ph), 3,43 (1H, d, $J=13,1$ Hz, HC-Ph), 3,35 (1H, d, $J=13,1$ Hz, HC-Ph), 3,30 (1H, d, $J=13,5$ Hz, HC-Ph), 3,06 (2H, m, NHCH₂), 2,80-1,90 (7H, 3m, 7H de la pipérazine), 1,29 (4H, m, NHCH₂(CH₂)₂CH₃), 0,84 (3H, t, $J=7$ Hz, CH₃).

RMN¹³C (CDCl₃) δ ppm: 156,31 (C=O), 138,62 ; 138,03 ; 128,88 ; 128,04 ; 126,76 (C arom), 63,63 ; 62,81 ; 58,34 ; 55,70 ; 52,66 ; 49,93 (CH₂ benzyle, CH₂ de la pipérazine, CH₂O), 58,69 (CH de la pipérazine), 40,60 (NHCH₂), 31,90 (NHCH₂CH₂CH₂), 19,74 (CH₂CH₃), 13,61 (CH₃).

12. Préparation de la 1,4-dibenzyl-2-(N,N-diméthylthiocarbamoxyloxyméthyl)pipérazine 11

Dans un erlenmeyer rodé de 250 ml, surmonté d'une ampoule à addition, 1,26 g de NaH (en dispersion dans l'huile minérale à 60%) est introduit dans 20 ml de DMF. Une solution de 10 g (33,78 mmoles) de 1,4-dibenzyl-2-(hydroxyméthyl)pipérazine 4, dans 20 ml de DMF est ajoutée goutte à goutte. Le mélange est chauffé à 80°C, jusqu'à la fin du dégagement d'hydrogène, puis on le laisse refroidir à température ambiante. Une solution de 5 g (40,45 mmoles) de chlorure de N,N-diméthylthiocarbamoyle dans 10 ml de DMF est alors additionnée goutte à goutte et on chauffe à 80°C à nouveau pendant 5 h. La solution est refroidie, puis extraite 3 fois avec 20 ml de dichlorométhane. La phase organique est lavée plusieurs fois à l'eau, séchée sur MgSO₄, et le solvant évaporé. Le résidu est purifié sur colonne de gel de silice avec un mélange de CH₂Cl₂ / MeOH, 92 : 8, v / v. On obtient ainsi 8 g de composé 11. Rdt = 62%; Rf = 0,24 (CH₂Cl₂ / MeOH, 95 : 5, v / v).

IR ν max (film): 3026 (C-H arom), 2810 (C-H), 1600 (C=C arom) cm^{-1} .

RMN¹H (CDCl₃) δ ppm: 7,21 (10H, m, H arom), 4,69 (1H, dd, J 4,2 et 11 Hz, CHOC=S), 4,52 (1H, dd, J =6,3 et 11 Hz, CHOC=S), 3,91 (1H, d, J =13,5 Hz, CH-Ph), 3,46 (1H, d, J =13 Hz, Ph-CH), 3,42-3,30 (2H, m, CH-Ph, Ph-CH), 3,24 (3H, s, CH₃), 2,85 (4H, m, CH₃, 1H de la pipérazine), 2,74-2,20 (6H, m, 6H de la pipérazine).

RMN¹³C (CDCl₃) δ ppm: 187,84 (C=S), 138,81 ; 138,09 ; 128,90 ; 128,60 ; 128,05 ; 126,81 ; 126,76 (C arom), 69,93 ; 62,72 ; 58,40 ; 55,31 ; 52,96 ; 49,59 (CH₂O, CH₂ benzyle, CH₂ de la pipérazine), 58,31 (CH de la pipérazine), 42,57 ; 37,52 (CH₃).

13. Préparation de la 1,4-dibenzyl-2-(N-2,6-diméthylphényluréidométhyl) pipérazine 12

Dans un erlenmeyer rodé de 250 ml, on introduit 4 g (13,56 mmoles) de 1,4-dibenzyl-2-(aminométhyl)pipérazine 5 dans 150 ml d'éther anhydre. On additionne goutte à goutte une solution de 2 g (13,59 mmoles) de 2,6-diméthylphénylisocyanate dans 50 ml d'éther anhydre. Le mélange est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 2 h. Le solide est filtré, lavé plusieurs fois à l'éther, puis séché et on obtient une masse de 4,25 g de 12. Rdt = 71%; Pf = 158,8°C; Rf = 0,65 (CHCl₃ / MeOH / NH₄OH, 80 : 20 : 0,5, v / v / v).

IR ν max (KBr): 3337 (NH, bande large), 3023 (C-H arom), 2804 (C-H), 1639 (C=O), 1563 (C=C arom) cm^{-1} .

RMN¹H (CDCl₃) δ ppm: 7,24-7,08 (10H, m, 2CH₂-Ph), 7,07-7,02 (1H, m, 1 H arom de NH-Ph), 7,03-6,63 (2H, m, 2 H arom de NH-Ph), 6,62 (1H, sl, NH), 5,03 (1H, sl, NH), 5,80 (1H, d, J =13 Hz, CH-Ph), 3,44-3,25 (4 H, m, CH₂-Ph, CH₂NHC=O), 2,96 (1H, d, J =13 Hz, CH-Ph), 2,90-2,30 (4H, m, 4H de la pipérazine), 2,20 (6H, s, 2CH₃), 2,08-1,90 (2H, m, 2H de la pipérazine), 1,90-1,70 (1H, m, 1H de la pipérazine).

RMN¹³C (CDCl₃) δ ppm: 157,89 (C=O), 138,18 ; 137,49 ; 137,18 ; 134,17 ; 128,53 ; 128,32 ; 128,08 ; 127,49 ; 126,93 ; 126,69 (C arom), 62,88 ; 57,32 ; 55,43 ; 52,08 ; 50,19 (CH₂ benzyle, CH₂ de la pipérazine), 58,34 (CH de la pipérazine), 39,49 (CH₂NH), 18,34 (CH₃).

14. Préparation de la 1,4-dibenzyl-2-(N-hexyluréidométhyl)pipérazine 13

Le composé 13 est obtenu selon le même mode opératoire que le composé 12 ci-dessus, à partir de 4 g (13,56 mmoles) d'amine 5, et 1,73 g (13,6 mmoles) d'hexylisocyanate, à reflux 6 h. Rdt= 66%; Rf = 0,56 (CHCl₃ / MeOH / NH₄OH, 80 : 20 : 0,5, v / v / v).

IR ν max (nujol): 3356 (NH large), 3061 (C-H arom), 2809 (C-H), 1629 (C=O), 1573 (C=C arom) cm⁻¹.

RMN¹H (CDCl₃) δ ppm: 7,19-7,06 (10H, m, H arom), 5,31 (1H, sl, NH), 4,99 (1H, t, $J=5,5$ Hz, NH), 3,92 (1H, d, $J=13$ Hz, CH-Ph), 3,50-2,81 (4H, m, CH₂NCONCH₂), 3,38 (1H, d, $J=13$ Hz, CH-Ph), 3,32 (1H, d, $J=13$ Hz, CH-Ph), 3,14 (1H, d, $J=13$ Hz, CH-Ph), 2,55 (4H, m, 4H de la pipérazine), 2,13 (3H, m, 3H de la pipérazine), 1,37 et 1,19 (8H, 2m, (CH₂)₄), 0,77 (3H, t, $J=6,4$ Hz, CH₃).

RMN¹³C (CDCl₃) δ ppm: 158,68 (C=O), 138,13 ; 137,59 ; 128,91 ; 128,83 ; 128,10 ; 126,95 ; 126,89 (C arom), 62,81 ; 57,54 ; 55,78 ; 52,12 ; 50,03 (CH₂ benzyle, CH₂ de la pipérazine), 58,42 (CH de la pipérazine), 40,45 ; 39,67 (CH₂NHCONHCH₂), 31,41 (NHCONHCH₂CH₂), 30,11 (NHCONHCH₂CH₂CH₂), 26,46 (CH₂CH₂CH₃), 22,43 (CH₂CH₂CH₃), 13,89 (CH₃).

15. Préparation de la 1,4-dibenzyl-2-(phénoxy-carbonylaminométhyl)pipérazine 14

Dans un ballon de 250 ml, surmonté d'une ampoule à addition et d'une garde à CaCl₂ et placé dans un bain de glace, on refroidit à 0°C une solution de 3 g (10,17 mmoles) de 1,4-dibenzyl-2-(aminométhyl)pipérazine 5 dans 30 ml de CH₂Cl₂ et 2 ml de pyridine. Après addition, goutte à goutte, de 1,9 ml (1,5 éq) de chloroformiate de phényle dans 20 ml de CH₂Cl₂, le mélange est agité pendant 1 h à 0°C, puis 5 h à température ambiante. La solution est lavée une fois avec une solution saturée de NaHCO₃, puis à l'eau et séchée sur MgSO₄. Après filtration et évaporation du solvant, le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂ / MeOH, 99 : 1, v / v). La masse de 14 obtenue est de 3,2 g. Rdt = 76%; Rf = 0,56 (CH₂Cl₂ / MeOH, 95 : 5, v / v).

IR ν max (film): 3338 (NH), 1730 (C=O), 1594 (C=C arom) cm^{-1} .

RMN¹H (60MHz) (CDCl_3) δ ppm: 7,20 (15H, sl, H arom), 5,83 (1H, sl, NH), 4,00-3,00 (6H, 3m, CH_2NH , $2\text{CH}_2\text{Ph}$), 2,83-2,18 (7H, 3m, 7H de la pipérazine).

16. Préparation de la 1,4-dibenzyl-2-(N,N-diéthyluréidométhyl)pipérazine 15

Dans un ballon de 50 ml surmonté d'un réfrigérant, et placé dans un bain d'huile, on dissout 3,20 g (7,71 mmoles) de 1,4-dibenzyl-2-(phénoxy-carbonylamino méthyl)pipérazine 14 dans 10 ml de diéthylamine. Le mélange est chauffé à reflux pendant 48 h. Après refroidissement et évaporation de l'amine en excès, le résidu est repris au CH_2Cl_2 est lavé à l'eau. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée. Le résidu est purifié sur colonne de gel de silice en utilisant successivement CH_2Cl_2 / MeOH, 99 : 1 puis 98 : 2, v/v. La masse obtenue de 15 est de 1,84 g. Rdt = 60%; Rf = 0,30 (CH_2Cl_2 / MeOH, 95 : 5, v/v).

IR ν max (film): 3366 (NH), 1636 (C=O), 1589 (C=C arom) cm^{-1} .

RMN¹H (CDCl_3) δ ppm: 7,19 (10H, sl, H arom), 5,01 (1H, sl, NH), 3,94 (1H, d, $J=13,6$ Hz, CH-Ph), 3,42 (1H, d, $J=13$ Hz, CH-Ph), 3,33 (1H, d, $J=13$ Hz, CH-Ph), 3,24 (1H, d, $J=13,6$ Hz, CH-Ph), 3,19 (2H, m, CH_2NH), 3,13 (4H, q, $J=7$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2,69 (4H, m, 4H de la pipérazine), 2,19 (3H, m, 3H de la pipérazine), 1,03 (6H, t, $J=7$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

17. Préparation de la 1,4-dibenzyl-2-(N,N-dipropyluréidométhyl)pipérazine 16

Le composé 16 est obtenu selon la même méthode que le composé 15 ci-dessus, à partir de 2,40 g (5,78 mmoles) de 1,4-dibenzyl-2-(phénoxy-carbonylaminométhyl)pipérazine 14, et 15 ml de dipropylamine. Le produit est purifié sur colonne de gel de silice éluée par CH_2Cl_2 / MeOH, 99 : 1 puis 98 : 2, v/v. Sa masse est de 1,92 g. Rdt = 79%; Rf = 0,34 (CH_2Cl_2 / MeOH, 95 : 5, v/v).

IR ν max (film): 3379 (NH), 1636 (C=O), 1590 (C=C arom) cm^{-1} .

RMN¹H (CDCl_3) δ ppm: 7,18 (10H, sl, H arom), 5,05 (1H, t, $J=4$ Hz, NH), 3,95 (1H, d, $J=13,5$ Hz, CH-Ph), 3,41 (1H, d, $J=13,1$ Hz, CH-Ph), 3,32 (1H, d, $J=13,1$ Hz, CH-

Ph), 3,19 (1H, d, $J=13,5$ Hz, CH-Ph), 3,02 (6H, m, CH_2NH , $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2,80-2,35 (4H, m, 4H de la pipérazine), 2,35-1,90 (3H, m, 3H de la pipérazine), 1,46 (4H, m, $J=7,4$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 0,80 (6H, t, $J=7,4$ Hz, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

RMN^{13}C (CDCl_3) δ ppm: 157,57 (C=O), 138,41 ; 137,49 ; 128,93 ; 128,35 ; 128,12 ; 127,99 ; 126,88 ; 126,78 (C arom), 62,84 ; 57,26 ; 55,69 ; 52,34 ; 50,33 (CH_2 benzyle, CH_2 de la pipérazine), 58,21 (CH de la pipérazine), 48,87 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 40,06 (CH_2NH), 21,61 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 11,18 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

18. Préparation de la 1,4-dibenzyl-2-(2,2-diméthylpropionamidométhyl) pipérazine 17

Dans un erlenmeyer rodé de 250 ml surmonté d'une ampoule à addition, et d'une garde à chlorure de calcium, 3,86 g (13,1 mmoles) de 1,4-dibenzyl-2-(aminométhyl)pipérazine 5, sont dissous dans 5,5 ml (39,3 mmoles) de triéthylamine et 100 ml de dichlorométhane. On additionne goutte à goutte une solution de 2,63 ml (21,36 mmoles) de chlorure de 2,2-diméthylpropionyle dissous dans 30 ml de dichlorométhane. Le mélange est agité 2 h à température ambiante, puis 4 h à reflux. La phase organique est lavée plusieurs fois à l'eau, séchée sur MgSO_4 , puis filtrée. Après évaporation du solvant, le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice (CH_2Cl_2 / MeOH, 99,5 : 0,5, v / v). La masse de 17 obtenue est de 2,44 g. Rdt = 49%; $R_f = 0,36$ (CH_2Cl_2 / MeOH, 95 : 5, v / v).

IR ν max (film): 3360 (NH), 2955 (C-H arom), 2810 (C-H), 1643 (C=O amide), 1603 (C=C arom) cm^{-1} .

RMN^1H (CDCl_3) δ ppm: 7,35-6,98 (10H, m, H arom), 6,37 (1H, sl, NH), 3,87 (1H, d, $J=13,5$ Hz, CH-Ph), 3,42 (1H, d, $J=13$ Hz, CH-Ph), 3,33 (1H, d, $J=13$ Hz, CH-Ph), 3,45-3,30 (2H, m, CH_2NCO), 3,25 (1H, d, $J=13,5$ Hz, CH-Ph), 2,80-2,40 (4H, m, 4H de la pipérazine), 2,40-2,00 (3H, m, 3H de la pipérazine), 1,07 (9H, s, 3 CH_3).

RMN^{13}C (CDCl_3) δ ppm: 178,33 (C=O), 138,41 ; 137,45 ; 129,06 ; 128,47 ; 128,30 ; 128,14 ; 127,06 ; 126,98 (C arom), 62,89 ; 57,55 ; 55,47 ; 52,33 ; 50,24 (CH_2 benzyle,

CH₂ de la pipérazine), 57,46 (CH de la pipérazine), 38,91 ; 38,50 (CH₂NHCO), 27,47 ; 27,32 (CH₃).

19. Préparation de la 1,4-dibenzyl-2-(isopropylloxycarbonylaminométhyl) pipérazine 18

Dans un erlenmeyer rodé de 250 ml, on introduit 10 g (33,90 mmoles) de 1,4-dibenzyl-2-(aminométhyl)pipérazine 5, dans 100 ml de toluène, et 25 ml de triéthylamine. On additionne goutte à goutte 44 ml d'une solution de chloroformiate d'isopropyle en solution 1 M dans le toluène et le mélange est agité pendant 2 h. On ajoute alors 100 ml d'éther et on lave avec une solution de NaHCO₃, puis à l'eau jusqu'à neutralité. La phase organique est séchée sur MgSO₄, puis évaporée. Le résidu est repris à l'éthanol et chlorhydraté par, barbotage d'un courant de HCl gazeux jusqu'à saturation. L'éthanol est évaporé et le composé 18, obtenu sous forme de chlorhydrate, est dissous dans l'eau, neutralisé par une solution saturée de NaHCO₃, puis extrait à l'éther. La phase organique est lavée, séchée sur MgSO₄, puis le solvant évaporé. On obtient ainsi 8,6 g de produit 18. Rdt = 67%; Rf = 0,4 (CH₂Cl₂ / MeOH, 95 : 5, v / v).

IR ν max (film): 1712 (C=O), 1602 (C=C arom) cm⁻¹.

RMN¹H (CDCl₃) δ ppm: 7,61 (4H, sl, H arom), 7,34 (6H, sl, H arom), 6,50 (1H, sl, NH), 4,70-2,60 (13 H, 5m, 2CH₂-Ph, CH₂NCO, 7H de la pipérazine), 3,41 (1H, m, J=7 Hz, OCH), 1,14 (6H, sl, 2CH₃).

Débenzylation par hydrogénolyse (H₂/Pd/C)

20. Mode opératoire général d'obtention des composés 19-29

Dans un récipient adapté à l'appareil de PARR, on introduit le produit à hydrogéner dans le solvant de réaction (EtOH ou EtOH/HCl ou CH₃CO₂H), additionné de 100 mg de palladium sur charbon (10%) pour 10 mmoles de réactif. Grâce à l'appareil de PARR, la suspension est agitée à 40°C et sous une pression de 2,5 bars

d'hydrogène. L'évolution de la réaction est contrôlée par CCM toutes les 3 h. En fin de réaction, la suspension est filtrée, le solvant évaporé, et le solide est cristallisé.

21. Préparation du chlorhydrate de la 2-éthoxycarbonylpipérazine 19

Il est obtenu à partir de 21 g (62,13 mmoles) de 1,4-dibenzyl-2-éthoxycarbonylpipérazine 1, 150 ml d'EtOH et 10 ml de HCl concentré. Il est cristallisé dans un mélange EtOH / éther, pour donner 14 g de 18, 2HCl. Rdt = 97 %; Pf = 199°C; Rf = 0,39 (CHCl₃ / NH₄OH, 80 : 20 : 2, v / v / v).

IR ν max (KBr): 1756 (C=O) cm⁻¹.

RMN¹H (DMSO D₆) δ ppm: 9,74 (4H, sl, 2⁺NH₂), 4,56 (1H, m, 1H de la pipérazine), 4,11 (2H, m, OCH₂CH₃), 2,80-2,60 (6H, m, 6H de la pipérazine), 1,20 (3H, sl, CH₃).

RMN¹³C (DMSO-d₆) (δ ppm): 156,03 (C=O), 62,73 (OCH₂), 51,70 (CH de la pipérazine), 13,86 (CH₃), les CH₂ de la pipérazine (sont masqués par le signal du DMSO-d₆).

22. Préparation du chlorhydrate de la 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl) pipérazine 20

Il est obtenu à partir de 14 g (35,44 mmoles) de 1,4-dibenzyl-2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)pipérazine 7, 100 ml d'EtOH et 25 ml de HCl concentré. Sa masse est de 9 g. Rdt = 88 %; Pf = 253°C; Rf = 0,24 (CHCl₃ / NH₄OH, 80 : 20 : 2, v / v / v).

IR ν max (nujol): 1694 (C=O) cm⁻¹.

RMN¹H (DMSO-d₆) δ ppm: 10,03 (4H, sl, 2⁺NH₂), 4,26 (2H, m, CH₂OC=O), 3,80 (1H, m, 1H de la pipérazine), 3,60-2,60 (10H, m, N(CH₂CH₃)₂, 6H de la pipérazine), 1,05 (6H, t, J=7 Hz, N(CH₂CH₃)₂).

RMN¹³C (DMSO-d₆) δ ppm: 154,11 (C=O), 61,70 (OCH₂), 50,82 (CH de la pipérazine), 41,43 ; 41,26 (N(CH₂CH₃)₂), 14,12 ; 13,32 (N(CH₂CH₃)₂), les CH₂ de la pipérazine sont masqués par le signal du DMSO-d₆.

23. Préparation de la 2-(pipéridinocarbonyloxyméthyl)pipérazine 21

21 est obtenu selon le mode opératoire général de débenzylation, à partir de 0,65 g (1,60 mmole) de 1,4-dibenzyl-2-(pipéridinocarbonyloxyméthyl)pipérazine 8 et 50 ml d'EtOH. Sa masse est de 0,2 g. Rdt = 55 %; Rf = 0,2 (CHCl₃ / MeOH, 80 : 20, v / v).

IR ν max (film): 3384 (N-H), 1690 (C=O) cm⁻¹.

RMN¹H (CDCl₃) δ ppm: 4,10-3,70 (5H, m, CH₂O, 2NH, 1H de la pipérazine), 3,35-3,52 (4H, m, 2NCH₂ de la pipéridine), 3,0-2,66 (6H, m, 6H de la pipérazine), 1,48-1,35 (6H, m, 6H (CH₂) de la pipéridine).

24. Préparation du chlorhydrate de la 2-(pyrrolidinocarbonyloxyméthyl)

pipérazine 22

A partir de 1,48 g (13,76 [↓]mmoles) de 1,4-dibenzyl-2-(pyrrolidinocarbonyloxyméthyl)pipérazine 9, 40 ml d'EtOH et 1 ml de HCl concentré, on obtient 1,04 g de 22, 2HCl. Rdt = 97 %; Pf = 253°C; Rf = 0,4 (CHCl₃ / MeOH / NH₄OH, 80 : 20 : 2, v / v / v). Le produit est engagé directement dans la réaction d'amidification, sans purification.

compté
*

25. Préparation du chlorhydrate de la 2-(N-butylcarbamoyloxyméthyl)pipérazine

23

A partir de 4 g (10,05 mmoles) de 1,4-dibenzyl-2-(N-butylcarbamoyloxyméthyl)pipérazine 10, 40 ml d'éthanol et 15 ml de HCl concentré, la masse de 23, 2HCl obtenue est de 2,4 g après recristallisation dans EtOH / éther. Rdt = 82%; Pf = 188°C; Rf = 0,14 (CH₂Cl₂ / MeOH / NH₄OH, 80 : 20 : 2, v / v / v).

IR ν max (nujol): 1760 (C=O) cm⁻¹.

RMN¹H (DMSO-d₆) δ ppm: 10,12 (4H, sl, 2⁺NH₂), 7,26 (1H, sl, CONH), 4,22 (2H, m, CH₂OCO), 4,00-2,80 (9H, 3m, NHCH₂, 7H de la pipérazine), 1,30 (4H, m, (NCH₂(CH₂)₂CH₃), 0,84 (3H, t, J=7 Hz, CH₃).

RMN¹³C (DMSO-d₆) δ ppm: 155,28 (C=O), 63,80 (CH₂O), 50,79 (CH de la pipérazine), 41,33 ; 40,07 (CH₂ de la pipérazine), 39,32 (NHCH₂), 31,38 (NHCH₂CH₂CH₂), 19,42 (CH₂CH₂), 13,67 (CH₃).

26. Préparation du diacétate de la 12-(N-2,6-diméthylphényluréidométhyl) pipérazine 24

Il est obtenu à partir de 4,24 g (19,61 mmoles) de 1,4-dibenzyl-2-(N-2,6-diméthylphényluréidométhyl)pipérazine 12 et 20 ml d'acide acétique. On évapore le maximum d'acide acétique et le produit cristallise après ajout d'éther. Sa masse est de 3,00 g. Rdt = 81%; Pf = 149°C; Rf = 0,14 (CHCl₃ / MeOH / NH₄OH, 80 : 20 : 2, v / v / v).

IR ν max (nujol): 1733 (C=O acide acétique), 1644 (C=O urée), 1569 (C=C arom) cm⁻¹.

RMN¹H (DMSO-d₆) δ ppm: 7,91 (4H, sl, 2⁺NH₂ de la pipérazine), 7,00 (3H, sl, H arom), 6,70 (1H, sl, NHCO), 3,40-2,30 (9H, CH₂NCO, 7H de la pipérazine), 2,15 (6H, s, 2CH₃), 1,82 (6H, s, 2CH₃ de l'acide acétique).

RMN¹³C (DMSO-d₆) δ ppm: 173,64 (C=O de l'acide acétique), 156,33 (C=O urée), 136,15 ; 135,59 ; 127,61 ; 125,63 (C arom), 53,68 (CH de la pipérazine), 46,42 ; 43,16 ; 42,94 (CH₂ de la pipérazine), 41,91 (CH₂NH), 22,69 (CH₃ de l'acide acétique), 18,29 (CH₃).

27. Préparation du diacétate de la 2-(N-hexyluréidométhyl)pipérazine 25

Il est obtenu à partir de 3,60 g (8,53 mmoles) de 1,4-dibenzyl-2-(N-hexyluréidométhyl)pipérazine 13 et 20 ml d'acide acétique. Sa masse est de 2 g, Rdt = 65%; Pf = 125°C; Rf = 0,1 (CHCl₃ / MeOH / NH₄OH, 80 : 20 : 2, v / v / v).

IR ν max (nujol): 1732 (C=O acide acétique), 1646 (C=O) cm⁻¹.

RMN¹H (DMSO-d₆) δ ppm: 7,48 (4H, sl, 2⁺NH₂ de la pipérazine), 6,38 (1H, sl, NHCO), 6,23 (1H, sl, NHCO), 3,40-2,30 (11H, 3m, 7H de la pipérazine, 2CH₂NC=O), 1,89 (6H, s, 2CH₃ de l'acide acétique), 1,70-1,10 (8H, m, (CH₂)₄), 0,94 (3H, sl, CH₃).

RMN¹³C (DMSO-d₆) δ ppm: 173,81 (C=O de l'acide acétique), 158,38 (C=O de l'urée), 53,72 (CH de la pipérazine), 46,36 ; 43,04, (CH₂ de la pipérazine), 41,79 ; 39,38 (CH₂NHCONHCH₂), 31,13 ; 30,01 ; 26,15 ; 22,16, (OCNHCH₂ CH₂CH₂CH₂ CH₂), 22,92 (CH₃ de l'acide acétique), 13,95 (CH₃).

28. Préparation du chlorhydrate de la 2-(N,N-diéthyluréidométhyl)pipérazine 26

26 est obtenu à partir de 1,48 g (4,67 mmoles) de 1,4-dibenzyl-2-(N,N-diéthyluréidométhyl)pipérazine 15, 40 ml d'éthanol et 15 ml de HCl concentré. Sa masse est de 1,34 g, après cristallisation dans un mélange EtOH / éther. Rdt = 35%; Pf = 103°C; Rf = 0,1 (CH₂Cl₂ / MeOH / NH₄OH, 80 : 20 : 2, v / v / v).

IR ν max (nujol): 1617 (C=O) cm⁻¹.

RMN¹H (DMSO-d₆) δ ppm: 9,95 (4H, sl, 2⁺NH₂), 6,71 (1H, sl, NH), 3,90-2,80 (13H, 2m, CH₂NH, N(CH₂CH₃)₂, 7H de la pipérazine), 1,01 (6H, t, J=6,7 Hz, N(CH₂CH₃)₂).

RMN¹³C (DMSO-d₆) δ ppm: 156,95 (C=O), 52,22 (CH de la pipérazine), 42,29 ; 40,33 ; 39,92 (CH₂ de la pipérazine), 39,30 (CH₂), 13,87 (CH₃).

29. Préparation du diacétate de la 2-(N,N-dipropyluréidométhyl)pipérazine 27

27 est obtenu à partir de 1,92 g (4,55 mmoles) de 1,4-dibenzyl-2-(N,N-dipropyluréidométhyl)pipérazine 16 et 30 d'acide acétique. Le produit est recristallisé dans un mélange acide acétique / eau. Sa masse est de 0,87 g. Rdt = 53%; Pf = 134°C; Rf = 0,33 (CH₂Cl₂ / MeOH / NH₄OH, 80 : 20 : 2, v / v / v).

IR ν max (nujol): 1633 (C=O) cm⁻¹.

RMN¹H (DMSO-d₆) δ ppm: 6,32 (1H, sl, NHCO), 5,14 (4 H, sl, 2⁺NH₂ de la pipérazine), 3,10-2,10 (13H, 3m, CH₂NH, N(CH₂CH₂CH₃)₂, 7H de la pipérazine), 1,81 (6H, s, 2CH₃CO₂H), 1,43 (4H, m, J=7,2 Hz, N(CH₂CH₂CH₃)₂), 0,80 (6H, t, J=7,2 Hz, N(CH₂CH₂CH₃)₂).

RMN¹³C (DMSO-d₆) δ ppm: 157,24 (C=O), 53,89 (CH de la pipérazine), 47,81 ; 47,02 ; 43,42 ; 42,67 ; 39,51 (CH₂NHCON(CH₂CH₂CH₃)₂, CH₂ de la pipérazine), 21,31 (N(CH₂CH₂CH₃)₂), 11,15 (CH₃).

30. Préparation du chlorhydrate de la 2-(2,2-diméthylpropionamidométhyl) pipérazine 28

Il est obtenu à partir de 2,44 g (36,44 mmoles) de 1,4-dibenzyl-2-(2,2-diméthylpropionamidométhyl)pipérazine 17, 40 ml d'éthanol et 1 ml de HCl concentré. Sa masse est de 1,2 g. Rdt = 68,6%; Pf = 279°C; Rf = 0,13 (CHCl₃ / MeOH / NH₄OH, 80 : 20 : 2, v / v / v).

IR ν max (Nujol): 1644 (C=O) cm⁻¹.

RMN¹H (DMSO-d₆) δ ppm: 10,60-9,00 (2H, sl, 2HCl), 7,95 (1H, t, J=5 Hz, NHC=O), 4,00-3,00 (11H, m, 2NH, CH₂NC=O, 7H de la pipérazine), 1,08 (9H, s, 3CH₃).

31. Préparation du chlorhydrate de la 2-(isopropoxylocarbonylaminométhyl) pipérazine 29

Il est obtenu à partir de 8 g (17,62 mmoles) de 1,4-dibenzyl-2-(isopropoxylocarbonylaminométhyl)pipérazine 18, 50 ml d'éthanol et 10 ml de HCl concentré. Sa masse est de 4,2 g. Rdt = 87%; Pf = 237°C; Rf = 0,60 (CH₂Cl₂ / MeOH / NH₄OH, 80 : 20 : 2, v / v / v).

IR ν max (nujol): 1712 (C=O) cm⁻¹.

RMN¹H (DMSO-d₆) (δ ppm): 10,01 (4H, sl, 2⁺NH₂), 4,72 (1H, t, J=6 Hz, NHCO), 4,00-2,60 (9H, m, CH₂N, 7H de la pipérazine), 1,14 (6H, d, J= 5,6 Hz, 2CH₃).

RMN¹³C (DMSO-d₆) δ ppm: 156,28 (C=O), 67,54 (OCH), 51,67 (CH de la pipérazine), 42,08 (CH₂NH), 22,03 (CH₃), les CH₂ de la pipérazine sont masqués par le signal du DMSO-d₆.

32. Préparation de la 1,4-di-(2,2,2-trichloroéthoxycarbonyl)-2-(N,N-diméthylthiocarbamoyloxyméthyl)pipérazine 30

Dans un erlenmeyer de 250 ml, on introduit 4,5 g (11,75 mmoles) de 1,4-dibenzyl-2-(N,N-diméthylthiocarbamoyloxyméthyl)pipérazine 11 dans 50 ml de benzène sec, et 6,5 ml (47,22 mmoles) de chlorure de 2,2,2-trichloroéthoxycarbonyle. Le mélange est chauffé à reflux pendant 10 h. Après refroidissement, 50 ml d'éther sont ajoutés, la phase organique est lavée 2 fois avec 40 ml d'une solution HCl 3N, et une fois à l'eau, puis séchée sur CaSO₄, et évaporée. Le résidu est purifié sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂ / MeOH, 98 : 2, v / v). La masse obtenue est de 3,73 g. Rdt = 57%; Pf = 107,6°C; Rf = 0,60 (CH₂Cl₂ / MeOH, 95 : 5, v / v).

IR ν max (KBr): 2950 (C-H), 1723 (C=O) cm⁻¹.

RMN¹H (CDCl₃) δ ppm: 5,00-4,30 et 4,30-3,90 (10H, 2m, CH₂OC=S, 2CH₂CCl₃, 4H de la pipérazine), 3,80-2,80 (3H, m, 3H de la pipérazine), 3,27 (3H, s, CH₃), 3,03 (3H, s, CH₃).

RMN¹³C (CDCl₃) δ ppm: 187,00 (C=S), 153,16 (C=O), 95,02 (CH₂OCS), 74,97 ; 74,85 (CCl₃), 66,57 ; 66,24 (OCOCH₂), 49,87 (CH de la pipérazine), 43,66 ; 43,40 ; 39,44 (CH₂ de la pipérazine), 42,67 ; 37,61 (CH₃).

33. Préparation du chlorhydrate de la 2-(N,N-diméthylthiocarbamoyloxyméthyl)pipérazine 31

Dans erlenmeyer de 150 ml, on introduit 3,70 g (6,68 mmoles) de 1,4-di-(2,2,2-trichloroéthoxycarbonyl)-2-(N,N-diméthylthiocarbamoyloxyméthyl)pipérazine 30, dans 15 ml de l'acide acétique glacial, et 5g de Zinc en poudre. Le mélange est agité à température ambiante pendant 5 heures. La solution est alors filtrée, le filtrat est neutralisé par une solution diluée de NaOH, puis extrait 3 fois à l'éther. La phase organique est séchée sur MgSO₄, et évaporée. Le résidu est chlorhydraté par traitement avec une solution concentrée de HCl suivi d'évaporation sous vide pour conduire à 1,70 g de produit. Rdt = 87%; Pf = 237,1°C; Rf = 0,6 (CH₂Cl₂ / MeOH / NH₄OH, 80 : 20 : 2, v / v / v).

IR ν max (nujol): 3345 (N-H) cm^{-1} .

RMN¹H (DMSO-d₆) δ ppm: 10,01 (4H, sl, 2⁺NH₂), 4,72 (1H, t, $J=6$ Hz, NHCO), 4,00-2,60 (9H, m, CH₂N, 7H de la pipérazine), 1,14 (6H, d, $J=5,6$ Hz, 2CH₃).

Amidification

34. Mode opératoire général pour obtenir les composés 32-44

Dans un erlenmeyer rodé, surmonté d'une ampoule à addition, et d'une garde de CaCl₂, sont introduits le sel de la diamine à traiter dans du dichlorométhane sec et 6 éq de triéthylamine. On additionne goutte à goutte une solution de 2,5 éq de chlorure de 3,4,5-triméthoxybenzoyl dans le dichlorométhane sec. Le mélange est agité à température ambiante pendant une nuit. Quelques millilitres d'éthanol sont ajoutés et l'agitation poursuivie 1 h supplémentaire. La phase organique est lavée avec une solution de NaHCO₃, et plusieurs fois à l'eau, puis séchée sur MgSO₄, filtrée, et évaporée sous vide. Le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice, et / ou recristallisé.

35. Préparation de la 2-(éthoxycarbonyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl) pipérazine 32

A partir 14 g (60,61 mmoles) de chlorhydrate de 2-(éthoxycarbonyl)pipérazine 19, on obtient 13,1 g de produit après recristallisation dans un mélange MeOH / éther. Rdt = 39,6%; PF = 122°C; Rf = 0,4 (CHCl₃ / MeOH, 97 : 3, v / v).

IR ν max (KBr): 1735 (C=O ester), 1635 (C=O amide), 1586 (C=C arom) cm^{-1} .

RMN¹H (CDCl₃) δ ppm: 6,59 (4H, s, H arom), 5,40-4,30 (3H, 3m, 3H de la pipérazine), 4,15 (2H, q, $J=7$ Hz, OCH₂CH₃), 3,81 et 3,79 (18H, 2s, 6OCH₃), 3,60-2,60 (4H, 2m, 4H de la pipérazine), 1,19 (3H, t, $J=7$ Hz, OCH₂CH₃).

RMN¹³C (CDCl₃) δ ppm: 171,13 ; 170,54 (C=O amide), 169,08 (C=O ester), 153,32 ; 153,14 ; 139,51 ; 129,81 ; 104,52 ; 104,13 (C arom), 61,86 (CH₂OH), 60,72 ; 56,12 (OCH₃), 52,32 (CH de pipérazine), 44,95 (CH₂ de la pipérazine), 13,91 (OCH₂CH₃).

36. Préparation de la 2-cyano-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine 33

Obtenu à partir de 0,64 g (5,76 mmoles) de 2-cyanopipérazine 3, le produit 33 est purifié sur colonne de gel de silice (CH_2Cl_2 / MeOH, 99 : 01, v / v). Sa masse est de 1,7 g Rdt = 79%; Pf = 206°C; Rf = 0,35 (CH_2Cl_2 / MeOH, 95 : 5, v / v).

IR v max (nujol): 2224 (CN), 1660 (C=O amide), 1582 (C=C arom) cm^{-1} .

RMN¹H (CDCl_3) δ ppm: 6,69 et 6,62 (4H, 2s, H arom), 5,41 (1H, m, 1H de la pipérazine), 4,47-4,03 (3H, 2m, 3H de la pipérazine), 3,81 et 3,79 (18H, 2s, 6OCH₃), 3,45-2,80 (3H, 3m, 3H de la pipérazine).

RMN¹³C (CDCl_3) δ ppm: 171,16 ; 170,32 (C=O amide), 153,48 ; 140,37 ; 139,57 ; 129,17 ; 127,90 ; 104,54 ; 104,36 (C arom), 116 (CN), 60,83 ; 60,78 ; 56,26 (OCH₃).

Microanalyse: C₂₅H₂₉N₃O₈: 499 g/mole. C%; H%; N%: Cal: 60,12; 5,81; 8,41. Tr: 59,85; 5,92; 8,30.

37. Préparation de la 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine 34

Obtenu à partir de 2 g (6,94 mmoles) de chlorhydrate de 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)pipérazine 20, le produit est purifié sur colonne de gel de silice (CH_2Cl_2 / MeOH, 99 : 1 puis 98 : 2, v / v). Sa masse est de 2,7 g. Rdt = 65%; Pf = 128,6°C; Rf = 0,35 (CHCl_3 / MeOH, 97 : 3, v / v).

IR v max (nujol): 1700 (C=O carbamate), 1630 (C=O amide), 1580 (C=C arom) cm^{-1} .

RMN¹H (CDCl_3) δ ppm: 6,57 (4H, s, H arom), 5,10-3,90 (5H, 2m, CH₂O, 3H de la pipérazine), 3,80 et 3,79 (18H, 2s, 6OCH₃), 3,41 (2H, q, J=7 Hz, NCH₂), 3,30-2,50 (6H, m, NCH₂, et 4H de la pipérazine), 1,14 (3H, t, J=7 Hz, CH₃), 1,09-0,80 (3H, sl, CH₃).

RMN¹³C (CDCl_3) δ ppm: 170,80 ; 170,64 (C=O amide), 155,08 (C=O carbamate), 153,33 ; 153,31 ; 139,52 ; 139,43 ; 130,30 ; 130,05 ; 104,37 ; 104,28 (C arom), 60,89 (CH₂O), 60,77 ; 56,21 ; 56,18 (OCH₃), 41,79 ; 41,10 (N(CH₂CH₃)₂), 13,16 ; 13,33 (N(CH₂CH₃)₂).



Microanalyse: $C_{30}H_{41}N_3O_{10}$: 603,67 g/mole. C%; H%; N%. Cal: 59,70; 6,84; 6,96.
Tr: 59,58; 6,91; 6,82.

38. Préparation de la 2-(pipéridinocarbonyloxyméthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxy benzoyl)pipérazine 35

Obtenu à partir 0,19 g (0,84 mmole) de 2-(pipéridinocarbonyloxyméthyl) pipérazine 21, le produit est purifié sur colonne de gel de silice (CH_2Cl_2 / MeOH, 99 : 1, v / v). Sa masse est de 0,15 g. Rdt = 29 %; Rf = 0,50 ($CHCl_3$ / MeOH, 95 : 5, v / v).

IR ν max (nujol): 1694 (C=O carbamate), 1631 (C=O amide), 1584 (C=C arom) cm^{-1} .

RMN¹H ($CDCl_3$), δ ppm: 6,60 (4H, s, H arom), 5,30-4,00 (5H, 2m, CH_2O , 3H de la pipérazine), 3,80 (18H, sl, 6OCH₃), 3,60-2,70 (8H, m, 2NCH₂ de la pipéridine, 4H de pipérazine), 1,40 (6H, m, 3CH₂ de la pipéridine).

Microanalyse: $C_{31}H_{41}N_3O_{10}$: 615,68 g/mole. C%; H%; N%. Cal: 60,48; 6,71; 6,82.
Tr: 60,63; 6,73; 6,91.

39. Préparation de la 2-(pyrrolidinocarbonyloxyméthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxy benzoyl)pipérazine 36

Obtenu à partir de 1,04 g (3,63 mmoles) de chlorhydrate de 2-(pyrrolidino carbonyloxyméthyl)pipérazine 22, le produit est purifié sur colonne de gel de silice (CH_2Cl_2 / MeOH, 98 : 2, v / v), puis recristallisé dans un mélange méthanol / éther / hexane. Sa masse est de 0,59 g. Rdt = 29%; Pf = 145°C; Rf = 0,43 ($CHCl_3$ / MeOH, 95 : 5, v / v).

IR ν max (nujol): 1694 (C=O carbamate), 1622 (C=O amide), 1584 (C=C arom) cm^{-1} .

RMN¹H ($CDCl_3$) δ ppm: 6,57 (4H, s, H arom), 5,30-4,00 (5H, m, CH_2O , 3H de la pipérazine), 3,81 (18H, sl, 6OCH₃), 3,60-2,30 (8H, m, 2NCH₂ de la pyrrolidine, 4H de la pipérazine), 1,90-1,40 (4H, m, 2NCH₂-CH₂ de la pyrrolidine).

RMN¹³C ($CDCl_3$) δ ppm: 170,76 (C=O amide), 153,97 (C=O carbamate), 153, 26 ; 139,42 ; 139,26 ; 130,18 ; 130,10 ; 104,25 ; 104,10 (C arom), 60,47 (CH_2O), 60,75 ;

56,15 (OCH₃), 46,14 ; 45,60 (N(CH₂)₂ pyrrolidine), 25,42 ; 24,71 (N(CH₂CH₂)₂ pyrrolidine).

Microanalyse: C₃₀H₃₉N₃O₁₀: 601,66 g/mole. C%; H%; N%. **Cal:** 59,98; 6,53; 6,98.

Tr: 59,88; 6,57; 7,04.

40. Préparation de la 2-(N-butylcarbamoyloxyméthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine 37

Obtenu à partir de 1 g (3,47 mmoles) de chlorhydrate de 2-(N-butylcarbamoyloxyméthyl)pipérazine 23, le produit est purifié sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂ / MeOH, 99 : 1, v / v). Sa masse est de 0,61 g. Rdt = 29%; Pf = 101°C; Rf = 0,36 (CH₂Cl₂ / MeOH, 95 : 5, v / v).

IR v max (nujol): 3390 (NH), 1717 (C=O carbamate), 1620 (C=O amide), 1586 (C=C arom) cm⁻¹.

RMN¹H (CDCl₃) δppm: 6,58 et 6,57 (4H, 2s, H arom), 4,74 (1H, sl, NH), 4,60-3,90 (5H, 2m, CH₂O, 3H de la pipérazine), 3,80 et 3,79 (18H, 2s, 6OCH₃), 3,60-2,60 (6H, 2m, 2NHCH₂, 4H de la pipérazine), 1,28 (4H, m, NHCH₂(CH₂)₂CH₃), 0,82 (3H, t, J=7Hz, CH₃).

RMN¹³C (CDCl₃) δ ppm: 170,83 (C=O amide), 155,65 (C=O carbamate), 153, 27 ; 139,43 ; 130,16 ; 130,01 ; 104,33 (C arom), 60,89 (CH₂O), 60,74 ; 56,17 (OCH₃), 40,71 (NHCH₂), 31,76 (NHCH₂CH₂), 19,69 (CH₂CH₃), 13,51 (CH₃).

Microanalyse: C₃₀H₄₁N₃O₁₀, ½ H₂O: 612,68 g/mole. C%; H%; N%. **Cal:** 58,80; 6,74; 6,86. **Tr:** 58,90; 6,72; 7,92.

41. Préparation de la 2-(N-2,6-diméthylphényluréidométhyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine 38

Obtenu à partir de 3 g (7,85 mmoles) de diacétate de 2-(N-2,6-diméthylphényluréidométhyl)pipérazine 24, le produit est purifié sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂ / MeOH, 99 : 1, v / v). Sa masse est de 890 mg. Rdt = 17%; Pf = 153°C; Rf = 0,3 (CH₂Cl₂ / MeOH, 95 : 5, v / v).

IR ν max (nujol): 3374 et 3235 (2NH), 1651 (C=O urée), 1624 (C=O amide), 1586 (C=C arom) cm^{-1} .

RMN¹H (CDCl_3) δ ppm: 7,10-6,80 (3H, m, H arom, méta et para), 6,58 et 6,56 (4H, 2s, H arom ortho), 5,50-4,90 (6H, m, NH (échangeable), 5H de la pipérazine), 4,85-3,75 (12H, m, 4OCH₃), 3,75-2,60 (10H, 2m, 2OCH₃, CH_2NHCO , 2H de la pipérazine), 2,35-1,60 (7H, m, 2CH₃, NH échangeable).

RMN¹³C (CDCl_3) δ ppm: 171,24 ; 170,79 (C=O amide), 156,84 (C=O urée), 153,37 ; 153,15 ; 139,49 ; 139,40 ; 136,47 ; 134,03 ; 130,00 ; 128,36 ; 104,67 ; 104,43 (C arom), 60,85 ; 60,77 ; 56,29 ; 55,95 (OCH₃), 39,11 (CH_2NH), 18,17 (CH₃).

Microanalyse: $\text{C}_{34}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_9$, $\frac{3}{4} \text{H}_2\text{O}$: 664,31 g/mole. C%: H%; N%. **Cal:** 61,47; 6,61; 8,43. **Tr:** 61,43; 6,58; 8,62.

42. Préparation de la 2-(N-hexyluréidométhyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl) pipérazine **39**

Obtenu à partir de 1,76 g (4,86 mmoles) de diacétate de 2-(N-hexyluréido méthyl)pipérazine **25**, le produit est purifié sur colonne de gel de silice (CH_2Cl_2 / MeOH, 99 : 1, v / v). Sa masse est de 1,04 g. Rdt = 46%; Pf = 94,8°C; Rf = 0,3 (CH_2Cl_2 / MeOH, 95 : 5, v / v).

IR ν max (nujol): 3374 (NH large), 1631 (C=O urée), 1621 (C=O amide), 1584 (C=C arom) cm^{-1} .

RMN¹H (CDCl_3) δ ppm: 6,61 et 6,59 (4H, 2s, H arom), 5,31 (1H, sl, NH), 5,10-3,90 (5H, m, NH, 4H de la pipérazine), 3,90-3,70 (18H, m, 6OCH₃), 3,70-2,60 (7H, m, $\text{CH}_2\text{NCONCH}_2$, 3H de la pipérazine), 1,50-0,95 (8H, m, 4CH₂), 0,77 (3H, t, $J=6,4$ Hz, CH₃).

RMN¹³C (CDCl_3) δ ppm: 171,43 ; 170,84 (C=O amide), 158,43 (C=O urée), 153,38 ; 153,28 ; 139,48 ; 130,09 ; 104,49 (C arom), 60,86 ; 60,79 67 ; 56,29 ; 56,21 (OCH₃), 40,50 ; 39,05 ($\text{CH}_2\text{NHCONHCH}_2$), 31,40 (OCNHCH₂CH₂), 30,15 (OCNHCH₂CH₂CH₂), 26,45 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 22,46 (CH_2CH_3), 13,91 (CH₃).

Microanalyse: $C_{32}H_{46}N_4O_9$, $\frac{3}{4} H_2O$: 644,33 g/mole. C%; H%; N%. Cal: 59,65; 7,44; 8,70. Tr: 59,87; 7,50; 8,71.

43. Préparation de la 2-(N,N-diéthyluréidométhyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxy benzoyl)pipérazine 40

Obtenu à partir de 0,47 g (1,63 mmole) de chlorhydrate de 2-(N,N-diéthyluréidométhyl)pipérazine 26, le produit est purifié sur colonne de gel de silice (CH_2Cl_2 / MeOH, 99 : 1 puis 98 : 2, v / v). Sa masse est de 0,80 g. Rdt = 81%; Pf = 148°C; Rf = 0,18 (CH_2Cl_2 / MeOH, 95 : 05, v / v).

IR ν max (nujol): 3389 (NH), 1634 (C=O urée), 1619 (C=O amide), 1584 (C=C arom) cm^{-1} .

RMN¹H ($CDCl_3$) δ ppm: 6,61 (4H, sl, H arom), 4,95 (1H, sl, NH), 4,14 (3H, 2m, 3H de la pipérazine), 3,82 et 3,79 (18H, 2s, 6OCH₃), 3,60-2,60 (10H, 2m, CH_2NH , 2NCH₂CH₃, 4H de la pipérazine), 1,03 (6H, t, $J=7Hz$, 2NCH₂CH₃).

RMN¹³C ($CDCl_3$) δ ppm: 171,43 ; 170,95 (C=O amide), 157,04 (C=O urée), 153,39 ; 153,29 ; 139,48 ; 130,28 ; 130,06 ; 104,41 (C arom), 60,81 ; 56,31 ; 56,22 (OCH₃), 49,81 ; 47,10 ; 43,45 ; 39,51 (CH_2NH , CH et CH_2 de la pipérazine), 41,11 (NCH₂), 13,78 (CH₃).

Microanalyse: $C_{30}H_{42}N_4O_9$, $\frac{3}{4} H_2O$: 616,20 g/mole. C%; H%; N%. Cal: 58,48; 7,11; 9,09. Tr: 58,83; 7,07; 9,11.

44. Préparation de la 2-(N,N-dipropyluréidométhyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxy benzoyl)pipérazine 41

Obtenu à partir de 0,47 g (1,30 mmole) de diacétate de 2-(N,N-dipropyluréidométhyl)pipérazine 27, le produit est purifié sur colonne de gel de silice (CH_2Cl_2 / MeOH, 99 : 1 puis 98 : 2, v / v). Sa masse est de 0,50 g. Rdt = 61%; Pf = 78°C; Rf = 0,5 (CH_2Cl_2 / MeOH, 95 : 5, v / v).



IR ν max (nujol): 3395 (NH), 1636 (C=O urée), 1617 (C=O amide), 1584 (C=C arom) cm^{-1} .

RMN¹H (CDCl_3) δ ppm: 6,60 et 6,58 (4H, 2s, H arom), 4,88 (1H, sl, NH), 4,50-3,95 (3H, m, 3H de la pipérazine), 3,82 et 3,79 (18H, 2s, 6OCH₃), 3,60-3,30 (10H, 2m, CH₂NH, N(CH₂CH₂CH₃)₂, 4H de la pipérazine), 1,47 (4H, m, $J=7,2$ Hz, (CH₂CH₂CH₃)₂), 0,80 (6H, t, $J=7,2$ Hz, (CH₂CH₂CH₃)₂).

RMN¹³C (CDCl_3) δ ppm: 171,43 ; 170,95 (C=O amide), 157,43 (C=O urée), 153,39 ; 153,29 ; 139,51 ; 130,31 ; 130,07 ; 104,47 (C arom), 60,83 ; 56,31 ; 56,23 (OCH₃), 49,82 ; 43,40 ; 39,75 (CH₂NH, CH₂ et CH de la pipérazine), 49,01 (NCH₂), 21,70 (CH₂CH₃), 11,27 (CH₃).

Microanalyse: C₃₂H₄₆N₄O₉, H₂O: 648,7 g/mole. C%; H%; N%. **Cal:** 59,25; 7,45; 8,64. **Tr:** 59,40; 7,32; 8,54.

45. Préparation de la 2-(2,2-diméthylpropionamidométhyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine 42

Obtenu à partir de 1,2 g (4,4 mmoles) de chlorhydrate de 2-(2,2-diméthylpropionamidométhyl)pipérazine 28, le produit est purifié sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂ / MeOH, 98 : 2, v / v). Sa masse est de 0,9 g. Rdt = 34,6%, Pf = 146,5°C; Rf = 0,29 (CH₂Cl₂ / MeOH, 95 : 5, v / v).

IR ν max (nujol): 3391 (N-H), 1690 (C=O amide aliph), 1618 (C=O amide arom), 1584 (C=C arom) cm^{-1} .

RMN¹H (CDCl_3) δ ppm: 6,60 et 6,58 (4H, 2s, H arom), 6,35 (1H, sl, NH), 5,10-4,00 (3H, 2m, 3H de la pipérazine), 3,80 et 3,79 (18H, 2s, 6OCH₃), 3,70-2,80 (6H, 3m, CH₂NCO, 4H de la pipérazine), 1,10 (9H, sl, 3CH₃).

RMN¹³C (CDCl_3) δ ppm: 178,81 (NHC=O amide), 171,10 ; 170,77 (C=O amide), 153,26 ; 153,11 ; 139,33 ; 129,84 ; 104,41 ; 104,29 (C arom), 60,71 ; 56,21 ; 56,18 (OCH₃), 49,48 (CH de la pipérazine), 43,26 (CH₂NH), 38,46 (C(CH₃)₃), 27,38 (CH₃).

Microanalyse: C₃₀H₄₁N₃O₉, H₂O: 605,69 g/mole. C%; H%; N%. **Cal:** 59,49; 6,82; 6,94. **Tr:** 59,68; 7,14; 7,23.

46. Préparation de la 2-(isopropyloxycarbonylaminométhyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine 43

Obtenu à partir de 2 g (7,30 mmoles) de chlorhydrate de 2-(isopropyloxy carbonylaminométhyl)pipérazine 29, le produit est purifié sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂ / MeOH, 99 : 1, v / v). Sa masse est de 3 g. Rdt = 70%; Pf = 138°C; Rf = 0,3 (CH₂Cl₂ / MeOH, 95 : 5, v / v).

IR ν max (KBr): 3368 (N-H), 2976 (C-H arom), 2838 (C-H), 1717 (C=O carbamate), 1622 (C=O amide), 1585 (C=C arom) cm⁻¹.

RMN¹H (CDCl₃) δ ppm: 6,60 (2H, s, H arom), 6,58 (2H, s, Harom), 5,00 (1H, sl, NH), 4,80 (1H, sep, $J=6,2$ Hz, OCH), 4,60-3,90 (3m, CH₂NHCO, 1H de la pipérazine), 3,81, 3,79, et 3,70 (18H, 3s, 6OCH₃), 3,70-2,70 (6H, 2m, 6H de la pipérazine), 1,15 (6H, 2d, $J=6,2$ Hz, 2CH₃).

RMN¹³C (CDCl₃) δ ppm: 170,97 ; 170,67 (C=O amide), 156,22 (C=O carbamate), 153,25 ; 139,30 ; 139,18 ; 130,25 ; 129,81 ; 104,21 (C arom), 67,94 (OCH), 60,56 ; 56,03 ; 55,96 (OCH₃), 39,31 (CH₂NH), 21,94 ; 21,84 (CH₃).

Microanalyse: C₂₉H₃₉O₁₀N₃, ½ H₂O: 598,65 g/mole. C%; H%; N%. Cal: 58,18; 6,73; 7,01. Tr: 58,22; 6,89; 6,91.

47. Préparation de la 2-(N,N-diméthylthiocarbamoyloxyméthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine 44

Obtenu à partir de 1,70 g (6,20 mmoles) de chlorhydrate de 2-(N,N-diméthylthiocarbamoyloxyméthyl)pipérazine 31, le produit est purifié sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂ / MeOH, 99 : 1, v / v). Sa masse est de 2,3 g. Rdt = 63%; Pf = 171°C; Rf = 0,24 (CH₂Cl₂ / MeOH, 97 : 3, v / v).

Ce composé est aussi obtenu selon le même mode opératoire que le composé 46, à partir de 2 g (3,97 mmoles) de 2-(hydroxyméthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine 45, 0,19 g de NaH (à 60 %) et 0,9 g (1,5 équ) de chlorure de diméthylthiocarbamoyle. Sa masse est de 1,2 g. Rdt = 51%.

IR ν max (KBr): 1623 (C=O), 1582 (C=C arom) cm^{-1} .

RMN¹H (CDCl_3) (δ ppm): 6,59 et 6,57 (4H, 2s, H arom), 5,40-3,90 (5H, m, $\text{CH}_2\text{OC}=\text{S}$, 3H de la pipérazine), 3,82, 3,80 et 3,79 (18H, 3s, 6 OCH_3), 3,70-3,35 (2H, m, 2H de la pipérazine), 3,25 (3H, s, CH_3), 3,20-2,30 (5H, m, CH_3 , 2H de la pipérazine).

RMN¹³C (CDCl_3) δ ppm: 186,88 (C=S), 170,65 (C=O), 153,23 ; 139,32 ; 139,10 ; 130,00 ; 104,15 ; 103,89 (C arom), 66,38 (CH_2O), 60,64 ; 56,18 ; 56,14 (OCH_3), 42,67 ; 37,53 (CH_3).

Microanalyse: $\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_9\text{S}$: 591,68 g/mole. C%; H%; N%. **Cal:** 56,85; 6,26; 7,10. **Tr:** 56,73; 6,41; 6,97.

48. Préparation de la 2-(hydroxyméthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl) pipérazine 45

Dans un ballon de 500 ml, on introduit 10 g (18,31 mmoles) de 2-(éthoxycarbonyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine 32, dans 100 ml de méthanol et la solution est refroidie à 0°C dans un bain de glace. On ajoute progressivement toutes les heures 7 g (10 éq) de NaBH_4 . Le mélange est agité une nuit, puis 100 ml de méthanol sont ajoutés et on extrait 3 fois avec 50 ml de dichlorométhane. La phase organique est lavée, puis séchée sur MgSO_4 , et évaporée. Le résidu est recristallisé dans un mélange MeOH / éther. La masse obtenue est de 6,50 g. Rdt = 70 %; Pf = 139°C; Rf = 0,45 (CH_2Cl_2 / MeOH, 90 : 10, v / v).

IR ν max (KBr): 3370 (O-H), 1636 (C=O), 1581 (C=C), cm^{-1} .

RMN¹H (CDCl_3) δ ppm: 6,59 (4H, s, H arom), 5,25-3,90 (4H, m, CH_2O , OH échangeable, 1H de la pipérazine), 3,80 et 3,79 (18H, 2s, 6 (OCH_3), 3,70-2,70 (6H, m, 6H de la pipérazine).

RMN¹³C (CDCl_3) δ ppm: 171,51 (C=O), 153,23 ; 139,60 ; 139,24 ; 130,23 ; 129,47 ; 104,52 ; 104,14 (C arom), 60,73 ; 56,11 (OCH_3), 59,16 (CH_2OH).

Microanalyse: $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{O}_9\text{N}_2$: 504,54 g/mole. C%; H%; N%. **Cal:** 59,51; 6,39; 5,55. **Tr:** 59,30; 6,46; 5,39.

49. Préparation de la 2-(N,N-diéthylthiocarbamoyloxyméthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine 46

Dans un erlenmeyer rodé de 250 ml, surmonté d'une ampoule à addition, 0,1 g de NaH (à 60% en dispersion dans l'huile minérale) est introduit dans 10 ml de DMF. Une solution de 1 g (1,98 mmole) de 2-(hydroxyméthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine 45, dans 10 ml de DMF est ajoutée goutte à goutte et le mélange est chauffé à 80°C. A la fin du dégagement total d'hydrogène, le mélange est ramené à la température ambiante et une solution de 0,36 g (2,37 mmoles) de chlorure de N,N-diéthylthiocarbamoyle, dans 10 ml de DMF est additionnée goutte à goutte. Après 5 heures de chauffage à 80°C, la solution est refroidie, puis extraite 3 fois avec du dichlorométhane. La phase organique est lavée plusieurs fois à l'eau, séchée sur MgSO₄ et évaporée. Le résidu est purifié sur colonne de gel de silice. On obtient ainsi 800 mg de dérivé 46. Rdt = 65%; Pf = 175°C; Rf = 0,43 (CH₂Cl₂ / MeOH, 95 : 5, v/v).

IR ν max (KBr): 3045 (C-H arom), 2974, 2834 (C-H), 1614 (C=O), 1582 (C=C arom) cm⁻¹.

RMN¹H (CDCl₃) δ ppm: 6,60 (2H, s, H arom), 6,59 (2H, s, H arom), 5,40-4,60 et 4,60-4,00 (5H, 2m, CH₂OC=S, 3H de la pipérazine), 3,82, 3,80 et 3,79 (18H, 3s, 6OCH₃), 3,75-3,10 (4H, 2m, S=CN(CH₂CH₃), 2H de la pipérazine), 3,41 (2H, q, J=7 Hz, S-CN(CH₂CH₃), 3,10-2,75 (2H, m, 2H de la pipérazine), 1,14 et 0,98 (6H, 2t, J=7 Hz, 2CH₃).

RMN¹³C (CDCl₃) δ ppm: 186,30 (C=S), 170,84 ; 170,71 (C=O), 153,41 ; 153,28 ; 139,48 ; 139,30 ; 130,12 ; 104,43 ; 104,05 (C arom), 66,53 (CH₂O), 60,78 ; 56,29 (OCH₃), 47,86 ; 43,31 (N(CH₂CH₃)₂), 13,20 ; 11,80 (N(CH₂CH₃)₂).

Microanalyse: C₃₀H₄₁N₃O₉S, ½ H₂O: 628,74 g/mole. C%; H%; N%. Cal: 57,31; 6,57; 6,68. Tr: 57,52; 6,48; 6,55.

50. Préparation de la 2-(éthylcarbonyloxyméthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine 47

Dans un erlenmeyer rodé de 250 ml, surmonté d'une ampoule à addition et placé dans un bain de glace, sont introduits 0,5 g (1 mmole) de 2-(hydroxyméthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine 45 et 2 ml de triéthylamine dans 10 ml de dichlorométhane. Une solution de 0,1 ml (1,15 mmole) de chlorure de propionyle dans 10 ml de dichlorométhane est ajoutée goutte à goutte. Après 3h de reflux, la phase organique est lavée plusieurs fois à l'eau, séchée sur $MgSO_4$ et le solvant évaporé. Le produit est purifié sur colonne de gel de silice (CH_2Cl_2 / MeOH, 99 : 1, v / v), puis recristallisé dans un mélange MeOH / éther. On obtient ainsi 0,46 g de produit 47. Rdt = 82%; Pf = 140°C; Rf = 0,39 (CH_2Cl_2 / MeOH: 95 : 5, v / v).

IR v max (KBr): 2954 (C-H arom), 2840 (C-H), 1746 (C=O ester), 1630 (C=O amide) 1586 (C=C arom) cm^{-1} .

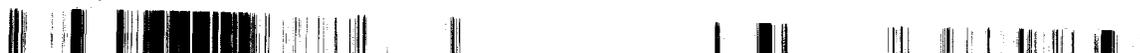
RMN¹H ($CDCl_3$) δ ppm: 6,55 (4H, s, H arom), 5,20-3,95 (5H, 2m, CH_2O , 3H de la pipérazine), 3,80 (18H, sl, 6OCH₃), 3,50-2,60 (4H, m, H de la pipérazine), 2,16 (2H, m, CH_2CH_3), 1,00 (3H, t, $J=7$ Hz, CH_2CH_3).

RMN¹³C ($CDCl_3$) δ ppm: 173,73 (C=O ester), 170,69 (C=O amide), 153,25 ; 139,41 ; 130,04 ; 129,86 ; 104,17 (C arom), 59,94 (CH_2OH), 60,68 ; 56,07 (OCH₃), 27,10 (CH_2CH_3), 8,69 (CH_2CH_3).

Microanalyse: $C_{28}H_{36}N_2O_{10}$: 560 g/mole. C%; H%; N%. Cal: 60,00; 6,42; 5,00. Tr: 59,80; 6,53; 4,93.

51. Préparation de la 2-(phénoxycarbonyloxyméthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine 48

Dans un erlenmeyer rodé de 250 ml, surmonté d'une ampoule à addition et placé dans un bain de glace, sont introduits 1 g (1,98 mmole) de 2-(hydroxyméthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine 45 et 0,6 ml de pyridine dans 10 ml de dichlorométhane. Une solution de 0,5 ml (3,98 mmoles) de chloroformate de phényle dans 5 ml de dichlorométhane est ajoutée goutte à goutte. Après 3h d'agitation, la



phase organique est lavée avec 15 ml d'une solution de NaOH 1M, 3 fois avec de l'eau, puis avec 15 ml d'une solution de HCl 1M et plusieurs fois à l'eau, séchée sur MgSO₄ et évaporée. Le produit est recristallisé dans un mélange MeOH / éther. On obtient ainsi 0,77 g de composé **48**. Rdt = 62%; Pf = 154°C; Rf = 0,34 (CH₂Cl₂ / MeOH, 95 : 5, v / v).

IR ν max (KBr): 2958 (C-H arom), 2838 (C-H), 1768 (C=O carbonate), 1631 (C=O amide), 1587 (C=C arom) cm⁻¹.

RMN¹H (CDCl₃) δ ppm: 7,14 (5H, m, O-Ph), 6,58 (4H, s, H ortho Ph(OCH₃)₃), 5,40-4,00 (5H, 2m, CH₂OC=O, 3H de la pipérazine), 3,77 et 3,73 (18H, 2s, 6OCH₃), 3,50-2,80 (4H, m, 4H de la pipérazine).

RMN¹³C (CDCl₃) δ ppm: 171,13; 170,70 (C=O amide), 150,64 (C=O carbamate), 153,27 ; 139,44 ; 139,27 ; 130,02 ; 129,73 ; 129,38 ; 126,15 ; 120,74 ; 104,17 (C arom), 64,61(CH₂O), 60,67 ; 56,06 ; 55,97 (OCH₃).

Microanalyse: C₃₂H₃₆N₂O₁₁: 624 g/mole. C%; H%; N%. Cal: 61,53; 5,76; 4,48. Tr: 61,70; 5,79; 4,55.

52. Préparation de la 3-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine **49**

Dans un erlenmeyer rodé de 250 ml, surmonté d'une ampoule à addition, d'une garde de CaCl₂, et refroidi dans un bain de glace-sel (-5-0°C), sont introduits 5 g (17,36 mmoles) de chlorhydrate de 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)pipérazine **20** dans 50 ml de dichlorométhane sec, et 9,6 ml (4 éq) de triéthylamine. On additionne très lentement, goutte à goutte, une solution de 4 g (17,34 mmoles) de chlorure de 3,4,5-triméthoxybenzoyle dans 50 ml de dichlorométhane sec. Le mélange est agité à 0°C pendant 6h. Il est ensuite lavé avec une solution de NaHCO₃, et plusieurs fois à l'eau, puis séché sur MgSO₄, filtré, et évaporée sous vide. Le résidu obtenu est chromatographié sur colonne de gel de silice avec (CH₂Cl₂ / MeOH, 98 : 2, v / v), pour conduire à 6 g de produit **49**. Rdt = 84 %; Rf = 0,9 (CH₂Cl₂ / MeOH, 95 : 5, v / v).



IR ν max (nujol): 3260 (NH), 1695 (C=O carbamate), 1625 (C=O amide) cm^{-1} .

RMN¹H (CDCl₃) δ ppm: 6,51 (2H, s, H arom), 4,10-3,00 (3H, m, CH₂O, 1H de la pipérazine), 3,80 (9H, sl, 3OCH₃), 3,50-2,60 (10H, m, N(CH₂CH₃)₂, 6H de la pipérazine), 1,82 (1H, sl, NH), 1,03 (6H, m, N(CH₂CH₃)₂).

53. Préparation de la 3-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1-triphénylméthyl pipérazine 50

Dans un erlenmeyer rodé de 250 ml, surmonté d'une ampoule à additionner, d'une garde de CaCl₂, et refroidi dans un bain de glace-sel (-5-0°C), sont introduits 5 g (17,36 mmoles) de chlorhydrate de 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)pipérazine 20 dans 50 ml de dichlorométhane sec, et 9,6 ml (4 éq) de triéthylamine. On additionne goutte à goutte, une solution de 4,83 g (17,32 mmoles) de chlorotriphénylméthane dans 50 ml de dichlorométhane sec et le mélange est agité pendant 72 h. Après lavage avec une solution de NaHCO₃, et plusieurs fois à l'eau, la phase organique est séchée sur MgSO₄, filtrée, et évaporée sous vide. On obtient ainsi 7,52 g de produit 50. Rdt = 95 %; Rf = 0,16 (CH₂Cl₂ / MeOH, 97 : 3, v / v).

IR ν max (nujol): 3320 (NH), 3045 (C-H arom), 2974, 2834 (C-H), 1695 (C=O), 1595 (C=C arom) cm^{-1} .

RMN¹H (CDCl₃) δ ppm: 7,40 (6H, m, H arom), 7,10 (9H, m, H arom), 3,86 (2H, m, CH₂O), 3,50-2,45 (8H, m, N(CH₂CH₃)₂, NH, 3H de la pipérazine), 2,00-1,10 (4H, m, 4H de la pipérazine), 0,97 (6H, m, N(CH₂CH₃)₂).

RMN¹³C (CDCl₃) δ ppm: 155,46 (C=O), 129,26 ; 127,40 ; 125,91 (C arom), 66,85 (CH₂O), 54,68 (CH de pipérazine), 51,50 ; 48,78 ; 45,75 (CH₂ de la pipérazine), 41,67 ; 41,21 (N(CH₂CH₃)₂), 13,93 ; 13,45 (N(CH₂CH₃)₂).

54. Préparation de la 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1-(3,4,5-triméthoxy benzoyl)-4-triphénylméthylpipérazine 51

Dans un erlenmeyer de 250 ml, sont introduits 7,5 g (16,45 mmoles) de 3-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1-triphénylméthylpipérazine 50, 7 ml de triéthylamine et

60 ml de CH_2Cl_2 . On additionne goutte à goutte, une solution de 4,44 g (19,25 mmoles) de chlorure de 3,4,5-triméthoxybenzoyle dans 50 ml de CH_2Cl_2 . Le mélange est agité une nuit puis lavé avec une solution de NaHCO_3 et plusieurs fois à l'eau. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée, évaporée sous vide et le résidu est chromatographié rapidement sur un verre fritté rempli de gel de silice, en utilisant le CH_2Cl_2 comme éluant. On obtient ainsi 9,52 g de composé **51**. Rdt = 89%; Rf = 0,33 (CH_2Cl_2 / MeOH, 97 : 3, v / v).

IR ν max (nujol): 1701 (C=O carbamate), 1616 (C=O amide), 1507 (C=C arom) cm^{-1} .

RMN¹H (CDCl_3) δ ppm: 7,38 et 7,19 (15H, 2m, (Ph)₃), 6,49 (2H, s, H ortho Ph(OCH₃)₃), 4,99 et 4,41 (2H, 2m, 2H de la pipérazine), 3,83 (2H, m, CH₂O), 3,74 et 3,73 (9H, 2s, 3OCH₃), 3,59 (2H, q, J=7 Hz, N(CH₂CH₃)), 3,60-2,60 (6H, m, N(CH₂CH₃), 4H de la pipérazine), 1,79 (1H, m, 1H de la pipérazine), 1,09 (6H, m, N(CH₂CH₃)₂).

RMN¹³C (CDCl_3) δ ppm: 169,97 (C=O amide), 155,78 (C=O carbamate), 152,96 ; 138,96 ; 130,86 ; 129,13 ; 127,53 ; 126,20 ; 104,31 (C arom), 62,83 (CH₂O), 60,66 ; 56,02 (OCH₃), 49,25 (CH de la pipérazine), 48,97 ; 48,00 ; 44,93 (CH₂ de la pipérazine), 41,69 ; 41,12 (N(CH₂CH₃)₂), 13,90 ; 13,43 (N(CH₂CH₃)₂).

55. Préparation de la 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine **52**

6,5 g (9,98 mmoles) de 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)-4-triphénylméthylpipérazine **51** sont dissous dans 100 ml de MeOH et 6 ml d'une solution de HCl 12 N, sont additionnés progressivement. Après 10 min d'agitation, le MeOH est évaporé. Le résidu est repris dans du CH_2Cl_2 . La phase organique est lavée avec une solution saturée de NaHCO_3 , trois fois à l'eau, puis séchée sur MgSO_4 , filtrée, et évaporée sous vide. Le produit est purifié sur colonne de gel de silice, en utilisant successivement le CH_2Cl_2 et CH_2Cl_2 / MeOH, 97 : 3, v / v comme éluants. On obtient ainsi 3,8 g de composé **52**. Rdt = 93%; Rf = 0,11 (CH_2Cl_2 / MeOH, 97 : 3, v / v).



IR v max (nujol): 3330 (NH), 1693 (C=O carbamate), 1632 (C=O amide), 1584 (C=C arom) cm^{-1} .

RMN¹H (CDCl₃) δ ppm: 6,55 (2H, s, H arom), 4,90-4,40 (2H, m, 2H pipérazine), 4,29 (2H, m, CH₂O), 3,79 et 3,77 (9H, 2s, 3OCH₃), 3,40-2,50 (9H, 3m, N(CH₂CH₃)₂, 5H de la pipérazine), 1,37 (1H, sl, NH), 1,02 (6H, t, J=7 Hz, N(CH₂CH₃)₂).

RMN¹³C (CDCl₃) δ ppm: 170,44 (C=O amide), 155,36 (C=O carbamate), 153,07 ; 138,95 ; 130,94 ; 104,08 (C arom), 61,44 (CH₂O), 60,62 ; 56,10 (OCH₃), 45,86 (C de la pipérazine), 41,67 ; 41,07 (N(CH₂CH₃)₂), 13,88 ; 13,25 (N(CH₂CH₃)₂).

56. Préparation de la 3-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1-(3,4,5-triméthoxy thiobenzoyl)pipérazine 53

Dans un erlenmeyer de 100 ml, on introduit 1,7 g (3,66 mmoles) de 3-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine 49 dans 35 ml de THF. La solution est refroidie à 0°C dans un bain de glace et 1,5 g (3,71 mmoles) de réactif de Lawesson est alors ajouté par petites fractions. Le mélange est agité à la même température pendant 30 min, puis le solvant est évaporé sous vide et le résidu purifié rapidement sur colonne de gel de silice avec successivement le CH₂Cl₂ puis le mélange CH₂Cl₂ / MeOH, 99 : 1, v / v comme éluants. On obtient 1,1 g de composé 53. Rdt = 62%; Rf = 0,18 (CH₂Cl₂ / MeOH, 95 : 5, v / v).

Le produit est engagé directement dans la réaction d'amidification pour la préparation du composé 56.

57. Préparation de la 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1-(3,4,5-triméthoxy thiobenzoyl)pipérazine 54

Préparé comme le composé 53, à partir de 1,4 g (3,44 mmoles) de 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine 52 et 1,4 g (3,46 mmoles) de réactif de Lawesson, le produit est purifié sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂ / MeOH, 99 : 1, v / v), pour donner 1,2 g de composé 54. Rdt = 82% ; Rf = 0,18 (CH₂Cl₂ / MeOH, 95 : 5, v / v).



Le produit est engagé directement dans la réaction d'amidification pour la préparation du composé 55.

58. Préparation de la 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxythiobenzoyl)pipérazine 57

Préparé comme le composé 53, à partir de 0,50 g (0,83 mmole) de 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine 34, 10 ml de THF et 0,70 g (1,73 mmole) de réactif de Lawesson, le produit est purifié sur colonne de gel de silice avec (CH_2Cl_2 / MeOH, 99 : 1, v / v). On obtient ainsi 0,46 g de composé 57. Rdt = 87%; Pf = 95°C; Rf = 0,34 (CH_2Cl_2 / MeOH, 95 : 5, v / v).

IR ν max (KBr): 1701 (C=O), 1582 (C=C arom) cm^{-1} .

RMN¹H (CDCl_3) δ ppm: 6,49 (4H, s, H arom), 5,80-3,90 (3H, m, 3H de la pipérazine), 4,09 (2H, m, CH_2O), 3,80 (18H, sl, 6 OCH_3), 3,60-2,10 (8H, 2m, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, 4H de la pipérazine), 1,04 (6H, m, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

RMN¹³C (CDCl_3) δ ppm: 202,94 ; 202,64 (C=S), 154,93 (C=O), 153,28 ; 138,76 ; 137,71 ; 137,45 ; 103,33 (C arom), 61,07 (CH_2O), 60,82 ; 56,24 (OCH_3), 41,93 ; 41,29 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 14,08 ; 13,41 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

Microanalyse: $\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_8\text{S}_2$, $\frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$: 644 g/mole. C%; H%; N%. Cal: 55,90; 6,52; 6,52. Tr: 55,78; 6,64; 6,32.

59. Préparation de la 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-4-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)-1-(3,4,5-triméthoxythiobenzoyl)pipérazine 55

Dans un ballon de 50 ml, muni d'une garde à CaCl_2 , on introduit 1,20 g (2,82 mmoles) de 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1-(3,4,5-triméthoxythiobenzoyl)pipérazine 53 dans 30 ml de dichlorométhane sec, 0,80 ml de triéthylamine et 0,78 g (3,38 mmoles) de chlorure de 3,4,5-triméthoxybenzoyle. Le mélange agité à température ambiante pendant une nuit puis lavé avec une solution de NaHCO_3 , et plusieurs fois à l'eau. La phase organique est séchée sur MgSO_4 , filtrée, évaporée sous vide et le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice avec (CH_2Cl_2 /



MeOH, 99 : 1, v / v) puis recristallisé dans un mélange MeOH / éther. On obtient ainsi 0,40 g de produit **55**. Rdt = 23%; Pf = 175°C; Rf = 0,44 (CH₂Cl₂ / MeOH, 95 : 5, v / v).

IR ν max (KBr): 1699 (C=O carbamate), 1642 (C=O amide) 1588 (C=C arom) cm⁻¹.

RMN¹H (CDCl₃) δ ppm: 6,58 (2H, s, H arom), 6,28 (2H, m, H arom), 5,10-4,00 (3H, 2m, 3H de la pipérazine), 4,17 (2H, m, CH₂O), 3,81, 3,78 et 3,77 (18H, 3s, 6OCH₃), 3,70-2,60 (8H, 3m, N(CH₂CH₃)₂, 4H de la pipérazine), 1,04 (6H, m, N(CH₂CH₃)₂).

RMN¹³C (CDCl₃) δ ppm: 202,53 (C=S), 170,66 (C=O amide), 155,04 (C=O carbamate), 153,26 ; 153,07 ; 139,41 ; 138,41 ; 137,76 ; 129,60 ; 104,22 (C arom), 60,91 (CH₂O), 60,82 ; 56,12 ; 56,04 (OCH₃), 54,81 ; 47,65 (C de la pipérazine), 41,72 ; 41,10 (N(CH₂CH₃)₂), 13,90 ; 13,27 (N(CH₂CH₃)₂).

Microanalyse: C₃₀H₄₁N₃O₉S: 619 g/mole. C%; H%; N%. Cal: 58,18; 6,62; 6,78. Tr: 58,01; 6,89; 6,60.

60. Préparation de la 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1-(3,4,5-triméthoxythiobenzoyl)-4-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine **56**

Obtenu comme le composé **55**, à partir de 0,25 g (0,6 mmole) de 3-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1-(3,4,5-triméthoxythiobenzoyl)pipérazine **54** dans 10 ml de dichlorométhane sec, 0,20 ml de triéthylamine et 0,2 g (0,87 mmole) de chlorure de 3,4,5-triméthoxybenzoyle, le produit est purifié sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂ / MeOH, 99 : 1, v / v), puis recristallisé dans un mélange MeOH / éther / hexane. On obtient ainsi 0,15 g de produit **56**. Rdt = 41%; Pf = 106°C; Rf = 0,53 (CH₂Cl₂ / MeOH: 95 : 5, v / v).

IR ν max (KBr): 1691 (C=O carbamate), 1631 (C=O amide), 1584 (C=C arom) cm⁻¹.

RMN¹H (CDCl₃) δ ppm: 6,58 (2H, s, H arom), 6,45 (2H, m, H arom), 5,30-4,70 (2H, 2m, 2H de la pipérazine), 4,50-4,00 (3H, 2m, 1H de la pipérazine, CH₂O), 3,80 et 3,77 (18H, 2s, 6OCH₃), 3,60-2,60 (8H, m, N(CH₂CH₃)₂, 4H de la pipérazine), 1,03 (6H, m, N(CH₂CH₃)₂).



RMN¹³C (CDCl₃) δ ppm: 202,23 (C=S), 170,54 (C=O amide), 155,00 (C=O carbamate), 153,24 ; 139,55 ; 138,43 ; 137,53 ; 129,83 ; 129,62 ; 104,31 (Carom), 61,15 (CH₂O), 60,70 ; 60,65 ; 56,12 (OCH₃), 51,65 ; 49,30 ; 48,77 (C de la pipérazine), 41,75 ; 41,00 (N(CH₂CH₃)₂), 13,93 ; 13,26 (N(CH₂CH₃)₂).

Microanalyse: C₃₀H₄₁N₃O₉S: 619 g/mole. C%; H%; N%. **Cal:** 58,15; 6,62; 6,78. **Tr:** 58,04; 6,94; 6,63.

61. Préparation de la 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1,4-di-(3,4-diméthoxy benzoyl)pipérazine **58**

Obtenu selon le mode opératoire général de l'amidification à partir de 3,36 g (11,67 mmoles) de diamine chlorohydratée **20**, 5,80 g (2,5 éqg) de chlorure de 3,4-diméthoxybenzoyle et 10 ml de triéthylamine, le produit est purifié sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂ / MeOH, 99 : 1, v / v). On obtient 3,35 g de produit **58**. Rdt = 53%; Pf = 104°C; Rf = 0,49 (CH₂Cl₂ / MeOH, 95 : 5, v / v).

IR ν max (nujol): 1693 (C=O carbamate), 1622 (C=O amide), 1583 (C=C arom) cm⁻¹.

RMN¹H (CDCl₃) δ ppm: 6,95 (2H, s, 2H₂ arom), 6,92 et 6,79 (4H, 2d, J = 8 Hz, 2H₅ et 2H₆ arom), 5,10-4,10 (3H, 2m, 3H de la pipérazine), 4,03 (2H, m, CH₂O), 3,84 (12H, sl, 4OCH₃), 3,75-2,70 (8H, 2m, N(CH₂CH₃)₂, 4H de la pipérazine), 1,13 (6H, sl, N(CH₂CH₃)₂).

RMN¹³C (CDCl₃) δ ppm: 170,87 ; 170,71 (C=O amide), 154,98 (C=O carbamate), 150,44 ; 150,37 ; 148,95 ; 148,83 ; 127,06 ; 126,89 ; 120,04 ; 119,84 ; 110,25 (C arom), 60,75 (CH₂O), 55,78 (OCH₃), 41,68 ; 40,98 (N(CH₂CH₃)₂), 13,75 ; 13,25 (N(CH₂CH₃)₂).

Microanalyse. C₂₈H₃₇O₈N₃: 543,62 g/mole. C%; H%; N%. **Cal:** 61,86; 06,86; 07,73. **Tr:** 61,93; 06,77; 07,84.



62. Préparation de la 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1,4-di-(2,4-diméthoxybenzoyl)pipérazine **59**

Obtenu selon le mode opératoire général de l'amidification à partir de 0,5 g (1,75 mmole) de diamine chlorohydratée **20**, 1g (2,5 éqg) de chlorure de 2,4-diméthoxybenzoyle et 10 ml de triéthylamine, le produit est purifié sur colonne de gel de silice avec (CH₂Cl₂ / MeOH, 99 : 1, v / v). On obtient 0,96 g de produit **59**. Rdt = 49%; Pf = 85°C; Rf = 0,27 (CH₂Cl₂ / MeOH, 95 : 5, v / v).

IR v max (nujol): 1708 (C=O carbamate), 1606 (C=O amide), 1600 (C=C arom) cm⁻¹.

RMN¹H (CDCl₃) δ ppm: 7,12 (2H, m, 2H₃ arom), 6,44 (4H, m, H_{5,6} arom), 5,10-4,10 (3H, 2m, 3H de la pipérazine), 4,02 (2H, m, CH₂O), 3,75 (12H, sl, 4OCH₃), 3,60-2,50 (8H, 2m, N(CH₂CH₃)₂, 4H de la pipérazine), 1,09 (6H, sl, 2CH₃).

RMN¹³C (CDCl₃) δ ppm: 168,39 (C=O amide), 161,78 (C=O carbamate), 156,45 ; 154,96 ; 129,63 ; 117,53 ; 104,94 ; 98,17 (C arom), 60,74 (CH₂O), 55,33 (OCH₃), 47,49 ; 43,10 ; 42,31 (C de la pipérazine), 41,68 ; 40,98 (N(CH₂CH₃)₂), 13,71 ; 13,35 (N(CH₂CH₃)₂).

Microanalyse. C₂₈H₃₇O₈N₃, H₂O: 561 g/mole. C%; H%; N%. Cal: 59,89; 6,81; 7,48. Tr: 59,79; 7,05; 7,26.

63. Préparation de la 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1,4-dibenzoyl pipérazine **60**

Obtenu selon le mode opératoire général de l'amidification à partir de 0,50 g (1,74 mmole) de diamine chlorohydratée **20**, 0,42 ml (2,1 éqg) de chlorure de benzoyle et 1,50 ml de triéthylamine, le produit est purifié sur colonne de gel de silice (CH₂Cl₂ / MeOH, 99,5 : 0,5, v / v). On obtient ainsi 0,60 g de produit **60**. Rdt = 82 %; Pf = 121°C; Rf = 0,2 (CH₂Cl₂ / MeOH, 98 : 2, v / v).



IR ν max (nujol): 1692 (C=O carbamate), 1627 (C=O amide), 1577 (C=C arom) cm^{-1} .

RMN¹H (CDCl_3) δ ppm: 7,34 (10H, sl, H arom), 5,10-4,10 (3H, 2m, 3H de la pipérazine), 4,04 (2H, m, CH_2O), 3,90-2,30 (8H, 2m, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, 4H de la pipérazine), 1,01 (6H, sl, 2CH_3).

RMN¹³C (CDCl_3) δ ppm: 171,06 (C=O amide), 155,12 (C=O carbamate), 135,08 ; 134,87 ; 130,02 ; 128,58 ; 128,53 ; 126,93 (C arom), 60,71 (CH_2O), 55,78 (OCH_3), 41,85 ; 41,16 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 13,88 ; 13,36 ($\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$).

Microanalyse. $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{O}_4\text{N}_3$: 423,51 g/mole. C%; H%; N%. **Cal:** 68,06; 06,95; 09,92.

Tr: 68,15; 06,95; 09,95.



CHAPITRE IV
BIOLOGIE



I-Activité anti-PAF

1. Introduction

Le pouvoir antagoniste de nos molécules est mesuré par l'inhibition de la fixation du PAF à son récepteur. Les molécules ont été testées *in vitro* pour leur potentialité à inhiber l'agrégation plaquettaire induite par le PAF.

L'activité antagoniste est déterminée par la CI_{50} (concentration molaire provoquant une inhibition de 50% de l'agrégation maximale), sur un plasma riche en plaquettes (PRP) selon la méthode de Cazenave (89). Le PRP a été obtenu à partir de sang prélevé chez le lapin. La CI_{50} est déterminée à partir de courbes « effet-dose ».

2. Méthode expérimentale

2. 1. Préparation des plaquettes de lapin

Le sang est prélevé de l'oreille de lapins New-Zealand albinos mâles ou femelles dans des tubes Falcon de 50 ml contenant un anticoagulant, l'EDTA dont la concentration finale est de 5 mM. Après centrifugation à 1500 rpm pendant 20 min à température ambiante, le surnageant est centrifugé à nouveau à 3200 rpm pendant 15 min à température ambiante. Le culot est lavé avec une solution tampon (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, NaH_2PO_4 0,42 mM, $NaHCO_3$ 12 mM, glucose 5,55 mM, $MgCl_2$ 1 mM, gélatine 0,25 %, EGTA 0,2 mM) puis centrifugé de nouveau à 3200 rpm pendant 15 min. Cette opération est répétée deux fois. Le culot plaquettaire issu du second lavage est repris dans une solution tampon à pH 7,4 le nombre de plaquettes par μl de suspension est compté (Coultronics, France) et ajusté à 400 000 cellules / μl avec le même tampon.

2. 2. Mesure de l'agrégation plaquettaire

2. 2. 1. Principe

Les plaquettes en suspension dans le plasma diffractent un faisceau lumineux. Ce phénomène peut être évalué en mesurant la transmission lumineuse. Lors du regroupement des plaquettes en agrégats sous l'action d'un stimulus ou d'un agent agrégant (agoniste), le milieu s'éclaircit. Il est donc possible de suivre l'agrégation plaquettaire par la mesure de la variation de trouble de la suspension au cours du



temps (mesure turbidimétrique). Cette technique mise au point par Cazenave (89), peut être utilisée avec des plaquettes en suspension dans un milieu tampon.

2. 2. 2. Protocole expérimental

Dans un tube de mesure d'agrégation plaquettaire en verre, muni d'un agitateur galvanisé, 500 μl d'une suspension de plaquettes lavées contenant $4 \cdot 10^5$ cellules / μl sont agités énergiquement dans l'agrégomètre, à 37°C. A cette suspension sont ajoutés 5 μl d'une solution de CaCl_2 0,2 M, 2 μl de fibronogène et 5 μl de solvant (DMSO ou EtOH) ou le produit à tester dilué dans le même solvant. Après deux minutes, l'agent agrégant, le PAF (2,5 nM) est ajouté et la variation de transmission de la lumière enregistrée pendant cinq minutes. Les produits sont testés à différentes concentrations et chaque mesure est répétée deux fois. L'activité antagoniste ou antiagrégante est exprimée par la CI_{50} et déterminée à partir de courbes «effet-dose».

II-Activité anti-VIH

Ces tests ont été effectués dans le laboratoire du Professeur Dominique Dormont au CEA.

L'inhibition de la réplication du VIH-1 est évaluée par la mesure de l'activité de la transcriptase inverse (TI) dans les surnageants de culture de monocytes / macrophages infectés par l'isolat VIH-1/Ba-L. Les doses effectives 50% correspondant à l'activité antivivale des composés sont calculées à partir des activités TI cumulées en utilisant le logiciel "Dose-effects analysis with microcomputers" mis au point par Chou (90).



III-Résultats et discussions

Les activités biologiques anti-PAF et anti-VIH de nos molécules sont regroupées dans les tableaux 9 à 14, le PMS 601 (composé **34**) étant chaque fois pris comme référence. Comme dans les résultats préliminaires, nous avons pris le parti de classer nos composés par ordre de lipophilie croissante estimée par la contribution du substituant R, calculée selon Rekker et coll. (64).

1/ Modification du substituant R en position 2 de la pipérazine

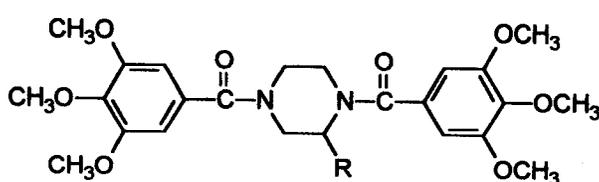


Tableau 9

N°	R	f _R	Anti-PAF (CI ₅₀ , μM)	Anti-VIH (CI ₅₀ , μM)
36		0,2	10	>100
43		0,334	5	25
34		0,564	8	11
35		0,719	0,08	95
37		0,853	0,67	~10 ^a

^a 53% d'inhibition à la dose de 10 μM.

a) Partie amine de la fonction carbamate

Les résultats du **tableau 9** montrent que la cyclisation de la diéthylamine du composé de référence **34** (**PMS 601**) a des effets contraires sur les deux activités, anti-PAF et anti-VIH. Elle est très dommageable à l'activité anti-virale puisque le cycle à 6 (composé **35**) est de 8 à 9 fois moins actif (CI_{50} de 95 μ M) et le cycle à 5 (composé **36**) est totalement inactif ($CI_{50} > 100$ μ M). En revanche, l'activité anti-PAF, quant à elle, est nettement améliorée par le groupement pipéridine (composé **35**), 100 fois plus actif que le **PMS 601**, et reste inchangée avec la pyrrolidine dans le composé **36**. La lipophilie peut-elle être incriminée? OUI pour l'augmentation de l'activité anti-PAF: les composés **35** et **37** présentent un meilleur ancrage hydrophobe vis à vis du récepteur du PAF que le **PMS 601**. NON pour l'activité anti-virale puisque le composé **37** avec une amine monosubstituée plus lipophile que la diéthylamine est aussi actif que le **PMS 601** sur le VIH. La cyclisation introduit probablement une gêne stérique défavorable à l'activité anti-VIH.

b) Enchaînement des atomes du groupement carbamate

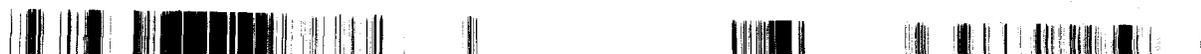
Dans le composé **43**, l'azote et l'oxygène de la fonction carbamate ont été intervertis.

Si l'activité anti-PAF reste inchangée ($CI_{50} = 5$ μ M), l'effet sur le VIH n'est que légèrement diminué (le composé **43** est deux fois moins actif que le **PMS 601**). Pour vérifier que ceci n'est pas la conséquence d'un éventuel effet stérique dû au groupement isopropyle, il serait judicieux de synthétiser l'analogue du composé **43** à chaîne linéaire.

c) Modification du groupement fonctionnel carbamate

Deux groupements fonctionnels proches de cette fonction ont été étudiés: amide et uréate. Les résultats sont visibles dans le **tableau 10**.

Une constatation majeure s'impose: quel que soit le groupement fonctionnel, amide ou uréate, l'activité anti-PAF des composés a presque ou totalement disparu et la lipophilie n'est absolument pas en cause, les composés **42**, **38**, **41** et **39** ayant un f_R très voisin de celui du **PMS 601**. En revanche, il n'en est pas de même pour l'activité anti-



VIH. Si l'amide est totalement inactif, tous les uréates synthétisés possèdent une activité anti-virale. Le composé **39** en particulier se révèle 10 fois plus actif ($CI_{50} = 1 \mu M$) que notre référence. Il semble qu'avec ce groupement fonctionnel, une nouvelle série, différente de la précédente apparaisse, et que nous puissions découvrir des composés plus actifs encore sur le VIH, donc intéressants même s'ils ont perdu leur potentiel anti-inflammatoire.

Tableau 10

N°	R	f_R	Anti-PAF ($CI_{50}, \mu M$)	Anti-VIH ($CI_{50}, \mu M$)
40		-0,564	6% à 10 μM	40
42		0,331	>100	>100
38		0,345	30% à 10 μM	32
41		0,474	8% à 10 μM	>10*
34		0,564	8	11
39		0,763	22% à 10 μM	1

* 25% d'inhibition à 10 μM .

Il est possible aussi que cette nouvelle série ait un comportement différent puisqu'un composé beaucoup plus hydrophile tel que le composé **40** présente cependant une activité anti-VIH non négligeable (bien que 4 fois plus faible que celle du PMS 601). Dans le composé **38**, une gêne stérique est peut-être impliquée et le

remplacement du noyau 2,6-diméthylé par des aromatiques substitués moins encombrants est à étudier.

La structure spatiale de l'uréate, très différente de celle du carbamate n'est peut-être pas étrangère à ces comportements inattendus. En effet, les formes tautomères engendrées par les deux fonctions ainsi que la possibilité de former des liaisons hydrogène ne sont pas les mêmes et la modélisation moléculaire pourrait apporter un éclairage fructueux.

d) Autres groupements fonctionnels

Afin de ne pas passer à côté de quelque chose d'éventuellement important, nous avons testé les intermédiaires réactionnels. Les données sont regroupées dans le **tableau 11**. Parmi les composés beaucoup moins lipophiles que le **PMS 601**, le nitrile **33** ($R = CN$) et l'alcool **45** ($R = CH_2OH$), seul l'alcool **45** donne un résultat intéressant comme anti-PAF ($CI_{50} = 1,27 \mu M$), mais aucun comme anti-VIH. Le nitrile **33** n'a même pas pu être testé à cause de son insolubilité dans le milieu.

Tableau 11

N°	R	f_R	Anti-PAF (CI_{50} , μM)	Anti-VIH (CI_{50} , μM)
33	$-C\equiv N$	-1,041	38% à 10 μM	ND ^a
45	$-CH_2-OH$	-0,951	1,27	>100
47	$-CH_2-O-C(=O)-CH_2CH_3$	0,488	0,158	~100 ^b
34	$-CH_2-O-C(=O)-N(CH_2CH_3)_2$	0,564	8	11
c	$-CH_2-O-C(=O)-C(CH_3)_3$	1,526	0,1	>100 ^d
48	$-CH_2-O-C(=O)-O-C_6H_5$	1,67	0,63	10

^a Non déterminé: composé insoluble dans le DMSO, solvant utilisé pour le test. ^b 47% d'inhibition à 100 μM .
^c composé c, voir les résultats préliminaires **tableau 2, chapitre II**. ^d 25% d'inhibition à 100 μM .

En revanche, le carbonate **48** ($R = CH_2OCOPh$) est 12 fois plus actif en anti-PAF et aussi actif en anti-VIH que le leader. Cependant, sa toxicité à la dose de 100 μM lui confère un index thérapeutique inacceptable.

Enfin, l'ester isolipophile du PMS **601**, le propionate **47** ($R = CH_2OCOEt$) préparé pour vérifier si l'activité médiocre sur le VIH de l'ester **c** ($R = CH_2OCOCMe_3$) de l'étude préliminaire n'était pas due à sa trop grande lipophilie, en dépit d'une bonne activité en anti-PAF, a donné un résultat décevant sur le VIH. Ceci peut apporter une preuve complémentaire de la nécessité d'un hétéroatome (O ou N) à la suite du carbonyle pour l'activité anti-VIH, constatation en accord avec le piètre résultat obtenu avec l'amide **42** du tableau 10 et les activités non négligeables du carbonate **48** du tableau 11, du carbamate inversé **40** et des divers uréates du tableau 10.

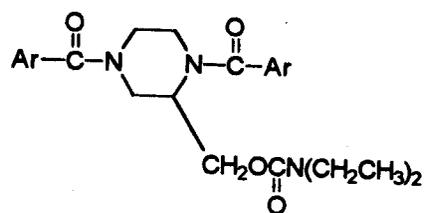
2/ Modification des substituants en position 1 et 4 de la pipérazine

Les différents résultats sont répertoriés dans le tableau 12.

Comme nous l'avons déjà constaté pour l'activité anti-PAF (**65**), la suppression d'un méthoxyle en position méta (composé **58**) des triméthoxybenzoyles PMS **601** (**34**) ne modifie pas l'affinité de ce composé pour son récepteur. Il semble qu'il en soit de même pour l'activité anti-VIH. Le composé **58** inhibant la réplication de 42% à 10 μM montre une efficacité équivalente à celle du leader. En revanche, le déplacement du méthoxyle de la position méta à la position ortho (composé **59**) a une conséquence dramatique sur les deux activités. En ce qui concerne l'activité anti-PAF, deux raisons peuvent être invoquées: (i) cette transformation a modifié le caractère électronique du «cache-oreilles», la position et/ou l'importance des potentiels électrostatiques négatifs dont la nécessité a été prouvée (**46**) ne sont alors plus respectées; (ii) le méthoxyle en ortho introduit une gêne stérique défavorable à la conjugaison et/ou au bon positionnement du «cache-oreilles». Pour ce qui est de l'activité anti-virale, on ne peut que supposer que les potentiels électrostatiques jouent là aussi un rôle que seules la connaissance de la cible touchée dans la réplication du VIH par ce type de molécules et éventuellement la modélisation moléculaire nous permettront de comprendre. L'importance des méthoxyles est encore confortée par la totale inactivité du composé **60**, qui en est dépourvu.



Tableau 12



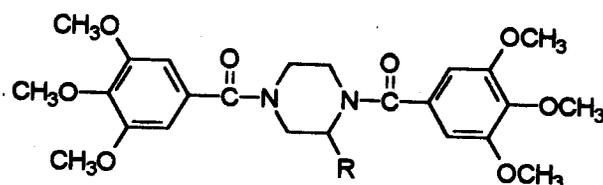
N°	Ar	Anti-PAF (CI ₅₀ μM)	Anti-VIH (CI ₅₀ μM)
<u>34</u>		8	11
<u>58</u>		6,5	42% à 10 μM
<u>59</u>		>100	>100
<u>60</u>		6% à 10μM	22% à 10μM

3/ Composés soufrés

Un de nos objectifs était de voir l'évolution des activités biologiques en remplaçant un ou des carbonyles (C=O) du PMS 601 par des thiocarbonyles (C=S). Ces modifications ont été effectuées soit sur l'appendice R, soit au niveau du «cache-oreilles» et les résultats sont présentés dans les tableaux 13 et 14.

a) Fonction thiocarbamate du substituant R

Tableau 13



N°	R	Anti-PAF (CI ₅₀ , μM)	Anti-VIH (CI ₅₀ , μM)
34		8	II
46		16% à 5μM	ND ^a
44		1,6	76% à 100 μM

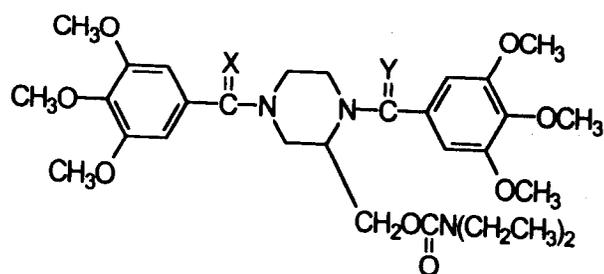
^a Non déterminable car composé très toxique même à la dose de 10 μM

Le remplacement du carbonyle du carbamate du PMS 601 (**34**) par un thiocarbonyle (composé **46**), qui ne semblait pas modifier de façon fondamentale la structure de la molécule, est totalement néfaste à l'activité anti-PAF. Dans la mesure de l'activité anti-virale, ce composé s'est révélé très toxique, même à la dose relativement faible de 10 μM. Ce comportement étant peut-être la conséquence de l'augmentation de lipophilie apportée par le soufre par rapport à l'oxygène. Nous avons essayé de compenser cette augmentation en éliminant deux méthylènes (composé **44**). La double activité s'en est trouvée nettement améliorée, en anti-PAF (CI₅₀ = 1,6 μM), et avec une activité anti-virale (76% d'inhibition de la réplication à 100 μM) non négligeable.



b) Fonction thiocarbamide en position 1 et/ou en position 4 de la pipérazine

Tableau 14



N°	X	Y	Anti-PAF (CI ₅₀ , μM)	Anti-VIH (CI ₅₀ , μM)
<u>34</u>	O	O	8	11
<u>55</u>	O	S	0,44	>100
<u>56</u>	S	O	0,6	41% à 10 μM
<u>57</u>	S	S	0,35	< 10 ^a

^a 76% d'inhibition à 10 μM.

Les composés 55, 56 et 57, montrent une activité anti-PAF de 10 à 20 fois supérieure à celle du leader (composé 34). Ceci peut s'expliquer par la différence de lipophilie due à l'atome du soufre. En ce qui concerne l'activité anti-virale, il est curieux de constater que pour une augmentation de lipophilie globale identique, la position du thiocarbonyle en 1 ou en 4 de la pipérazine joue un rôle aussi important. Situé en 1, à côté de l'appendice en 2, le soufre rend la molécule (composé 55) inactive alors qu'en position 4 (composé 56) la CI₅₀ frôle les 10 μM, proche de celle du leader (composé 34). Ce résultat est en contradiction avec les données obtenues quand les deux cotés sont modifiés (composé 57). Les 76% d'inhibition à 10 μM contre 50% à 11 μM pour le PMS 601, et une CI₅₀ bien meilleure en anti-PAF en fait un excellent candidat à la double activité. Une réserve s'impose cependant: le composé 57 s'est révélé toxique à 100 μM, mais ceci n'est pas rédhibitoire dans la mesure où d'autres modifications chimiques sont réalisables pour améliorer l'index thérapeutique.

IV-Conclusion et perspectives

Nous avons atteint nos objectifs mais il reste encore beaucoup à faire compte-tenu de tous les éléments positifs récoltés au cours de ce travail.

Du point de vue chimique, toutes les molécules envisagées ont été synthétisées en utilisant des méthodes simples, un nombre d'étapes relativement faible et des rendements satisfaisants. Une adaptation des procédés de laboratoire à l'échelle industrielle en cas de commercialisation d'un candidat sélectionné dans cette série de pipérazines tri substituées serait donc relativement aisée.

En ce qui concerne les effets biologiques, les diverses modifications réalisées aussi bien au niveau du substituant en position 2, que sur les azotes en 1 et 4 de la pipérazine confirment le résultat préliminaire: il n'existe aucune corrélation entre les deux activités, anti-PAF et anti-VIH.

Les modifications au niveau du substituant en position 2 nous ont permis non seulement de vérifier nos premières constatations mais aussi d'enrichir cette série de nouvelles hypothèses.

- Pour la double activité, le meilleur groupement fonctionnel reste la fonction carbamate, à condition que le substituant de l'azote ne soit pas trop encombrant. Le composé **37** ($R = \text{CH}_2\text{OCONH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$) se révèle même un meilleur leader que le PMS 601, légèrement plus efficace en anti-VIH mais surtout, 10 fois plus puissant en anti-PAF.
- En remplaçant la fonction carbamate par la fonction uréate, nous avons même réussi à dissocier totalement les deux activités. Le composé **39** ($R = \text{CH}_2\text{NHCONH}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$), 10 fois plus actif sur le VIH que le PMS 601 est totalement dépourvu d'activité anti-PAF. Il est à noter, dans ces deux derniers cas (composés **37** et **39**), la présence de groupements NH susceptibles d'établir des liaisons hydrogène et l'hypothèse d'interactions renforcées à ce niveau avec un éventuel récepteur est à creuser.
- Cette opportunité est peut-être aussi à exploiter dans plusieurs cas:
 - Le composé **43** ($R = \text{CH}_2\text{NHCOOCH}(\text{CH}_3)_2$), le «carbamate à l'envers», dans lequel le groupement isopropyle introduit un effet stérique qui semble

défavorable à l'activité anti-VIH comme nous avons pu le constater dans le cas des carbamates à amine cyclique 35 et 36.

- L'amide 42 qui possède un NH mais dont le groupement tertibutyle encombrant représente probablement un handicap.
- Il en est de même pour le thiocarbamate 44 ($R = \text{CH}_2\text{OCSN}(\text{CH}_3)_2$) pour lequel il serait intéressant de tester le remplacement de l'azote disubstitué par son analogue monosubstitué ($R = \text{CH}_2\text{OCSNHCH}_2\text{CH}_3$).

Les modifications au niveau du «cache-oreilles», quant à elles, réaffirment la nécessité de la présence et du bon positionnement des groupements méthoxyles aussi bien pour l'activité anti-PAF qu'anti-virale.

- Nous étudions actuellement la possibilité de ne conserver qu'un seul des deux groupements triméthoxybenzoyle, l'autre étant remplacé par des aryles ou polyaryles plus hydrophobes, pour faciliter le passage de la barrière hématoencéphalique et les résultats des tests *in vitro* sont très encourageants.
- L'introduction du soufre à ce niveau, en dépit d'une augmentation de la toxicité, amène une amélioration de la double activité qu'il convient d'élucider.

Le point sur le mode d'action

Bien que ce ne soit pas directement l'objectif de ce travail, il nous paraît intéressant de donner ici un aperçu sur ce que nous savons du mode d'action.

Les études menées par les biologistes avec le PMS 601(34) ont permis de démontrer que celui-ci:

- est inactif sur la transcriptase inverse et la protéase virale. Il se démarque donc des composés actuellement utilisés en trithérapie dans le traitement du SIDA.
- est inactif sur la PAF-AH, enzyme responsable de dégradation du PAF. Son activité anti-PAF ne procède donc pas un phénomène d'activation de cette enzyme.
- n'a pas d'action sur les transports ioniques membranaires de Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , qu'ils soient passifs ou dépendants de l'ATPase Na^+/K^+ .



En revanche, le **PMS 601** (68):

- présente une action sur les phases précoces du cycle biologique du VIH. En effet, il interagit avec le domaine de liaison du VIH au récepteur CD4+ et diminue son expression à la surface des macrophages. Cette interaction est indépendante du co-récepteur CCR5, spécifique des macrophages, sur lequel le **PMS 601** ne se fixe pas.
- montre aussi une action sur les phases tardives du cycle biologique du VIH car il diminue l'expression générale des protéines virales.
- diminue la synthèse de deux médiateurs essentiels de l'inflammation, le PAF et le TNF- α dans les macrophages.
- diminue la neurotoxicité médiée par le PAF*.

Au stade où nous en sommes, il est difficile d'attribuer un mécanisme d'action bien défini au **PMS 601**. Les études se poursuivent et sont justifiées par les propriétés suivantes:

- Le **PMS 601** n'est pas toxique, au moins au niveau cellulaire, vis-à-vis des macrophages dérivés des monocytes.
- Il vient d'être démontré que le **PMS 601** marqué au ^3H est capable de traverser la barrière hématoencéphalique*. Il serait donc susceptible d'empêcher la réplication du VIH au niveau du cerveau, objectif primordial qui avait été fixé.
- Enfin, contrairement à un autre antagoniste du PAF, le **RP55778**, qui diminue l'efficacité de l'AZT et de la ddi (91), le **PMS 601** potentialise *in vitro* l'activité antivirale de l'AZT, la molécule anti-SIDA la plus utilisée, dans les macrophages dérivés des monocytes.

D'autres tests sont évidemment en projet tels que l'évaluation de la toxicité du **PMS 601** *in vivo* et l'étude de sa pharmacocinétique (biodisponibilité) chez la souris.

Ces résultats, très encourageants nous confortent donc dans l'idée que le **PMS 601** (34), ou l'un de ses analogues, pourrait constituer une stratégie thérapeutique nouvelle dans le cadre des infections par le VIH.

*résultats non publiés.



BIBLIOGRAPHIE



Bibliographie

1. Gottlieb M., Schroff R., Schanker H.M., Weisman J.D., Fan P.T., Wolf R.A. and Saxon A. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **1981**, *305*, 1425-1431.
2. Barré-Sinoussi F., Chermann C.J., Rey F., Chamaret S., Gruest J., Dautet C., Axler-Blin C., Brun-Vézinet F., Rouzioux C., Rozenbaum W., Montagnier L. Isolation of T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science* **1983**, *220*, 868-871.
3. Clavel F., Guyard M., Guétard M. S., Montagnier L. and Alizon M. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* **1986**, *324*, 691-695.
4. Glass J.D and Johnson R.T. Human immunodeficiency virus and the brain. *Annu. Rev. Neurosci.* **1996**, *19*, 1-26.
5. Klatzmann D., Champagne E., Chamaret S., Gruest J., Guétard D., Herecend T., Glukmann J.-C., Montagnier L. T-lymphocyte T4 behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **1984**, *312*, 767-768.
6. Gartner S., Markovitz P., Markovitz D.M., Kaplan M.H., Gallo R.C. and Popovic M. The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science* **1986**, *233*, 215-219.
7. William A., O'Brien. and Roger J.P. HIV Infection and Association Diseases, *In: Viral Pathogenesis*. Ed, Neal Nathanson, et al., **1997**, pp 815-843.
8. Lodge R.E., Darlix J.-L et Cohen E.A. L'infection par le VIH: rôle des facteurs viraux. *m/s* **1998**, *14*, 148-154.
9. Peliska J.A. and Benkovic. Mechanism of DNA strand transfer reactions catalysed by HIV-1 reverse transcriptase. *Science* **1992**, *258*, 1112-1118.
10. Roberts J.D., Bebenek K. and Kunkel T.A. The Accuracy of Reverse Transcriptase from HIV-1. *Science* **1988**, *242*, 1171-1173.
11. Brun-Vézinet F. et Descamps D. Médicaments antiviraux. *La revue du praticien (Paris)* **1997**, *47*, 631-638.



12. a) Aubertin A.-M., Kim A. et Obert G. Les molécules antivirales et leurs cibles, dans *Pharmacologie Moléculaire. Mécanisme d'action des médiateurs et des médicaments*. Ed, Landry Y. et Gies J.-P., 1993, pp 673-691.
- b) Goldgur Y., Craigie R., Cohen G.H., Fujiwara T., Yoshinaga T., Fujishita T., Sugimoto H., Endo T., Murai H. and Davies D.R. Rstructure of the HIV-1 integrase catalytic domain complexed with an inhibitor: A platform for antiviral drug design. *PNAS* 1999, 96, 13040-13043.
13. De Clercq E. Antiviral Therapy for Human Immunodeficiency Virus Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995, 8, 200-239.
14. Dormont J., Brun-Vézinet F., Yéni P. et Aboulker J.P. Les antirétroviraux. *Médecine thérapeutique* 1996, 2, 127-137.
15. Bean B. Antiviral therapy: current concepts and practices. *Clin. Microbiol. Rev.* 1992, 5, 146-182.
16. Winslow D.L. and Otto M. T. HIV protease inhibitors. *AIDS* 1995, 9 (suppl. A), S183-S192.
17. Mitsuya H., Weinhold K.J., Furman P.A., St Clair M.H., Nusinoff-Lehrman S., Gallo R.C., Bolognesi D., Barry D.W., Broder S. 3'-azido-3'-deoxythymidine (BWA509U): An antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/ Lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 1985, 82, 7096-7100.
18. Arts E.J. and Wainberg M.A. Mechanims of nucleoside analog antiviral activity and resistance during Human Immunodeficiency Virus reverse transcription. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996, 40, 527-540.
19. Groothuis D.R. and Livy R.M. The entry of antiviral and antiretroviral drugs into the central nervous system. *J. Neurovirol.* 1997, 3(6), 387-400.
20. Benveniste J., Henson P.M. and Cochrane C.G. Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils and a platelet-activating factor. *J. Exp. Med.* 1972, 136, 1356-1377.
21. Demopoulos C.A., Pinckard R.N. and Hanahan D.J. Platelet Activating Factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-O-acetyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine as the active

- component (a new class of lipid chemical mediator). *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 9355-9358.
22. Benveniste J., Tencé M., Varenne P., Bidault J., Boulet C. and Polonsky J. Semi-synthesis and proposed structure of Platelet Activating Factor (PAF): PAF-acether an alkyl ether analog of lysophosphatidylcholine. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **1979**, *289*, 1037-1040.
23. Godfroid J.-J., Heymans F., Michel E., Redeuilh C., Steiner E. and Benveniste J. Platelet Activating Factor (PAF-acether): total synthesis of 1-O-alkyl-2-O-acetyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine. *FEBS Lett.* **1980**, *116*, 161-164.
24. Heymans F., Michel E., Borrel M.-C., Wichrowski B. et Godfroid J.-J. Nouvelle synthèse totale du PAF-acéther et de son énantiomère. *C.R. Acad. Sci. (Paris)* **1981**, *293*, 49-52.
25. Heymans F., Michel E., Borrel M.-C., Wichrowski B., Godfroid J.-J., Convert O., Coëffier E., Tencé M. and Benveniste J. New total synthesis and high resolution ^1H NMR spectrum of Platelet Activating Factor, its enantiomer and racemic mixture. *Biochem. Biophys. Acta* **1981**, *666*, 230-237.
26. New Horizons in Platelet Activating Factor Research. Ed. Winslow C.M. and Lee M.L. **1987**, John Wiley et sons.
27. Chap H. Mécanismes de sécrétion et agrégation plaquettaires, dans *Pharmacologie Moléculaire. Mécanisme d'action des médiateurs et des médicaments*. Ed, Landry Y. et Gies J.-P., **1993**, pp 521-541.
28. Benveniste J. Platelet-Activating Factor Paf-acether. *Encyclopedia of Human Biology* **1991**, *6*, 43-52.
29. Valone F.H., Platelet-Activating Factor binding to specific cell membrane receptors. In *Platelet Activating factor and Related Lipid Mediators*. Ed Snyder. F. Plenum Press, New York. **1987**, pp 137-151.
30. Braquet P. and Godfroid J.-J. PAF-acether specific binding sites. 2. Design of specific antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* **1986**, *7*, 397-403.
31. Braquet P. and Godfroid J.-J. Conformational properties of the PAF-acether receptor on platelets based structure-activity studies. In *Platelet Activating factor*

- and Related Lipid Mediators. Ed Snyder. F. Plenum Press, New York. 1987, pp 191-235.
32. Wykle R.L, Miller C.H., Lewis J.C., Schmitt J.D., Surles J.R., Piantadosi C. and O'Flaherty J.T. Stereospecific activity of 1-O-alkyl-2-O-acetyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine and comparison of analogs in the degranulation of platelets and neurophils. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1981, 100, 1651-1658.
33. Valone F.H., Coles E., Reinhold V.R. and Goetzl E.J. Specific binding of phospholipid PAF by human platelets. *J. Immunol.* 1982, 129, 1637-1641.
34. Terashita Z., Tsushima S., Yoshioka Y., Nomura H., Inada Y. and Nishikawa K. CV 3988, a specific antagonist of PAF. *Life Sci.* 1983, 32, 1975-1982.
35. Miyamoto T., Ohno H., Yano T., Okada., Hamanaka N. and Kawasaki A. ONO-6240: A new potent antagonist of PAF. *In Advances in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research.* Ed Hayaishi O. and Yamamoto S., Raven Press, New York. 1985, 15, 719-720.
36. Barner R., Hadvary P., Burri K., Hirth G., Cassal J.M. and Muller K. Glycerin derivatives. *Eur. Patent 147768*, 10-07-1985, pp 41.
37. Saunders R., Anderson R., Handley D., Houlihan W., Lee M., Tomesh J. and Winslow C. Biological activity of SRI 63-072, *In Proceedings of the Second Int. Conference on PAF, (Gatlinburg) TN*, Oct, 26-29, 1986, P. 33.
38. Braquet P. The Ginkgolides: Potent PAF antagonists isolated from *Gingko biloba* L. Chemistry, pharmacology and chemical applications. *Drugs of the Future* 1987, 12, 643-699.
39. Shen T.Y., Hwang S.B., Chang M.N., Doebber T.W., Lam M.H., Wu M.S., Wang X., Han G.Q. and Li R.Z. Characterization of platelet activating factor receptor antagonist isolated from haifenteng: specific inhibition of vitro and vivo platelet-activating factor induced effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985, 82, 672-676.
40. Biftu T., Gamble N.F., Doebber T., Hwang S.B., Sheb T.Y., Snyder J., Springler J.P. and Stevenson R. Conformation and activity of tetrahydrofuran lignans and analogues as specific PAF antagonists. *J. Med. Chem.* 1986, 29, 1917-1921.
41. Lee M.L., Wilson C.M., Anderson R.C., Jaeggi C., D'aries F., Frisch G., Farley C., Melden M.K., Handley D.A. and Saunders R.N. *Prostaglandins* 1985, 30, 690.

42. Casals-Stenzel J., Muacevic G. and Weber K.H. Pharmacological actions of WEB 2086, a new specific antagonist of platelet activating factor. *J Pharmacol Exp Ther* **1987**, *241*, 974-981.
43. Dive G., Godfroid J.-J., Lamotte-Brasseur J., Batt J.-P., Heymans F., Dupont L. and Braquet P. PAF-receptor. I. « Cache-Oreilles » effect of selected high potency platelet-activating factor (PAF) antagonists. *J. Lip. Med.* **1989**, *1*, 201-215.
44. Godfroid J.-J., Dive G., Lamotte-Brasseur J., Batt J.-P. and Heymans F. PAF receptor structure: A Hypothesis. *Lipids* **1991**, *26*, 1162-1166.
45. Batt J.-P., Lamouri A., Tavet F., Heymans F., Dive G. and Godfroid J.-J. New hypothesis on the conformation of the PAF-receptor from studies on geometry of selected platelet-activating factor antagonists. *J. Lip. Med.* **1991**, *4*, 343-346.
46. Lamouri A., Heymans F., Tavet F., Dive G., Batt J.-P., Blavet N., Braquet, P. and Godfroid J.-J. Design and modeling of new Platelet-Activating Factor antagonists. 1. Synthesis and biological activity of 1,4-bis-(3',4',5'-trimethoxybenzoyl)-2-[[[(substituted carbonyl and carbamoyl)oxy]methyl] piperazines. *J. Med. Chem* **1993**, *36*, 990-1000.
47. Heymans F., Lamouri A., Batt J.-P., Dive G. and Godfroid J.-J. Design and modelling of new PAF antagonists: 1,4-bis-(3',4',5'-trimethoxybenzoyl)-2-substituted carbonyloxymethyl piperazines. *J. Lip. Med.* **1991**, *10*, 153-154.
48. Tavet F., Lamouri A., Heymans F., Dive G., Touboul E., Blavet N. and Godfroid J.-J. Design and modelling of new Platelet-Activating Factor antagonists. 2. Synthesis and biological activity of 1,4-bis-(3',4',5'-trimethoxybenzoyl)-2-alkyl and 2-alkyloxymethylpiperazines. *J. Lip. Med.* **1996**, *15*, 145-159.
49. Wahl L.M., Corcoran M.L., Pyle S.W., Arthur L.O., Harel-Bellan A., Farrar W.I.. Human Immunodeficiency Virus Glycoprotein (gp120) Induction of Monocyte Arachidonic Acid Metabolites and Interleukines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 621-625.
50. Perry S.W., Hamilton J.A., Tjoelker L.W., Dbaiho G., Dzenko K.A., Epstein L.G., Hannun Y., Whittaker J.S., Dewhurst S. and Gelbard H.A. Platelet-activating factor receptor activation, an Initial Step in HIV-1 Neuropathogenesis. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 17660-17664.

51. Kolson D.L., Lavi E. and Gonzalez-Scarano F. The Effects of Human Immunodeficiency Virus in the the Central Nervous System. *Adv. Virus Res.* **1998**, *50*, 1-47.
52. Gelbard H.A., Nottet H.S., Swindells S., Jett M., Dzenko K.A., Genis P., White R., Wang L., Choi Y.B., Zhang D., Lipton S.A., Tourtellotte W.W., Epstein L.G., and Gendelman H.E. Platelet-activating Factor: a Candidate Human Immunodeficiency Virus Type 1-Induced Neurotoxin. *J. Virol.* **1994**, *68*, 4628-4635.
53. Dagenais P., Thivierge M., Parent J.-L., Stankova J. and Rola-Pleszczynski M. Augmented Expression of Platelet-Activating Factor Receptor Gene by TNF-alpha through Transcriptional Activation in Human Monocytes. *J. Leukocyte Biol.* **1997**, *61*, 106-112.
54. Rosa-Pleszczynski M. Priming of human monocytes with PAF augments their production of tumor necrosis factor. *J. Lip. Med.* **1990**, *2*, S77-S82.
55. Howard A.D. and Erickson L.K. The Induction and Augmentation of Macrophage Tumoricidal Responses by Platelet-Activating Factor. *Cell. Immunol.* **1995**, *164*, 105-112.
56. Enting H.E., Hoetelmans R.M.W., Lange J.M.A., Burger D.M., Beijnen J.H. and Portegies P. Antiretroviral Drugs and the Central Nervous System. *AIDS* **1998**, *12*, 1941-1955.
57. Weissman D., Poli G., Bousseau A., and Fauci A.-S. A Platelet-Activating Factor Antagonist, RP5577, Inhibits Cytokine-Dependent Induction of Human Immunodeficiency Virus Expression in Chronically Infection Promonocytic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 2537-2541.
58. Le Naour R., Clayette P., Henin Y., Mabondzo A., Raoul H., Beusseau A. and Dormont D. Infection of Human Macrophages with an Endogenous Tumour Necrosis Facteur-Alpha (TNF-Alpha) Independent Human Immunodeficiency Virus Type-1 Isolate is Unresponsive to the TNF-alpha Synthesis Inhibitor RP 55778. *J. Gen. Virol.* **1994**, *75*, 1379-1388.
59. Sedivy P., Caillard C.G., Floch A., Folliard F., Mondot S., Robaut C. and Terlain B. 48740 RP, a Specific PAF-Acether Antagonist. *Prostaglandins* **1985**, *30*, 688.

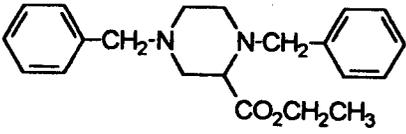
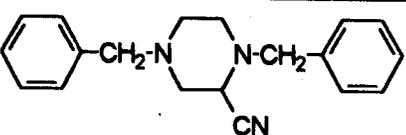
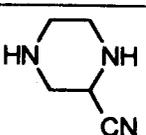
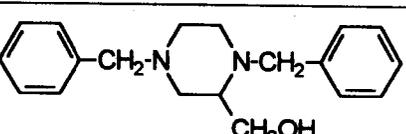
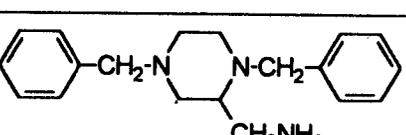
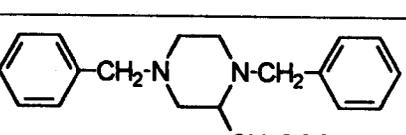
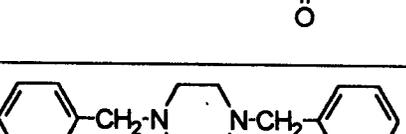
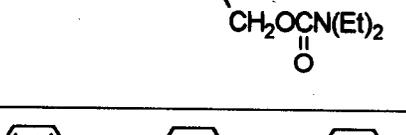
60. Floch A., Bousseau A., Hetier E., Floch F., Bost P.-E. and Cavero I. RP 55778, a PAF Receptor Antagonist, Prevents and Reverses LPS-Induced Hemoconcentration and TNF Release. *J. Lip. Med.* **1989**, *1*, 349-360.
61. Johnson C.D. Platelet-Activating Factor and Platelet-Activating Factor Antagonists in Acute Pancreatitis. *Dig. Surg.* **1999**, *16*, 93-101.
62. Schifitto G., Sacktor N., Marder K., McDermott M.P., McArthur J.C., Kieburtz K., Small S. and Epstein L.G. Randomized Trial of the Platelet-Activating Factor Antagonist Lexipafant in HIV-associated Cognitive Impairment. Neurological AIDS Research Consortium. *Neurology* **1999**, *53*, 391-396.
63. Lamotte-Brasseur J. Heymans F., Dive G., Lamouri A., Redeuilh C. Hosford D. Braquet P. and Godfroid J.-J. PAF-receptor and the "Cache-Oreilles" Effect. Simple PAF Antagonists. *Lipids* **1991**, *26*, 1167-1171.
64. Rekker R.F. and De Kort H.M. The Hydrophobic Fragmental Constant, an Extension to a 1000 Data Point Set. *Eur. J. Med. Chem.* **1979**, *14*, 479-488.
65. Heymans F., Dive G., Lamouri A., Bellashene T., Touboul E., Huet J., Tavet F., Redeuilh C. and Godfroid J.-J. Design and modeling of new Platelet-Activating Factor antagonists. 3. Relative importance of hydrophobicity and electronic distribution in piperazinic series. *J. Lipid Mediators Cell Signalling* **1996**, *15*, 161-173.
66. Benbrook D.M., Subramanian S., Gale J.B., Liu S., Brown C.W., Boehm M.F. and Berlin K.D. Synthesis and Characterisation of Heteroarotinoids Demonstrate Structure Specificity Relationships. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3753-3757.
67. Serradji N., Bensaid O., Martin M., Kan E., Dereuddre-Bosquet N., Redeuilh N., Huet J., Heymans F., Lamouri A., Clayette P., Dong C.-Z., Dormont D. and Godfroid J.-J. Structure-Activity Relationships in Platelet-Activating Factor (PAF). 10. From PAF Antagonism to Inhibition of HIV-1 Replication. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2149-2154.
68. Martin M., Serradji N., Dereuddre-Bosquet N., Bensaid O., Fichet G., Lamouri A., Heymans F., Clayette P., Godfroid J.-J. et Dormont D. Propriétés antirétrovirales et anti-inflammatoires d'un nouvel antagoniste du facteur d'activation des plaquettes, la PMS-601. *Pathol Biol* **2000**, *48*, 513-519.

69. Bensaid O., Serradji N., Martin M., Heymans F., Clayette P. et Godfroid J.-J. Derivés de la Pipérazine a Double Activité: Antagonistes du Platelet Activating Factors et Inhibiteur de la Réplication du VIH-1. *6^{ème} Journée des Jeunes Chercheurs, Société de Chimie Thérapeutique* 1999, Paris, Institut Curie, 15 Janvier.
70. Heymans F., Serradji N., Bensaid O., Martin M., Dereuddre-Bosquet N., Redeuilh N., Huet J., Clayette P., Lamouri A., Dong C.-Z, Dormont D. and Godfroid J.-J. PAF-antagonists with anti-HIV-1 activity. *Mediators of Inflammation* 1999, 8, suppl, Abstracts of the 4th world Congress on Inflammation, Palais des Congrès, Paris, S129.
71. Serradji N., Bensaid O., Martin M., Heymans F., Dereuddre-Bosquet N., Redeuilh N., Huet J., Clayette P., Lamouri A., Dong C.-Z, Dormont D. and Godfroid J.-J. Antagonistes du PAF à Activité Anti-VIH. *Journées Franco-Espagnoles de Chimie Organique (JFECCO)* 2000, Meze (France), 4-9 Juin.
72. Serradji N., Bensaid O., Martin M., Heymans F., Dereuddre-Bosquet N., Redeuilh N., Huet J., Clayette P., Lamouri A., Dong C.-Z, Dormont D. and Godfroid J.-J. Antagonistes du PAF a Activité Anti-VIII. *Quatorzièmes Journées Franco-Belges de Pharmacochimie*, 2000, Lille (France), 25-26 Mai.
73. Martin M., Serradji N., Dereuddre-Bosquet N., Bensaid O., Lamouri A., Heymans F., Clayette P., Godfroid J.-J et Dormont D. Propriétés antivirales et anti-inflammatoires d'un nouvel antagoniste du PAF, le PMS 601. *19^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse (RICAI)* 1999, Paris, 2-3 décembre.
74. Martin M., Serradji N., Dereuddre-Bosquet N., Bensaid O., Lamouri A., Heymans F., Clayette P., Godfroid J.-J et Dormont D. Propriétés antivirales et anti-inflammatoires d'un nouvel antagoniste du PAF, le PMS 601. *4th European Conference on Experimental AIDS Research (ECEAR)* 1999, Tampere, Finlande, 18-21 June.
75. Jucker E. und Rissi E. Uber C-substituierte piperazinderivate. *Helvetica Chimica Acta* 1962, 45 Fasc. 7, N° 272-273, 2383-2402.

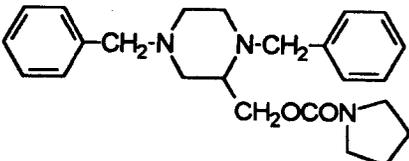
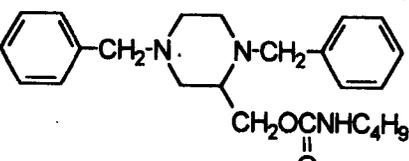
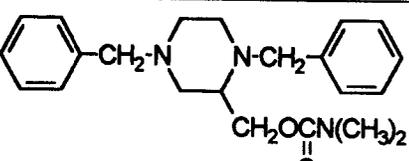
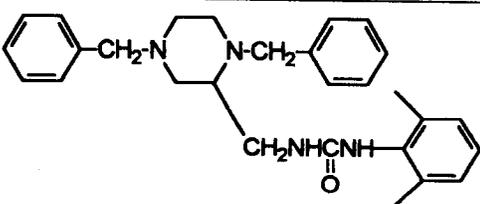
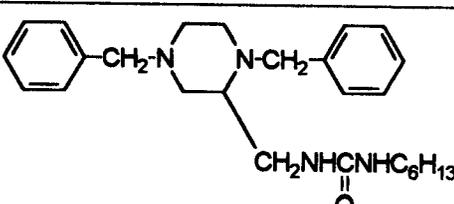
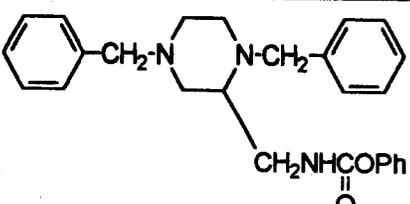
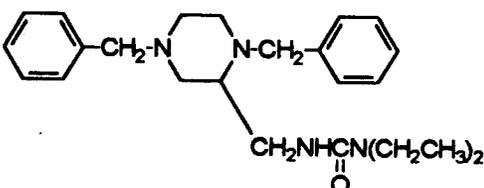
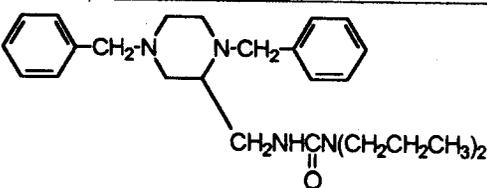
76. Lamouri A. Antagonistes du PAF dérivés de la pipérazine synthèse, Pharmacotoxicologie et structure activité. *Doctorat. Université Paris VII.* 12.10.1990.
77. Augustin R.L. Reduction Techniques and Applications in Organic Synthesis Departement of University seton hall University south orange, New Jersey. Marcel Dekker, Inc., New York. 1968, pp 59-74.
78. Nystrom R.F. Reduction of organic compounds by mixed hydrides. III. 3-bromopropionic acid, 3-bromopropionyl chloloride, methyl 3-bromopropionate and halides. *J. Am. Chem. Soc.* 1959,81, 610-613.
79. Ladenbarg A. Ueber die Imine. *Ber* 1885, 18, 2956-2961.
80. Allen C.F.H. and Bell A. Undercyl Isocyanate. *Org. Syn. Coll.* 1955, 3, 846-847.
81. Ninomiya K., Shiori T. and Yamada S. Phosphorus in organic synthesis-VII. Diphenyl phosphorazidate (DPPA). A new convenient reagent for a modified Curtius reaction. *Tetrahedron.* 1974, 30, 2151-2157.
82. Takatani M., Yoshioka Y., Tasala A., Terashita Z., Imura Y., Nishikawa K. and Tasushima S. Platelet Activating Factor Antagonists: Synthesis and Structure-Activity Studies of Novel PAF Analogues Modified in the phosphorylcholine Moiety. *J. Med. Chem.* 1989, 32, 56-64.
83. Castro J.L, Broughton H.B, Russell M.G.N, Rathbone D, Watt A.P, Ball R.G, Chapman K.L, Patel S, Marshall G.R and Matassa V.G. 5-(Piperidin-2-yl)-and 5-(Homopiperidin-2-yl)-1,4-benzodiazepine: High-Affinity, Basic Ligands for the Cholecystokinin-B Receptor. *J. Med. Chem.* 1977, 40, 2491-2501.
84. Reinecke M. G and Daubert R. G. Peripheral synthesis of secondary medium ring nitrogen heterocycles. *J. Org. Chem.* 1973, 38, 3281-3287.
85. Applegate H.E., Cimarasti C.M., Dolfini J.E. Funke P.T., Koster W.H., Puar M.S., Slusarchyk W.A. and Young M.G. Synthesis of 2-,4- and 7-methylthio-substituted cephalosporins. *J. Org. Chem.* 1979, 44, 811-818.
86. John Wiley and Sons, protective groups in organic synthesis. Theodora W. Greene Havard University. A Wily-Interscience Publication. New. York, Chichester. Brisban. Toronko. 1981, pp. 218-287.

87. Perrone R. Berardj F. Colabafo L.M. and Tortorella V.J. N-[2-[4-(4-Chlorophenyl)piperazin-1-yl]ethyl]-3-methoxybenzamide: A Potent and Selective Dopamine D4 Ligand. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4903-4909.
88. Sheibye S. Pedersen B.S. and Lawesson S.O. Studies on organophosphorus compounds XXI. The dimer of p-methylphenylthionophosphine sulfide as thiation reagent. A new route to thiocarbonylamides. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1978**, *87*, 229-238.
89. Cazenave J.-P., Benveniste J. and Mustard J.F. Aggregation of Rabbit Platelets by Platelet-Activating Factor Is Independent of the Release Reaction and the Inhibited by Membrane-Active Drugs. *Lab. Invest.* **1979**, *41*, 275-285.
90. Chou T.C. and Talalay P. Quantitative analyse of a dose-effect relationships: the combined effect of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enz. Reg.* **1984**, *22*, 27-55.
91. Clayette P., Dereuddre-Bosquet N., Martin M., Serradji N., Fretier P. and Dormont D. Effects of RP 55778, a Tumor Necrosis Factor Alpha Synthesis Inhibitor, on Antiviral Activity of Dideoxynucleosides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1997**, *41*, 875-877.

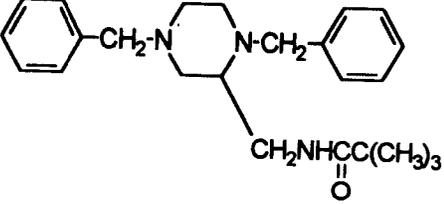
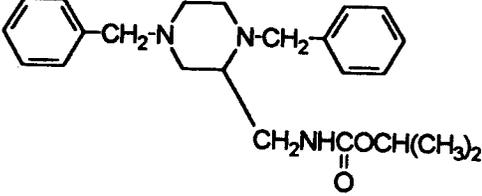
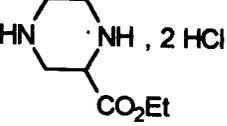
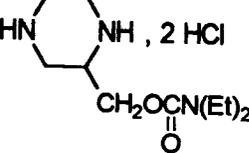
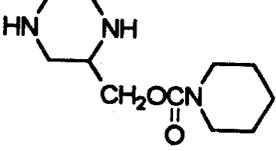
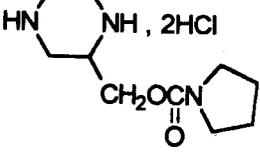
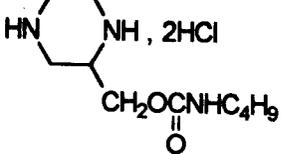
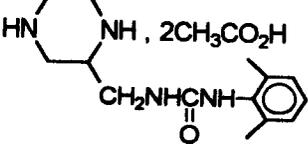
Structure et nomenclature des Produits 1 à 60

N°	Structure	Nomenclature
<u>1</u>		1,4-dibenzyl-2-(éthoxycarbonyl)pipérazine
<u>2</u>		1,4-dibenzyl-2-cyanopipérazine
<u>3</u>		2-cyanopipérazine
<u>4</u>		1,4-dibenzyl-2-(hydroxyméthyl)pipérazine
<u>5</u>		1,4-dibenzyl-2-(aminométhyl)pipérazine
<u>6</u>		1,4-dibenzyl-2-(phénoxy-carbonyloxyméthyl)pipérazine
<u>7</u>		1,4-dibenzyl-2-(N,N-diéthylaminocarbonyloxyméthyl)pipérazine
<u>8</u>		1,4-dibenzyl-(piperidinocarbonyloxyméthyl)pipérazine

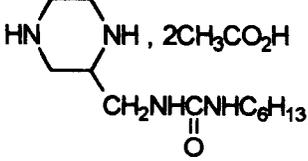
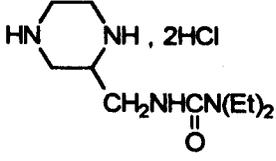
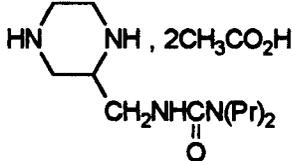
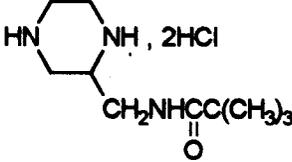
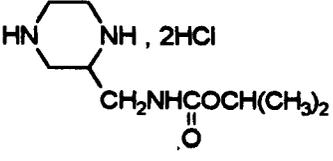
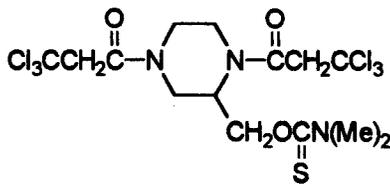
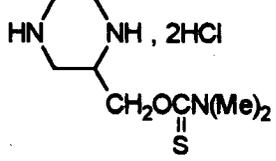
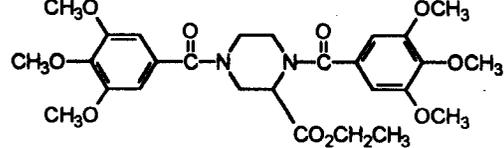


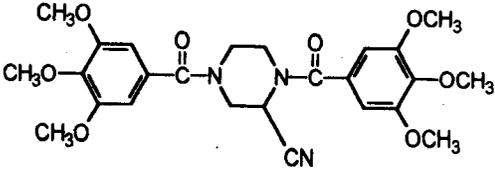
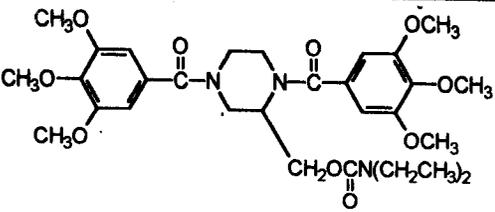
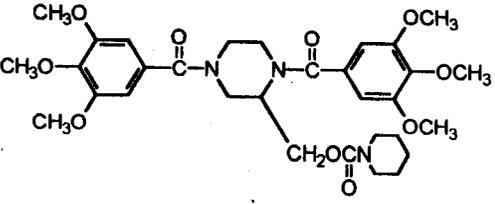
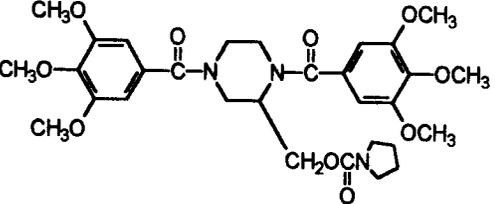
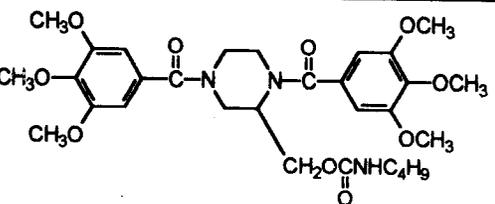
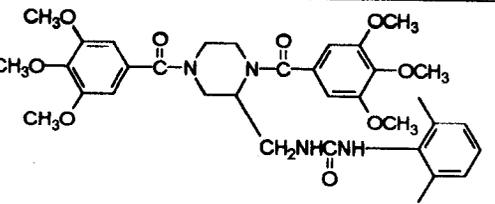
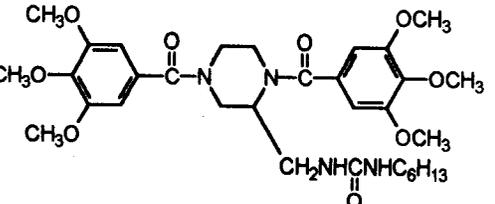
9		<p>1,4-dibenzyl-2-(pyrrolidinocarbonyloxyméthyl) pipérazine</p>
10		<p>1,4-dibenzyl-2-(N-butylcarbamoyloxyméthyl) pipérazine</p>
11		<p>1,4-dibenzyl-2-(N,N-diméthylthiocarbamoyloxyméthyl) pipérazine</p>
12		<p>1,4-dibenzyl-2-(N-2,6-diméthylphényluréidométhyl) pipérazine</p>
13		<p>1,4-dibenzyl-2-(N-hexyluréidométhyl) pipérazine</p>
14		<p>1,4-dibenzyl-2-(phénoxy-carbonylaminométhyl) pipérazine</p>
15		<p>1,4-dibenzyl-2-(N,N-diéthyluréidométhyl) pipérazine</p>
16		<p>1,4-dibenzyl-2-(N,N-dipropyluréidométhyl) pipérazine</p>



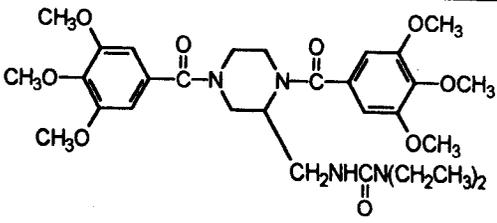
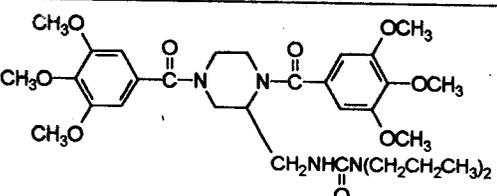
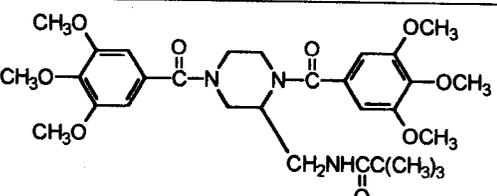
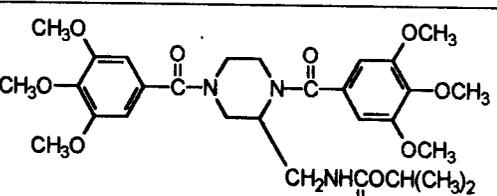
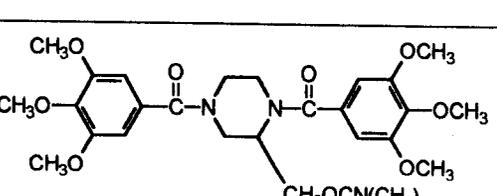
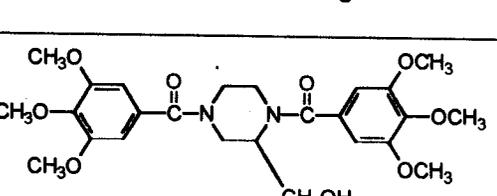
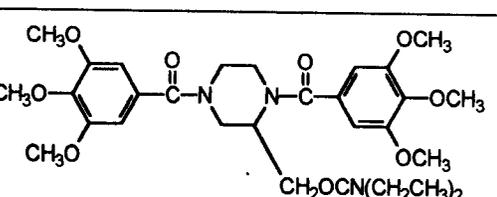
<u>17</u>		<p align="center">1,4-dibenzyl-2-(2,2-diméthylpropionamidométhyl) pipérazine</p>
<u>18</u>		<p align="center">1,4-dibenzyl-2-(isopropoxyloxycarbonylamino) pipérazine</p>
<u>19</u>		<p align="center">Chlorhydrate de la 2-éthoxycarboxyl pipérazine</p>
<u>20</u>		<p align="center">Chlorhydrate de la 2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl) pipérazine</p>
<u>21</u>		<p align="center">2-(pipéridinocarbonyloxyméthyl) pipérazine</p>
<u>22</u>		<p align="center">Chlorhydrate de la 2-(pyrrolidinocarbonyloxyméthyl) pipérazine</p>
<u>23</u>		<p align="center">Chlorhydrate de la 2-(N-butylcarbamoyloxyméthyl) pipérazine</p>
<u>24</u>		<p align="center">Diacétate de la 2-(N-2,6-diméthylphényluréidométhyl) pipérazine</p>



<u>25</u>		<p>diacétate de la 2-(N-hexyluréidométhyl) pipérazine</p>
<u>26</u>		<p>Chlorhydrate de la 2-(N,N-diéthyluréidométhyl) pipérazine</p>
<u>27</u>		<p>Diacétate de la 2-(N,N-dipropyluréidométhyl) pipérazine</p>
<u>28</u>		<p>Chlorhydrate de la 2-(2,2-diméthylpropionamidométhyl) pipérazine</p>
<u>29</u>		<p>Chlorhydrate de la 2-(isopropoxyloxycarbonylaminométhyl) pipérazine</p>
<u>30</u>		<p>1,4-di-(3,3,3-trichloropropionyl)-2-(N,N-diméthylthiocarbamoyloxyméthyl) pipérazine</p>
<u>31</u>		<p>Chlorhydrate de la 2-(N,N-diméthylthiocarbamoyloxyméthyl) pipérazine</p>
<u>32</u>		<p>2-(éthoxycarbonyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl) pipérazine</p>

33		2-cyano-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine
34		2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine PMS 601
35		2-(pipéridinocarbonyloxyméthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine
36		2-(pyrrolidinocarbonyloxyméthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine
37		2-(N-butylcarbamoyloxyméthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine
38		2-(N-2,6-diméthylphényluréidométhyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine
39		2-(N-hexyluréidométhyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine

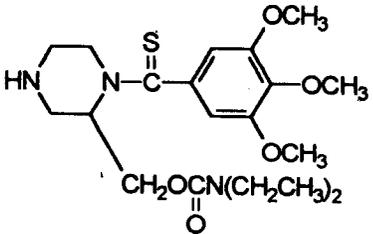
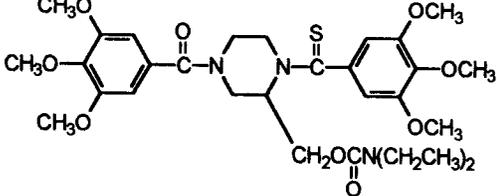
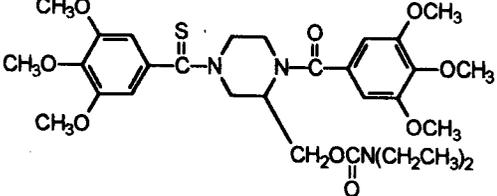
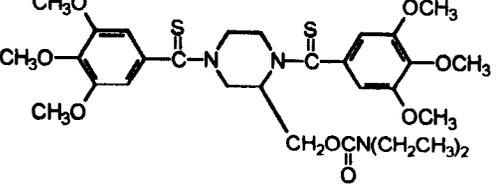
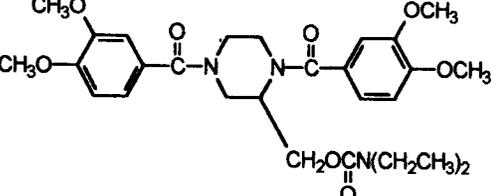
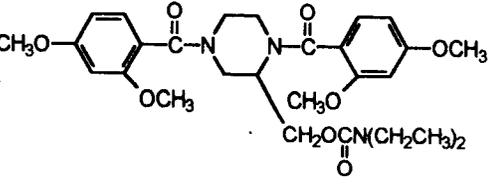
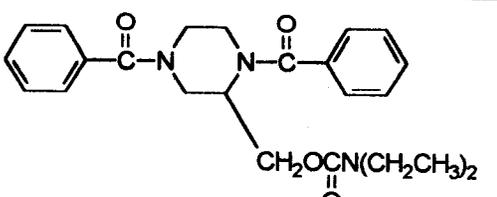


40		2-(N,N-diéthyluréidométhyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl) pipérazine
41		2-(N,N-dipropyluréidométhyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl) pipérazine
42		2-(2,2-diméthylpropionamidométhyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl) pipérazine
43		2-(isopropoxy-carbonylaminométhyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl) pipérazine
44		2-(N,N-diméthylthiocarbamoyloxy-méthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl) pipérazine
45		2-(hydroxyméthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl) pipérazine
46		2-(N,N-diéthylthiocarbamoyloxy-méthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl) pipérazine



47		2-(propanoyloxyméthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine
48		2-(phénoxy-carbonyloxyméthyl)-1,4-di-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine
49		3-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine
50		3-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1-triphénylméthylpipérazine
51		2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)-4-triphénylméthylpipérazine
52		2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine
53		3-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1-(3,4,5-triméthoxythiobenzoyl)pipérazine

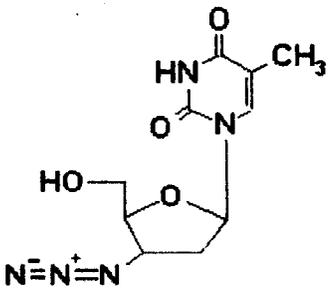


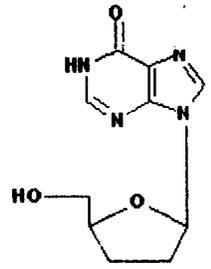
54		2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1-(3,4,5-triméthoxythiobenzoyl)pipérazine
55		2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-4-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)-1-(3,4,5-triméthoxythiobenzoyl)pipérazine
56		2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-4-(3,4,5-triméthoxythiobenzoyl)-1-(3,4,5-triméthoxybenzoyl)pipérazine
57		2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1,4-(3,4,5-triméthoxythiobenzoyl)pipérazine
58		2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1,4-(3,4-diméthoxybenzoyl)pipérazine
59		2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1,4-di-(2,4-diméthoxybenzoyl)pipérazine
60		2-(N,N-diéthylcarbamoyloxyméthyl)-1,4-dibenzoylpipérazine

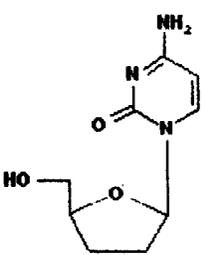


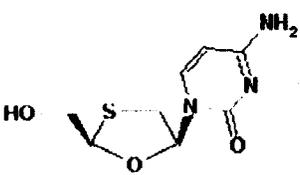
SUBSTANCES ANTI-SIDA COURANTES ACTUELLEMENT DISPONIBLES.

I. INHIBITEURS NUCLEOSIDIQUES DE LA TRANSCRIPTASE INVERSE.

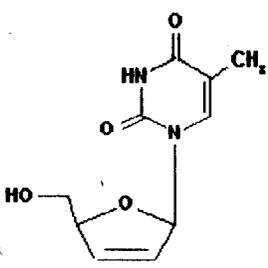
	
MW 287.24	
NAME	3'-Azido-3'-deoxythymidine
SYN	AZT; Azidothymidine; Zidovudine; Retrovir; ZDV
COMP	GLAXO WELLCOME

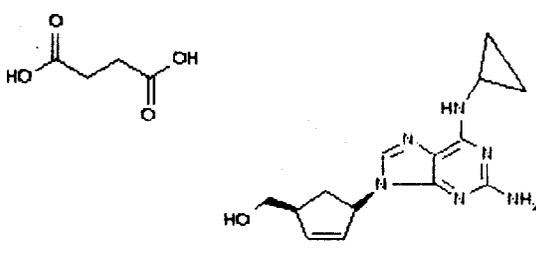
	
MW 238.23	
NAME	2',3'-Dideoxyinosine
SYN	DDI; D2; ddIno; Dideozine; Videx
COMP	BRISTOL-MYERS SQUIBB

	
MW 211.22	
NAME	2',3'-Dideoxycytidine
SYN	ddC; ddCyd; D2C; Zalcitabine; Hivid
COMP	HOFFMAN-LA ROCHE

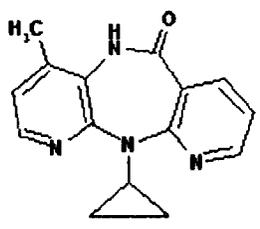
	
MW 229.26	
NAME	cis-1-[2'-Hydroxymethyl-5'-(1,3-oxathiolanyl)] cytosine
SYN	(-)-BCH-189; DTHC; 3TC; Lamivudine; Epivir; L-(-)-S-ddC
COMP	IAF BIOCHEM INT/GLAXO WELLCOME

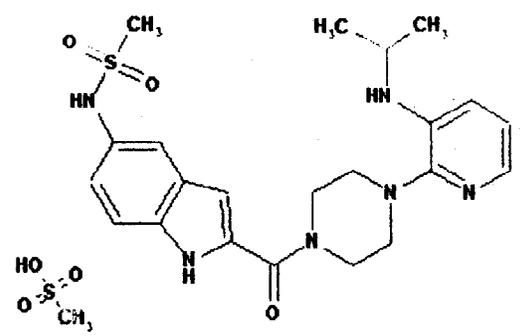


	
MW	
NAME	Thymidine, 2',3'-dideohydro-,3'-deoxy-
SYN	D4T; ddeThd; ddeTyt; DHT; Stavudine; Zerit
COMP	BRISTOL-MYERS SQUIBB

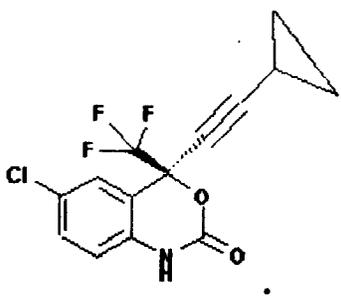
	
MW 484.42	
NAME	Butenedioic acid, compd. with (1S-cis)-4-[2-amino-6-(cyclopropylamino)-9H-purine-9-yl]-2-cyclopentene-1-methanol (1:1)
SYN	Abacavir ; 1592U89 succinate; Ziagen
COMP	GLAXO WELLCOME

II. INHIBITEURS NON NUCLEOSIDIQUES DE LA TRANSCRIPTASE INVERSE.

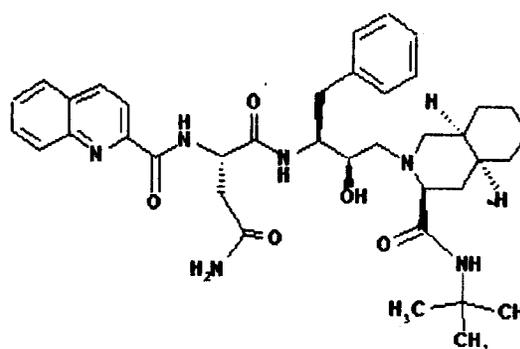
	
MW 288.31	
NAME	H11-Cyclopropyl-4-methyl-5,11-dihydro-6H-di-pyrido[3,2-b:2',3'-e]-[1,4]diazepin-6-one
SYN	BI-RG-587; Nevirapine; Viremune
COMP	BOEHRINGER INGELHEIM (ROXANE)

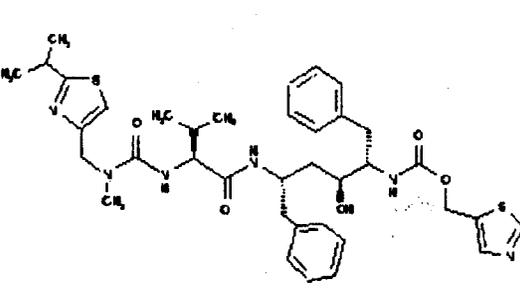
	
MW 552.68	
NAME	1-(5-Methanesulfonyl-2-methyl-1H-indol-2-yl-carbonyl)-4-[3-(isopropylamino)-2-pyridinyl]piperazine
SYN	Deleavidine; Rescriptor; BHAP der; U80152S;
COMP	PHARMACIA UPJOHN



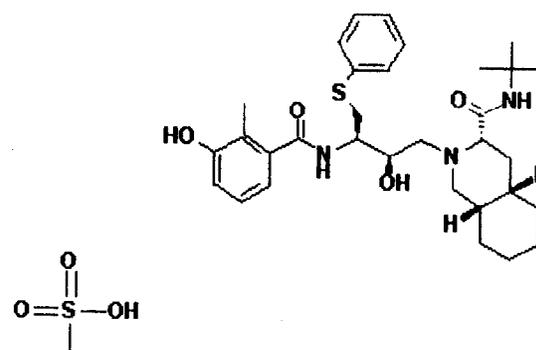
	
MW 315.69	
NAME	(-)-6-Chloro-4-cyclopropylethynyl-4-trifluoromethyl-1,4-dihydro-2H-3,1-benzoxazin-one
SYN	Sustiva; Efavirenz; DMP-266; L-743,726
COMP	DUPONT MERCK

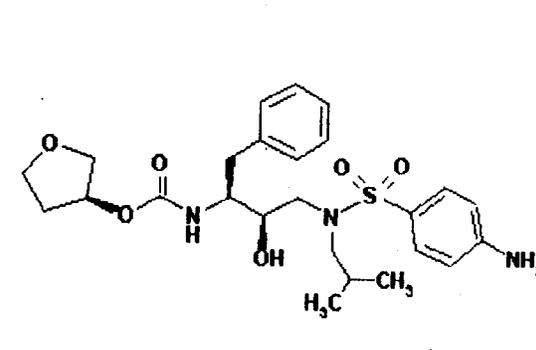
III. INHIBITEURS DE LE PROTEASE

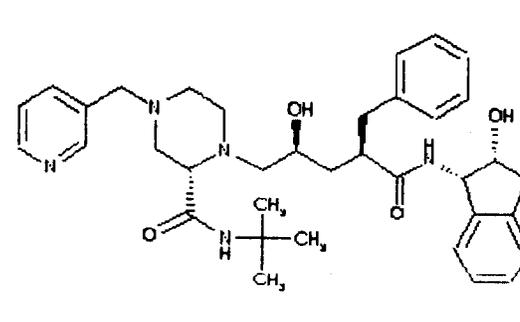
	
MW 678.85	
NAME	Butenediimide, N1-[(1S,2R)-3-[(3S,4aS,8aS)-3-[[[(1,1-dimethyltetrahyloamino)carbonyl]octahydro-2(1H)-isoquinolinyl]-2-hydroxy-1-(phenylmethyl)propyl]-2-[(2-quinolinyl)carbonyl]amino]-, (2S)].
SYN	Ro 31-8959; Saquinavir; Invirase; Fortovase; Ro 318959
COMP	ROCHE

	
MW 720.96	
NAME	2,4,7,12-Tetrazatridecan-13-oic acid, 10-hydroxy-2-methyl-5-(1-methylethyl)-1-[2-(1-methylethyl)-4-thiazolyl]-3,6-dioxo-8,11-bis(p-phenylmethyl)-, 6-thiazolylmethyl ester, [5S-(5R',8R',10R',11R')].
SYN	ABT-538; A 84638; Norvir; Ritonavir
COMP	ABBOTT



	
MW 663.90	
NAME	[(3S-(3R',4aR',8aR',2'S',3'S'))-2-[2'-hydroxy-3'-phenylthiomethyl-4'-aza-5'-oxo-5'-(2''-methyl-3''-hydroxy-phenyl)pentyl]-decalhydroisoquinoline-3-N-1-butylcarboxamide methanesulfonic acid)
SYN	AG1343; Viracept; Nelfinavir
COMP	AGOURON /JAPAN TOBACCO

	
MW 605.63	
NAME	Carbamic acid, (3-(((4-aminophenyl)sulfonyl)(2-methylpropyl)amino)-2-hydroxy-1-(phenylmethyl)propyl)-, tetrahydro-3-furanyl ester, (3S-(3R'(1S',2R')))-
SYN	Agenerase; Amprenavir; VX-478; 141W94;
COMP	VERTEX/KISSEI/GLAXO WELLCOME

	
MW 613.81	
NAME	4-Hydroxy-N-(2-hydroxy-2,3-dihydro-1H-1-indenyl)-N'-(1,1-dimethylethyl)-2-phenylmethyl-5-[4-(3-pyridylmethyl)-1-piperzyl]hexanodiarnide
SYN	Indinavir; Crécivan; MK-639 L-735,524;
COMP	MERCK



Références.**AZT; Azidothymidine; Retrovir® ZDV; Zidovudine.**

1. MITSUYA, H.; WEINHOLD, K.J.; FURMAN P.A.; ST CLAIR, M.H.; NUSINOFF-LEHRMAN, S.; GALLO R.C.; BOLOGNESI, D.; BARRY, D.W.; BRODER S., 3'-AZIDO-3'-DEOXYTHYMIDINE (BWA509U): AN ANTIVIRAL AGENT THAT INHIBITS THE INFECTIVITY AND CYTOPATHIC EFFECT OF HUMAN T-LYMPHOTROPICVIRUS TYPE III/LYMPHADENOPATHY-ASSOCIATED VIRUS IN VITRO. PROC NATL ACAD SCI USA 82:7096-7100 (1985).
2. LARDER, B.A.; KEMP S.D.; HARRIGAN, P.R., POTENTIAL MECHANISIM FOR SUSTAINED ANTIRETROVIRAL EFFICACY OF AZT-3TC COMBINATION THERAPY. SCIENCE 269:696-699 (1995).

Didanosine; Videx®; Dideoxyinosine; ddI.

1. MITSUYA, H.; BRODER, S., INHIBITION OF THE IN VITRO INFECTIVITY AND CYTOPATHIC EFFECT OF HUMAN T-LYMPHOTROPHIC VIRUS TYPE III/LYMPHADENOPATHY-ASSOCIATED VIRUS (HTLV-III/LAV) BY 2',3'-DIDEOXYNUCLEOSIDES. PROC NATL ACAD SCI USA 83:1911-1915 (1986).
2. SCHINAZI, R.F.; SOMMADOSSI, J.-P.; SAALMANN, V.; CANNON, D.L.; XIE, M.-Y.; HART, G.C.; SMITH, G.A.; HAHN, E.F., ACTIVITIES OF 3'-AZIDO-3'-DEOXYTHYMIDINE NUCLEOTIDE DIMERS IN PRIMARY LYMPHOCYTES INFECTED WITH HIV TYPE 1. ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER 34(6):1061-1067 (1990).

Zalcitabine; Hivid®; Dideoxycytosine; ddC.

1. MITSUYA, H.; BRODER, S., INHIBITION OF THE IN VITRO INFECTIVITY AND CYTOPATHIC EFFECT OF HUMAN T-LYMPHOTROPHIC VIRUS TYPE III/LYMPHADENOPATHY-ASSOCIATED VIRUS (HTLV-III/LAV) BY 2',3'-DIDEOXYNUCLEOSIDES. PROC NATL ACAD SCI USA 83:1911-1915 (1986).
2. CHU, C.K.; SCHINAZI, R.F.; ARNOLD, B.H.; CANNON, D.L.; DOBOSZEWSKI, B.; BHADTI, V.B.; GU, Z., COMPARATIVE ACTIVITY OF 2',3'-SATURATED AND UNSATURATED PYRIMIDINE AND PURINE NUCLEOSIDES AGAINST HIV-1 IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS. BIOCHEM PHARMACOL 37(19):3543-3548 (1988).



Lamivudine; 3TC; Epivir®.

1. COATES, J.A.V.; CAMMACK, N.; JENKINSON, H.J.; MUTTON, I.M.; PEARSON, B.A.; STORER, R.; CAMERON, J.M.; PENN, C.R., THE SEPARATED ENANTIOMERS OF 2'-DEOXY-3'-THIACYTIDINE(BCH 189) BOTH INHIBIT HIV REPLICATION IN VITRO. *ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER* 36(1):202-205 (1992).
2. SCHINAZI, R.F.; LLOYD, R.M.; NGUYEN, M.-N.; CANNON, D.L.; MCMILLAN, A.; ILKSOY, N.; CHU, C.K.; LIOTTA, D.C.; BAZMI, H.Z.; MELLORS, J.W., CHARACTERIZATION OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUSES RESISTANT TO OXATHIOLANE-CYTOSINE NUCLEOSIDES. *ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER* 37(4):875-881 (1993).

Stavudine; Zerit®; D4T.

1. LIN T.-S.; SCHINAZI R.F.; PRUSOFF W.H., POTENT AND SELECTIVE IN-VITRO ACTIVITY OF 3'-DEOXYTHYMIDIN-2'-ENE(3'-DEOXY-2',3'-DIDEHYDROTHYMIDINE) AGAINST HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS. *BIOCHEM PHAR* 36(17):2713-2718 (1987).
2. CHU, C.K.; SCHINAZI, R.F.; ARNOLD, B.H.; CANNON, D.L.; DOBOSZEWSKI, B.; BHADTI, V.B.; GU, Z., COMPARATIVE ACTIVITY OF 2',3'-SATURATED AND UNSATURATED PYRIMIDINE AND PURINE NUCLEOSIDES AGAINST HIV-1 IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS. *BIOCHEM PHARMACOL* 37(19):3543-3548 (1988).

Abacavir; 1592U89 succinate; Ziagen®.

1. DALUGE, S.M.; GOOD S.S.; MARTIN M. T.; TIBBELS S.R.; AND OTHERS, 1592U89 SUCCINATE- A NOVEL CARBOCYCLIC NUCLEOSIDE ANALOGUE WITH POTENT, SELECTIVE ANTI-HIV ACTIVITY. ABSTRACT; INTERSCIENCE CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY (ICAAC) (AIDSLINE 95920688) 1994:7 (1994).
2. FALETTO, M.B.; MILLER, W.H.; GARVEY, E.P.; CLAIR, M.H.S.; DALUGE, S.M.; ET AL., UNIQUE INTRACELLULAR ACTIVATION OF THE POTENT ANTI-HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS AGENT 1592U89. *ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER* 41(5):1099-1107 (1997).



Nevirapine; Viramune®; BI-RG-587.

1. MERLUZZI, V.J.; HARGRAVE, K.D.; LABADIA, M.; GROZINGER, K.; SKOOG, M.; WU, J.C.; SHIH, C.-K.; ECKNER, K.; HATTOX, S.; ADAMS, J.; ROSETHAL, A.S.; FAANES, R.; ECKNER, R.J.; KOUPECEK, R.A.; SULLIVAN, J.L., INHIBITION OF HIV-1 REPLICATION BY A NONNUCLEOSIDE REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITOR. SCIENCE 250:1411-1413 (1990).
2. BALZARINI, J.; PEREZ-PEREZ, M.J.; VELAZQUEZ, S.; SAN-FELIX, A.; CAMARASA, M.J.; DE CLERCQ, E.; KARLSSON, A., SUPPRESSION OF THE BREAKTHROUGH OF HIV-1 IN CELL CULTURE BY THIOCARBOXANILIDE DERIVATIVES WHEN USED INDIVIDUALLY OR IN COMBINATION WITH OTHER HIV-1 SPECIFIC INHIBITORS (IE, TAZO DERIVATIVES). PROC NATL ACAD SCI USA 92(12):5470-5474 (1995).

Delavirdine; Rescriptor® ; BHAP der.; U90152S.

1. ROMERO, D.L.; MORGE, R.A.; GENIN, M.J.; BILES, C.; BUSO, M.; RESNICK, L.; ALTHAUS, I.W.; REUSSER, F.; THOMAS, R.C.; TARPLEY, W.G., BIS(HETEROARYL)PIPERZINE(BHAP) RT INHIBS: STRUCT-ACT. RELATIONSHIPS OF NOVEL SUBSTITUTED INDOLE ANALOGUES AND THE IDENTIFICATION OF MONOMETHANESULFONATE(U-90152S). J MED CHEM 36(10):1505-1508 (1993).
2. ROMERO, D.L.; OLMSTED, R.A.; POEL, T.J.; MORGE, R.A.; BILES, C.; KEISER, B.J.; KOPTA, L.A.; FRIIS, J.M.; HOSLEY, J.D.; STEFANSKI, K.J.; WISHKA, D.G.; EVANS, D.B.; MORRIS, J.; STEHLE, R.G.; SHARMA, S.K.; YAGI, Y.; VOORMAN, R.L.; ADAMS, W.J.; TARPLEY, W.G., TARGETING DELAVIRDINE/ATEVIRDINE RESISTANT HIV-1: IDENTIFICATION OF (ALKYLAMINO)PIPERIDINE-CONTAINING BIS(HETEROARYL)PIPERAZINES AS BROAD SPECTRUM HIV-1 REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS. J MED CHEM 39(19):3769-3789 (1996).

DMP-266; L-743,726; Sustiva®; Efavirenz.

1. YOUNG, S.D.; BRITCHER, S.F.; TRAN, L.O.; PAYNE, L.S.; LUMMA, W.C.; LYLE, T.A.; HUFF, J.R.; ANDERSON, P.S.; OLSEN, D.B.; CARROLL, S.S.; PETTIBONE, D.J.; O'BRIEN, J.A.; BALL, R.G.; BALANI, S.K.; LIN, J.H.; LONG, W.J.; BYRNES, V.W.; EMINI, E.A.; ET AL., L-743,726(DMP-266): A NOVEL, HIGHLY POTENT NONNUCLEOSIDE INHIBITOR OF THE HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS



RESISTANCE TO ABT-538, A NOVEL PROTEASE INHIBITOR. J VIROL 69(2):701-706 (1995).

Nelfinavir; Viracept® ; AG1343.

1. KALISH, V.; KALDOR, S.; SHETTY, B.; TATLOCK, J.; DAVIES, J.; HAMMOND, M.; DRESSMAN, B.; FRITZ, J.; APPELT, K.; REICH, S.; MUSICK, L.; WU, B.; SU, K., ITERATIVE PROTEIN STRUCTURE-BASED DRUG DESIGN AND SYNTHESIS OF HIV PROTEASE INHIBITORS. EUR J MED CHEM 30(SUPPL):S201-S214 (1995).
2. PATICK, A.K.; MARKOWITZ, M.; APPELT, K.; WU, B.; MUSICK, L.; KALISH, V.; KALDOR, S.; REICH, S.; HO, D.; WEBBER, S., ANTIVIRAL AND RESISTANCE STUDIES OF AG1343, AN ORALLY BIOAVAILABLE INHIBITOR OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS PROTEASE. ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER 40(2):292-297 (1996).

VX-478; 141W94; Amprenavir; Agenerase®.

1. NAVIA, M.A.; SATO, V.L.; TUNG, R.D., DESIGN OF VX-478, A POTENT INHIBITOR OF HIV PROTEASE. INT ANTIVIRAL NEWS 3(9):143-145 (1995).
2. PAINTER, G.R.; ST CLAIR, M.H.; DEMIRANDA, P.; REYNOLDS, D.; CHING, S.; DORNSIFE, R.; LIVINGSTON, D.J.; PAZHANISAMY, S.; TUNG, R., AN OVERVIEW OF THE PRECLINICAL DEVELOPMENT OF THE HIV PROTEASE INHIBITOR VX-478 (141W94). 2ND NATL CONF HUM RETROVIRUSES RELAT INFECT 2:167(1995).



**Structure-Activity Relationships in
Platelet-Activating Factor (PAF). 10. From
PAF Antagonism to Inhibition of
HIV-1 Replication**

**Nawal Serradji, Okkacha Bensaid, Marc Martin, Erwan Kan,
Nathalie Dereuddre-Bosquet, Catherine Redeuilh, Jack Huet,
Françoise Heymans, Aazdine Lamouri, Pascal Clayette,
Chang Zhi Dong, Dominique Dormont, and Jean-Jacques Godfroid**

Unité de Recherche Pharmacochimie Moléculaire et Systèmes
Membranaires, Laboratoire de Pharmacochimie Moléculaire,
Université Paris 7 - Denis Diderot, case 7066, 2 Place Jussieu,
75251 Paris Cedex 05, France; CEA, Service de Neurovirologie, DSV/
DRM, CRSSA, 60-68 Avenue de la Division Leclerc, BP 6, 92265
Fontenay aux Roses Cedex, France; and SPI-BIO, 2 rue du Buissac
aux Fraises, 91741 Massy, France

JOURNAL OF
**MEDICINAL
CHEMISTRY®**

Reprinted from
Volume 43, Number 11, Pages 2149-2154



Structure–Activity Relationships in Platelet-Activating Factor (PAF). 10. From PAF Antagonism to Inhibition of HIV-1 Replication

Nawal Serradji,[§] Okkacha Bensaid,[§] Marc Martin,[‡] Erwan Kan,[§] Nathalie Dereuddre-Bosquet,^{†,‡} Catherine Redeuilh,[§] Jack Huet,[§] Françoise Heymans,[§] Aazdine Lamouri,[§] Pascal Clayette,^{†,‡} Chang Zhi Dong,[§] Dominique Dormont,[‡] and Jean-Jacques Godfroid^{*,§}

Unité de Recherche Pharmacochimie Moléculaire et Systèmes Membranaires, Laboratoire de Pharmacochimie Moléculaire, Université Paris 7 - Denis Diderot, case 7066, 2 Place Jussieu, 75251 Paris Cedex 05, France; CEA, Service de Neurovirologie, DSV/DRM, CRSSA, 60-68 Avenue de la Division Leclerc, BP 6, 92265 Fontenay aux Roses Cedex, France; and SPI-BIO, 2 rue du Buisson aux Fraises, 91741 Massy, France

Received January 24, 2000

Excessive levels of PAF and cells of macrophage lineage appear to play an important role in neuronal cell injury, inflammatory syndrome, and HIV replication in CNS resulting in AIDS dementia complex (ADC). The beneficial effects of PAF receptor antagonists are evident and give rise to expected therapeutic strategies for neurotrauma. Piperazine derivatives bearing a "cache-oreilles" (ear-muff) electronic distribution are able to inhibit *in vitro* PAF effects and, thus, could be used in pathologies where this mediator is involved. Therefore, their potential anti-HIV activity was investigated, and we find that (i) these PAF antagonists are effectively active in HIV-infected monocyte-derived macrophages (MDM) but there is no correlation between both anti-HIV and anti-PAF activities; (ii) the presence of a carbamate function (compounds **1a–d**) is favorable to the antiviral activity; (iii) the lipophilicity of the substituent on the piperazinic cycle seems to be less important for the anti-PAF activity than for the antiviral one. Our leading compound, PMS 601 (compound **1a**), presents a dual activity with IC₅₀ of 8 and 11 μ M for anti-PAF and anti-HIV activity, respectively, without cytotoxic events at 1000 μ M in MDM. Although its mode of action is not clearly defined, these data suggest that PMS 601, which displays no effect on acellular reverse transcriptase or protease tests, deserves further investigation in the treatment of HIV-1-associated dementia.

Introduction

HIV infection is associated with inflammatory syndrome and neurologic dysfunctions. These pathophysiological tissular events are both initiated by productively HIV-infected macrophages and/or activated macrophages that release high levels of the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor- α (TNF- α) and the phospholipid mediator platelet-activating factor (PAF).¹ In the central nervous system (CNS) of patients with HIV-associated dementia, the number of TNF- α mRNA-expressing macrophages is elevated compared to that of HIV-infected patients without dementia. Likewise, PAF is elevated in cerebrospinal fluid of patients presenting dementia and altered immune system.² Because direct infection of neurons by HIV is unlikely and because TNF- α and PAF are both neurotoxic, there is a consensus to consider that neuronal dysfunction and apoptosis are mediated by these soluble factors released by macrophages or appared cells in CNS, microglia.³ PAF is probably the key element in this phenomenon since TNF- α -mediated neuronal apoptosis can also be decreased either by PAF acetylhydrolase,² the main catabolic enzyme for PAF, or by a PAF receptor antagonist.² Blocking pathologic effects of PAF may therefore be a pivotal step in the treatment of HIV-associated

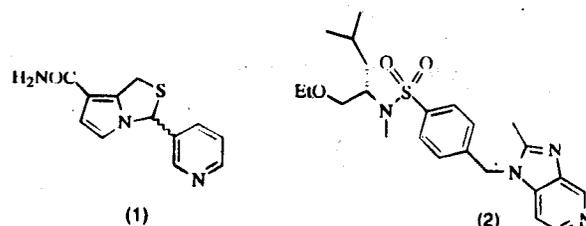


Figure 1. 1: RP 48740 (racemic) and RP 55778 [(+)-enantiomer]. 2: BB-882.

dementia and inflammatory syndrome.⁴ Tissues such as brain are sites of HIV replication and may act as a reservoir for the virus. TNF- α up-regulates HIV-1 production in HIV-infected macrophages, and PAF, in turn, appears to increase TNF- α synthesis.^{5–7} As a consequence, it is also of interest to interfere with PAF-mediated signal transduction to see if it leads to diminished HIV replication in tissues. The relative efficacy in tissues and particularly in CNS of antiretrovirals administered today to HIV-infected patients⁸ takes further interest of PAF antagonists as adjuvant therapy of HIV infection. According to Weissman et al.⁹ and Le Naour et al.¹⁰ PAF receptor antagonists, such as RP 55778 [(+)-3-(3-pyridyl)-1*H*,3*H*-pyrrolo[1,2-*c*]thiazole-7-carboxamide] (Rhône-Poulenc; Figure 1), the active (+)-enantiomer of the racemic compound RP 48740¹¹ and inhibiting TNF- α synthesis,¹² which has demonstrated *in vitro* anti-HIV effects in HIV-1-infected monocytic cell lines or monocyte-derived macrophages

* To whom correspondence should be addressed. Tel: 33 1 4427 6050. Fax: 33 1 4427 5641. E-mail: godfroid@paris7.jussieu.fr.

[§] Université Paris 7 - Denis Diderot.

[†] CEA.

[‡] SPI-BIO.

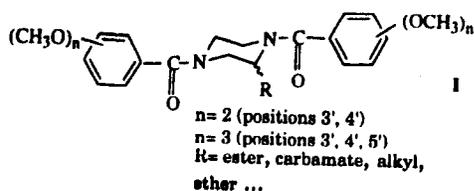


Figure 2. Piperazine analogues previously studied.¹⁵

(MDM), may represent potentially useful compounds in the treatment of HIV infection. The relatively potent inhibitory effect of RP 55778 ($ED_{50} = 50 \mu M$) on HIV-1-DAS replication, a primary macrophage-tropic HIV isolate, might permit its use as an adjuvant in AIDS therapy.¹⁰ Moreover, a recent report showed that Lexipafant (BB-882; Figure 1), a PAF antagonist reducing organ failure and suppressing some aspects of the inflammatory response in acute pancreatitis,¹³ is in phase I-II clinical trials in the treatment of AIDS dementia.¹⁴

At the end of the 1980s, we showed that 1,4-di(3,4,5-trimethoxybenzoyl)piperazine derivatives were able to inhibit in vitro PAF effects on platelet aggregation and could, as a consequence, potentially be used in pathologies where this lipid mediator is involved.¹⁵ These compounds induce "cache-oreilles" effects, i.e., two strong electronegative wells (isocontoured at -10 kcal/mol) located at 180° to each other and at a relative constant distance ($10\text{--}12 \text{ \AA}$) according to the "Dive-Godfroid" receptor model.¹⁶ This hypothesis was elaborated starting from electronic and geometric characteristics of published miscellaneous synthetic and natural PAF antagonists. Taking these features in account, very simple compounds¹⁵ and more than 40 molecules of general formula I (Figure 2) were synthesized.^{17,18}

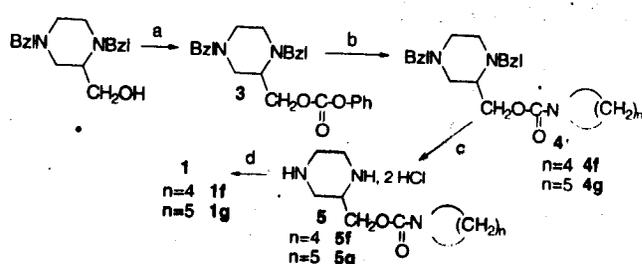
Consequently, the "cache-oreilles" effect was improved with the hypothesis of the multipolarized cylinder.¹⁹ The influence of the hydrophobicity was also studied.²⁰ Moreover, we have shown that the PAF antagonistic effect was only weakly enantiospecific in this series.¹⁷ Starting from these different hypotheses, we have also worked for a long time on the structural modifications leading to the discovery of dual biological activities on the same molecule: for instance, PAF antagonism and acetylcholinesterase²¹ or PLA₂ inhibition.²²

Taking into account the role of macrophages in HIV infection and inflammatory processes in CNS, we have investigated, in the present study, the putative anti-HIV effects of several PAF receptor antagonists in cultures of MDM infected by the reference macrophage tropic HIV-1/Ba-L strain in vitro.

Chemistry

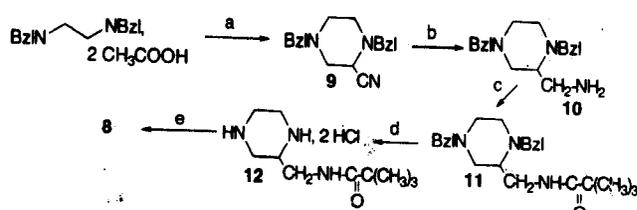
The carbamates **1a–e** and the ester **2** were prepared according to Lamouri et al.¹⁷ Compounds **1f–g** were synthesized by the same manner as shown in Scheme 1. 1,4-Dibenzyl-2-hydroxymethylpiperazine was converted into the phenyl carbonate derivative **3**. Treatment with the appropriate amine gave the carbamate **4** which was debenzylated into the corresponding 2-substituted piperazine **5**. Introduction of the "cache-oreilles" was performed using 3,4,5-trimethoxybenzoyl chloride. Unsubstituted or alkyl-substituted derivatives **6a–d** and the alcohol **7** were prepared as described in Tavet et al.¹⁸

Scheme 1^a



^a Reagents: (a) PhOCOCl , pyr, CH_2Cl_2 , 0°C ; (b) cyclic amine, reflux; (c) H_2 , Pd/C, EtOH; (d) 3,4,5-(MeO)₃PhCOCl, Et₃N, CH_2Cl_2 .

Scheme 2^a



^a Reagents: (a) $\text{BrCH}_2\text{CHBrCN}$, Et₃N, benzene, reflux; (b) Na, EtOH, reflux; (c) $(\text{CH}_3)_3\text{CCOCl}$, Et₃N, CH_2Cl_2 ; (d) H_2 , Pd/C, HCl, EtOH; (e) 3,4,5-(MeO)₃PhCOCl, Et₃N, CH_2Cl_2 .

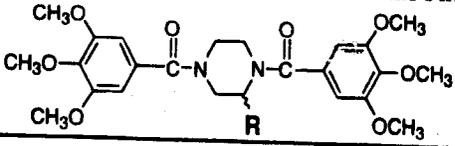
The amide **8** needed another process as described in Scheme 2. *N,N'*-Dibenzylethylenediamine was condensed with 2,3-dibromopropionitrile to form the 1,4-dibenzyl-2-cyanopiperazine (**9**). The nitrile function was reduced into the amine **10** which was reacted with trimethylacetyl chloride to give the amide **11**. Debonylation and "cache-oreilles" formation were conducted as for **1**.

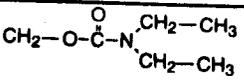
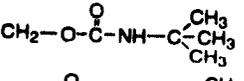
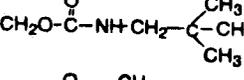
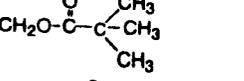
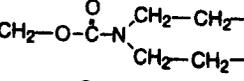
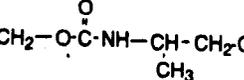
Results and Discussion

All compounds, some of them known as PAF receptor antagonists,¹⁸ were tested for their ability to inhibit PAF-induced platelet aggregation on the one hand and for their activity in MDM infected with the reference macrophage-tropic HIV-1/Ba-L strain on the other hand.

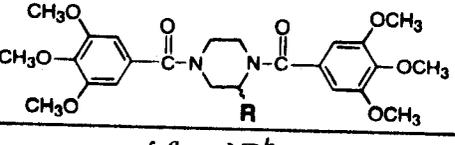
First Screening (Table 1). In the first set, known^{18,19} and new molecules possessing anti-PAF activities with IC_{50} from 0.1 to $8 \mu M$ were tested against HIV. They are listed in Table 1 by increasing lipophilicity in order to evaluate the importance of this parameter in the activities. The percentage of inhibition of HIV-1 replication at a single dose of $100 \mu M$ reported in Table 1 shows that (i) these PAF antagonists are effectively active in HIV-infected MDM but there is no correlation between anti-HIV and anti-PAF activities [**1a** is the leading compound in anti-HIV-1 activity (95% inhibition) and the weakest potent PAF antagonist in this series; the best PAF antagonist, the ester **2**, produces very moderate (25%) inhibition of HIV-1 replication]; (ii) the *N*-substituted carbamate group (compounds **1a–d**) seems to present the highest potency against HIV-1 replication (from 52% to 95% at $100 \mu M$); (iii) the lipophilicity seems to be less important for the anti-PAF activity than for the anti-HIV activity (compound **1e** vs **1a**).

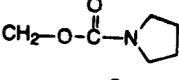
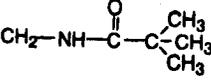
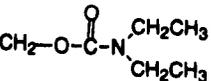
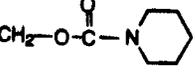
As no toxicity was observed in this series (except for compound **6a**) at $100 \mu M$ and as the best compound, **1a**, is the least hydrophobic, we decided to synthesize and test molecules with f_R (lipophilic contribution of R, calculated from Rekker's method²³) ranging between $f_R(\mathbf{1a}) \pm 1.5$.

Table 1. Lipophilicity Influence on in Vitro Anti-HIV and Anti-PAF Activities of the First Set of Molecules


compd	R	f_R^a	MR^b	Anti-HIV ^c % inhibition	Anti-PAF ^d IC ₅₀ μM	CC ₅₀ ^e μM
1a		0.564	34.47	95 ± 0	8	>1000
1b		0.853	34.52	52 ± 26	0.13	>100
1c		1.372	39.17	74 ± 4	1	>100
2		1.526	31.09	25 ± 21	0.1	>100
1d		1.602	43.79	66 ± 13	0.37	>100
1e		1.891	43.80	-2 ± 12	0.28	>100
6a	(CH ₂) ₉ -CH ₃	5.372	47.5	40 ± 10 ^f	0.24	>50

^a Lipophilic contribution due to R, calculated from Rekker et al. ^b Molecular refractivity due to R, calculated from Hansch et al. ^c Percent (%) inhibition at 100 μM dose of HIV-1 replication using monocyte-derived macrophages infected by the HIV-1/Ba-L strain (see Experimental Section, all the values are the mean ± SD). ^d Inhibition of PAF-induced platelet aggregation using PRP of New Zealand rabbits calculated from dose-response curve as described in the Experimental Section ($n = 5$, mean ± 10%). ^e Fifty percent (50%) cytotoxicity concentration evaluated by neutral red staining. ^f Measured at 10 μM dose, toxic for higher doses.

Table 2. Biological Data of the Second Set of Molecules


compd	R	f_R^a	MR^b	Anti-HIV ^c IC ₅₀ μM	Anti-PAF ^d IC ₅₀ μM	CC ₅₀ ^e μM
7	CH ₂ OH	-0.951	7.19	>100	1.27	>100
6b	H	0.182	1.03	>100	1.78	>100
1f		0.2	33.66	>100	10	>100
8		0.331	33.55	>100	>100	>100
1a		0.564	34.47	11 ± 7	8	>1000
6c	CH ₃	0.701	5.65	66*	0.56	>100
1g		0.719	38.31	95*	0.08	>100
6d	CH ₂ CH ₃	1.22	10.30	230*	0.46	>100
RP 55778				50 ^f	168	

^{a,b,d,e} See Table 1. ^c Antiviral activity measured toward HIV-1/Ba-L-infected monocyte-derived macrophages. ^f Inhibition of HIV-1-DAS replication.¹⁰ ^g IC₅₀ of the racemic compound, RP 48740.¹¹ *Single measurement.

Second Screening (Table 2). Here are reported the IC₅₀ in both activities. The best compound is still 1a. Surprisingly, similar compounds such as 1f,g show very poor inhibition of HIV-1 replication. It is difficult to

attribute this feature to the difference of f_R which is very small, -0.36 and +0.15, respectively, but probably due to a steric effect induced by the cyclic structures. Small alkyl derivatives such as 6c,d (R = Me or Et; Table 2)

are unexpectedly less potent than analogue **6a** of the first set of compounds. Introducing more hydrophilic substituents as in alcohol **7** as well as replacing the carbamate function by an amide in compound **8** led to totally inactive compounds. Moreover, no correlation appears between both activities and the molecular refractivity (MR), calculated from Hansch's method²⁴ and trading the size and the electronic effects of R.

Consequently, compound **1a** became our reference molecule as PMS 601 with an IC₅₀ of 11 μM against HIV, with the absence of cytotoxic events at 100–1000 μM, as shown after microscopical observation of the cells and neutral red staining, and was selected for further investigations. Structure–activity relationships are in progress: for instance, the role of enantiospecificity in inhibition of HIV-1 replication (negligible for PAF antagonism¹⁷) is under investigation. Its mode of action is up to now unknown. Nevertheless, preliminary results show that PMS 601 (compound **1a**) presents antiviral activity in other cell systems and interferes with both early and late steps in the HIV biological cycle²⁵ but inhibits, in acellular tests, neither the reverse transcriptase (RT) nor the HIV protease activity (as performed in refs 31 and 26, respectively).

Conclusion

In this paper, we have shown that one molecule, PMS 601 (compound **1a**), possesses both anti-HIV-1 and anti-PAF potencies in the micromolar range. As compared with RP 55778, PMS 601 is more potent (11 μM vs 50 μM¹⁰) and does not antagonize AZT.²⁵ As for Lexipafant (published without reported anti-HIV activity), PMS 601 may be a good candidate for preclinical trials in the treatment of HIV infection.

Experimental Section

Chemistry. General Methods. All materials were obtained from commercial suppliers and used without further purification. Thin-layer chromatography was performed on TLC plastic sheets of silica gel 60F₂₅₄ (layer thickness 0.2 mm) from Merck. Column chromatography purification was carried out on silica gel 60 (70–230 mesh ASTM, Merck). All melting points were determined on a digital melting point apparatus (Electrothermal) and are uncorrected. The structures of all compounds were confirmed by IR and ¹H NMR spectra. IR spectra were obtained in paraffin oil with a ATI Mattson Genesis Series FTIR spectrometer, and ¹H NMR spectra were recorded in CDCl₃ on a BRUCKER AC 200 spectrometer using hexamethyldisiloxane (HMDS) as an internal standard. Chemical shifts are given in ppm and peak multiplicities are designated as follows: s, singlet; d, doublet; t, triplet; br s, broad singlet; m, multiplet. Elemental analyses were obtained from the "Service régional de microanalyse" (Université Pierre et Marie Curie), Paris, France, and were within ±0.4% of theoretical values.

1,4-Dibenzyl-2-(phenoxy-carboxymethyl)piperazine (3). A solution of 1,4-dibenzyl-2-(hydroxymethyl)piperazine (14 g, 47.3 mmol) in Et₃N (14.2 mL, 192.8 mmol) and CH₂Cl₂ (95 mL) was cooled in an ice bath. A solution of phenyl chloroformate (11.1 g, 71 mmol) in CH₂Cl₂ (95 mL) was added dropwise and the mixture was stirred at 0 °C for 1 h and at room temperature for 48 h. The solution was washed with a saturated NaHCO₃ solution and with water until neutral pH. After drying (MgSO₄), filtration and evaporation, the residue was chromatographed on a silica gel column using CH₂Cl₂ as eluent to yield 8 g (40.6%) of carbonate **3** as a viscous white product: *R*_f 0.52 (CHCl₃/MeOH, 98:2, v/v); IR (ν cm⁻¹) 3383 (NH), 2955 (ArCH), 1746 (C=O), 1603 (C=C); ¹H NMR δ 7.2 (m, 15H, ArH), 4.3 (m, 2H, CH₂OCO), 3.8 (d, 1H, *J* = 12

Hz, CH–Ph), 3.4 (d, 1H, *J* = 12 Hz, CH–Ph), 3.3 (s, 2H, CH₂–Ph), 2.9–2 (m, 7H, piperazine CH and CH₂).

1,4-Dibenzyl-2-(pyrrolidinocarbonyloxymethyl)piperazine (4). A solution of carbonate **3** (3.12 g, 7.5 mmol) in pyrrolidine (9.4 mL, 112.8 mmol) was refluxed for 60 h. After cooling and evaporation of the excess of amine, the residue was taken up in CH₂Cl₂ and washed with water. After drying (MgSO₄), filtration and evaporation, a chromatography on a silica gel column using 0.5% MeOH in CH₂Cl₂ as eluent yielded 1.48 g (50.2%) of **4** as an oil: *R*_f 0.38 (CHCl₃/MeOH, 95:5, v/v); IR (ν cm⁻¹) 3030 (ArCH), 1761 (C=O), 1593 (ArC=C); ¹H NMR δ 7.2 (m, 10H, ArH), 4 (m, 2H, CH₂OCO), 3.8 (d, 1H, CH–Ph), 3.4 (d, 1H, CH–Ph), 3.3 (s, 2H, CH₂–Ph), 2.9–2 (m, 7H, piperazine CH and CH₂) and pyrrolidine CH₂N), 1.8 (large s, 4H, pyrrolidine CH₂).

2-(Pyrrolidinocarbonyloxymethyl)piperazine, Hydrochloride (5). To a solution of the carbamate **4** (1.48 g, 3.7 mmol) in EtOH (40 mL) and 12 N HCl (1 mL) was added 100 mg Pd/C (10%), and this solution was warmed (40 °C) with stirring under hydrogen atmosphere. After disappearing of the starting material (3 h) as shown by TLC, the suspension was filtered and the catalyst washed several times with EtOH and H₂O. The solvents were evaporated to give 1.04 g (98.3%) of **5** which was used in the next step without purification: *R*_f 0.4 (CHCl₃/MeOH/NH₄OH, 80:20:2, v/v/v).

2-(Pyrrolidinocarbonyloxymethyl)-1,4-di(3,4,5-trimethoxybenzoyl)piperazine (1f). To a solution of diamine hydrochloride **5** (1.04 g, 3.63 mmol) in CH₂Cl₂ (50 mL) in the presence of Et₃N (3 mL, 41 mmol) was added dropwise 3,4,5-trimethoxybenzoyl chloride (2.33 g, 10.1 mmol) in CH₂Cl₂ (30 mL). After stirring overnight at room temperature, EtOH (2 mL) was added and the solution was washed twice with water, dried (MgSO₄) and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on a silica gel column using 2% MeOH in CH₂Cl₂ as eluent and crystallized in a mixture of MeOH/ethylhexane to yield 0.59 g (29%) of **1f**: mp 145.1 °C; *R*_f 0.43 (CHCl₃/MeOH, 5:5, v/v); IR (ν cm⁻¹) 1684 (C=O carbamate), 1622 (C=O amide), 1603 (C=C); ¹H NMR δ 6.6 (s, 4H, ArH), 5.3–4 (m, 5H, CH₂OCO, piperazine CH₂ and CH), 3.8 (s, 18H, CH₃), 3.6–2.3 (m, 8H, piperazine and pyrrolidine CH₂NC=O), 1.8 (s, 4H, pyrrolidine CH₂).

1,4-Dibenzyl-2-cyanopiperazine (9). A mixture of *N,N*-dibenzylethylenediamine diacetate (79 g, 221 mmol) and Et₃N (123 mL, 884 mmol) in benzene (500 mL) was warmed until dissolution. Then 2,3-dibromopropionitrile (38.54 g, 300 mmol) in benzene (150 mL) was added dropwise. After 3 h of reflux with stirring and filtration, the solid was washed with ether and the filtrate was washed with saturated NaHCO₃ (100 mL) and twice with water. The organic layer was dried (MgSO₄) and concentrated in vacuo. The residue was purified on a silica gel column using ether/petroleum ether (10:90, v/v) as eluent to yield 45 g (98.2%) of **9** as crystals: mp 61.7 °C; *R*_f 0.33 (ether/petroleum ether, 30:70, v/v); IR (ν cm⁻¹) 3030 (ArCH), 1622, (C=O amide) 2224 (CN), 1602 (ArC=C); ¹H NMR δ 7.2 (m, 10H, ArH), 3.7 (m, 4H, CH₂Ph), 3.7–3.3 (m, 7H, piperazine CH₂ and CH).

2-Aminomethyl-1,4-dibenzylpiperazine (10). A mixture of nitrile **9** (24.7 g, 85 mmol) in absolute EtOH (200 mL) was warmed to reflux. Sodium (7.85 g, 341.4 mmol) was added portionwise through the condenser. After stirring overnight at room temperature, the sodium ethoxide was neutralized by a stoichiometric quantity of acetic acid (19.5 mL) in ether (60 mL). The salts were filtered and washed with ether and the filtrate was concentrated in vacuo. The residue was taken up with ether, washed with water, dried (MgSO₄), filtered and evaporated yielding 16.1 g (64%) of **10** as a wax: *R*_f 0.08 (CH₂Cl₂/MeOH, 90:10, v/v); IR (ν cm⁻¹) 3333 (NH₂), 3027 (ArCH), 1602 (ArC=C); ¹H NMR δ 7.2 (m, 10H, ArH), 4 (s, 2H, 1NH₂), 3.7 (m, 4H, CH₂Ph), 3.5–2.2 (m, 9H, CH₂N and CHN).

1,4-Dibenzyl-2-(2,2-dimethylpropionylaminomethyl)piperazine (11). To a solution of **10** (3.86 g, 13.1 mmol) in CH₂Cl₂ (100 mL) in the presence of Et₃N (5.5 mL, 39.3 mmol) was added dropwise 2,2-dimethylpropanoyl chloride (2.63 mL, 19.6 mmol) in CH₂Cl₂ (30 mL). After 1 h stirring at room

temperature, the mixture was refluxed for 4 h. After adding EtOH (2 mL), the solution was washed twice with water, dried (MgSO_4), filtered and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on a silica gel column using $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, 0.5:99.5, v/v as eluent to yield 2.44 g (49%) of the amide 11: R_f 0.36 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, 95:5, v/v); IR (ν cm^{-1}) 3383 (NH), 2955 (ArCH), 1746 (C=O), 1603 (ArC=C); $^1\text{H NMR}$ δ 7.2 (m, 10H, ArH), 6.4 (s, 1H, NH), 3.8 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{NC=O}$), 3.3 (m, 5H, CH_2Ph and piperazine CH), 2.7–2.2 (m, 6H, piperazine CH_2), 1.2 (m, 9H, CH_3).

2-(2,2-Dimethylpropionylaminomethyl)piperazine, Hydrochloride (12). To a solution of amide 11 (2.44 g, 6.43 mmol) in EtOH (40 mL) and 12 N HCl (1 mL) was added 100 mg Pd/C, and this mixture was warmed (40 °C) with stirring under hydrogen atmosphere. After disappearance of the starting material (3 h) as shown by TLC, the suspension was filtered and the catalyst washed several times with EtOH and H_2O . The solvents were evaporated and the residue crystallized in MeOH/ether to give 1.2 g (68.6%) of 12: mp 278.6 °C; R_f 0.13 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$, 80:20:2, v/v/v).

2-(2,2-Dimethylpropionylaminomethyl)-1,4-di(3,4,5-trimethoxybenzoyl)piperazine (8). To a solution of diamine hydrochloride 12 (1.2 g, 4.4 mmol) in Et_3N (3 mL, 41 mmol) and CH_2Cl_2 (50 mL) was added dropwise 3,4,5-trimethoxybenzoyl chloride (2.33 g, 10.1 mmol) in CH_2Cl_2 (30 mL). After stirring overnight at room temperature, EtOH (2 mL) was added and the solution was washed twice with water, dried (MgSO_4) and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on a silica gel column using 2% MeOH in CH_2Cl_2 as eluent to yield 0.9 g (34.6%) of 8: mp 146.5 °C; R_f 0.29 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 95:5, v/v); IR (ν cm^{-1}) 3391 (NH), 1740 (C=O amide), 1608 (ArC=O), 1584 (ArC=C); $^1\text{H NMR}$ δ 6.6 (s, 4H, ArH), 6.4 (s, 1H, NH), 4.5 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{NC=O}$), 3.7 (s, 18H, CH_3O), 3.6 (m, 2H, CH_2N), 3.3 (m, 3H, CH_2 and CHNC=O), 1.1 (m, 9H, CH_3).

Biological Methods. 1. Platelet Aggregation. The inhibition of platelet aggregation was determined using platelet-rich plasma (PRP) of New Zealand rabbits by the method of Cazenave et al.²⁷ Blood samples were collected from auricular artery into a citrate buffer (3.8%, pH 7.4), and PRP was obtained by centrifugation for 15 min at 1200 rpm. The antagonists were solubilized in EtOH at concentrations from 10^{-2} to 10^{-7} M and added to the incubated and stirred PRP for 2 min before PAF (2.5 nM) challenge. Platelet aggregation induced by PAF in the presence of the antagonists was monitored by continuous recording of light transmission in a dual-channel recorder (Cronolog Coultronics apparatus) and was compared to a control aggregation induced by PAF alone. The drug concentration required to produce 50% inhibition (IC_{50}) was calculated from dose-response curves (number of determinations: 5–6).

2. Monocyte-Derived Macrophage Isolation. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from healthy HIV-, HCV-, HBV-seronegative blood donor by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation (MSL 2000, Eurobio, Les Ulis, France). Monocytes were isolated from PBMC by countercurrent centrifugal elutriation as previously described with an enrichment degree $\geq 95\%$.^{28,29} Freshly isolated human monocytes were resuspended in medium A: RPMI 1640 medium (Roche Diagnostics, Meylan, France) supplemented with 10% heat-inactivated (56 °C for 30 min) fetal calf serum (FCS) (Roche Diagnostics), 2 mM L-glutamine (Roche Diagnostics), and 1% tri-antibiotic mixture (penicillin, streptomycin, neomycin, PSN; Life Technologies, Grand Island, NY). Cells were placed at 1 million cells/well of 48-well plates (Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ) and maintained 7 days in humidified 5% CO_2 atmosphere to allow their differentiation in MDM.

3. Drugs. Drugs were solubilized in RPMI 1640 or dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma) and conserved at -80 °C. Dilutions were performed in cell culture medium.

4. Virus. MDM were infected with the reference macrophage-tropic HIV-1/Ba-L strain.³⁰ In the Service de Neurovirologie, this virus was amplified in vitro using human phytohe-

magglutinin (PHA)-P-activated umbilical blood mononuclear cells (UBMC). The viral stock was ultracentrifugated to eliminate soluble factors such as cytokines, resuspended in RPMI 1640 and titrated using PHA-P-activated PBMC. Fifty percent (50%) tissue culture infectious doses (TCID_{50}) were calculated using Kärber's formula.³¹

5. Antiviral Assay. One million MDMs were pretreated 1 h in the presence of different concentrations of compounds and infected with 10 000 TCID_{50} (0.01 moi, multiplicity of infection) of the HIV-1/Ba-L strain. After 24 h, MDM were washed once to eliminate excess virus and fed with fresh medium A. Twice a week, supernatants were removed and stored at -20 °C in order to measure viral replication by RT activity dosage. Cell culture medium and drugs were then renewed, and cells were microscopically observed to assess possible drug-induced cytotoxicity. Moreover, at the end of the culture, cytotoxicity was confirmed using neutral red assay and, for PMS 601, by testing until 1 mM dose.

6. Dosage of Viral Replication. HIV replication was assessed by the dosage of RT activity in cell culture supernatants, as described elsewhere.³²

7. Data Analysis. All experiments were repeated with cells isolated from a second blood donor. Results were expressed as the mean of RT activity \pm standard deviation (SD). Fifty percent (50%) inhibition concentrations (IC_{50}) were calculated using cumulative RT activity and microcomputer software (J. and T. C. Chou, Biosoft, Cambridge, U.K.). Fifty percent (50%) cytotoxic concentrations (CC_{50}) were determined using the same microcomputer software and DC values (neutral red staining assay).

Acknowledgment. The authors thank the Centre de Transfusion Sanguine des Armées (CTSA, Clamart, France), the Service de Cytaphérèse de l'Hôpital Saint-Louis (Paris, France), and the Maternité de Sainte-Félicité (Paris, France) as well as N. Boggetto and Prof. M. Reboud (Institut Jacques Monod, CNRS-Universités Paris 6 et 7, Paris, France) for the antiprotease assay. This work was supported by the Scientific Council of the Université Paris 7 - Denis Diderot (Paris, France), the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS, Paris, France), the Fondation pour la Recherche Médicale-Sidaction (Paris, France), the Institut de Formation Supérieure Biomédicale (IFSBI, Villejuif, France), the Association Claude Bernard (ARC, Paris, France), the Association Naturalia et Biologia (NEB, Paris, France), and the Association pour la Recherche en Neurovirologie (ARN, Griselles, France).

References

- Walsh, L. M.; Corcoran, M. L.; Pyle, S. W.; Arthur, L. O.; Harel-Bellan, A.; Farrar, W. L. Human Immunodeficiency Virus Glycoprotein (gp 120) Induction of Monocyte Arachidonic Acid Metabolites and Interleukines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1989, 86, 621–625.
- Perry, S. W.; Hamilton, J. A.; Tjoelker, L. W.; Dbaibo, G.; Dzenko, K. A.; Epstein, L. G.; Hannun, Y.; Whittaker, J. S.; Dewhurst, S.; Gelbard, H. A. Platelet-Activating Factor Receptor Activation, an Initiator Step in HIV-1 Neuropathogenesis. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 17660–17664.
- Kolson, D. L.; Lavi, E.; Gonzalez-Scarano, F. The Effects of Human Immunodeficiency Virus in the Central Nervous System. *Adv. Virus Res.* 1998, 50, 1–47.
- Gelbard, H. A.; Nottet, H. S.; Swindells, S.; Jett, M.; Dzenko, K. A.; Genis, P.; White, R.; Wang, L.; Choi, Y. B.; Zhang, D.; Lipton, S. A.; Tourtellote, W. W.; Epstein, L. G.; Gendelman, H. E. Platelet-Activating Factor: a Candidate Human Immunodeficiency Virus Type 1-Induced Neurotoxin. *J. Virol.* 1994, 68, 4628–4635.
- Dagenais, P.; Thivierge, M.; Parent, J.-L.; Stankova, J.; Rola-Pleszczynski, M. Augmented Expression of Platelet-Activating Factor Receptor Gene by TNF-alpha through Transcriptional Activation in Human Monocytes. *J. Leukocyte Biol.* 1997, 61, 106–112.
- Rola-Pleszczynski, M. Priming of Human Monocytes with PAF Augments their Production of Tumor Necrosis Factor. *J. Lipid Mediators* 1990, 2, S77–S82.

- (7) Howard, A. D.; Erickson, K. L. The Induction and Augmentation of Macrophage Tumoricidal Responses by Platelet-Activating Factor. *Cell. Immunol.* **1995**, *164*, 105–112.
- (8) Enting, H. E.; Hoetelmans, R. M. W.; Lange, J. M. A.; Burger, D. M.; Beijnen, J. H.; Portegies, P. Antiretroviral Drugs and the Central Nervous System. *AIDS* **1998**, *12*, 1941–1955.
- (9) Weissman, D.; Poli, G.; Bousseau, A.; Fauci, A. S. A Platelet-Activating Factor Antagonist, RP 55778, Inhibits Cytokine-Dependent Induction of Human Immunodeficiency Virus Expression in Chronically Infected Promonocytic Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 2537–2541.
- (10) Le Naour, R.; Clayette, P.; Henin, Y.; Mabondzo, A.; Raoul, H.; Bousseau, A.; Dormont, D. Infection of Human Macrophages with an Endogenous Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF-alpha)-Independent Human Immunodeficiency Virus Type-1 Isolate is Unresponsive to the TNF-alpha Synthesis Inhibitor RP 55778. *J. Gen. Virol.* **1994**, *75*, 1379–1388.
- (11) Sedivy, P.; Caillard, C. G.; Floch, A.; Folliard, F.; Mondot, S.; Robaut, C.; Terlain, B. 48740 RP, a Specific PAF-Acether Antagonist. *Prostaglandins* **1995**, *30*, 688.
- (12) Floch, A.; Bousseau, A.; Hétier, E.; Floch, F.; Bost, P.-E.; Cavero, I. RP 55778, a PAF Receptor Antagonist, Prevents and Reverses LPS-Induced Hemoconcentration and TNF Release. *J. Lipid Mediators* **1999**, *1*, 349–360.
- (13) Johnson, C. D. Platelet-Activating Factor and Platelet-Activating Factor Antagonists in Acute Pancreatitis. *Dig. Surg.* **1999**, *16*, 93–101.
- (14) Schifitto, G.; Sacktor, N.; Marder, K.; McDermott, M. P.; McArthur, J. C.; Kieburz, K.; Small, S.; Epstein, L. G. Randomized Trial of the Platelet-Activating Factor Antagonist Lexipafant in HIV-Associated Cognitive Impairment. Neurological AIDS Research Consortium. *Neurology* **1999**, *53*, 391–396.
- (15) Lamotte-Brasseur, J.; Heymans, F.; Dive, G.; Lamouri, A.; Redeuilh, C.; Hosford, D.; Braquet, P.; Godfroid, J.-J. PAF-Receptor and the "Cache-Oreilles" Effect. Simple PAF Antagonists. *Lipids* **1991**, *26*, 1167–1171.
- (16) Dive, G.; Godfroid, J.-J.; Lamotte-Brasseur, J.; Batt, J.-P.; Heymans, F.; Dupond, L.; Braquet, P. PAF-Receptor. 1. "Cache-Oreilles" Effects of Selected High-Potency Platelet-Activating Factor (PAF) Antagonists. *J. Lipid Mediators* **1989**, *1*, 201–215.
- (17) Lamouri, A.; Heymans, F.; Tavet, F.; Dive, G.; Batt, J.-P.; Blavet, N.; Braquet, P.; Godfroid, J.-J. Design and Modelling of New Platelet-Activating Factor Antagonists. 1. Synthesis and Biological Activity of 1,4-Bis(3',4',5'-trimethoxybenzoyl)-2-[[substituted carbonyl and carbamoyloxy)methyl]piperazines. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 990–1000.
- (18) Tavet, F.; Lamouri, A.; Heymans, F.; Dive, G.; Touboul, E.; Blavet, N.; Godfroid, J.-J. Design and Modelling of New Platelet-Activating Factor Antagonists. 2. Synthesis and Biological Activity of 1,4-Bis(3',4',5'-trimethoxybenzoyl)-2-alkyl and 2-alkoxymethylpiperazines. *J. Lipid Mediators Cell Signalling* **1997**, *15*, 145–159.
- (19) Batt, J.-P.; Lamouri, A.; Tavet, F.; Heymans, F.; Dive, G.; Godfroid, J.-J. New Hypothesis on the Conformation of the PAF Receptor from Studies on the Geometry of Selected Platelet-Activating Factor-Antagonists. *J. Lipid Mediators* **1991**, *4*, 343–346.
- (20) Heymans, F.; Dive, G.; Lamouri, A.; Bellahsene, T.; Touboul, E.; Huet, J.; Tavet, F.; Redeuilh, C.; Godfroid, J.-J. Design and Modelling of New Platelet-Activating Factor Antagonists. 3. Relative Importance of Hydrophobicity and Electronic Distribution in Piperazine Series. *J. Lipid Mediators Cell Signalling* **1997**, *15*, 161–173.
- (21) Le Texier, L.; Favre, E.; Ronzani, H.; Massicot, F.; Blavet, N.; Pirotzky, E.; Godfroid, J.-J. Structure-Activity Relationships in Platelet-Activating Factor (PAF). 8. Tetrahydrofuran Derivatives as Dual PAF Antagonists and Acetylcholinesterase Inhibitors: Anti-Acetylcholinesterase Activity and Comparative SAR. *J. Lipid Mediators Cell Signalling* **1996**, *13*, 207–222.
- (22) Binisti, C.; Touboul, E.; Mounier, C.; Heymans, F.; Bon, C.; Godfroid, J.-J. Structure-Activity Relationships in Platelet-Activating Factor. 9. From PAF-Antagonism to PLA₂ Inhibition. *J. Lipid Mediators Cell Signalling* **1996**, *15*, 125–144.
- (23) Rekker, R. F.; De Kort, H. M. The Hydrophobic Fragmental Constant; an Extension to a 1000 Data Point Set. *Eur. J. Med. Chem.* **1979**, *14*, 479–488.
- (24) Hansch, C.; Leo, A.; Hunger, S. H.; Kim, K. H.; Nikaitani, D.; Lien, E. J. "Aromatic" Substituent Constants for Structure-Activity Correlations. *J. Med. Chem.* **1973**, *16*, 1207–1216.
- (25) Martin, M.; Serradji, N.; Dereudde-Bosquet, N.; Le Pavec, G.; Lamouri, A.; Heymans, F.; Godfroid, J.-J.; Clayette, P.; Dormont, D. Anti-HIV-1 and Antiinflammatory Properties of a New PAF Antagonist, PMS 601. *Antimicrob. Agents Chemother.*, submitted.
- (26) Bouras, A.; Boggetto, N.; Benatalah, Z.; de Rosny, E.; Sicsic, S.; Reboud-Ravaux, M. Design, Synthesis, and Evaluation of Conformationally Constrained Tongs, New Inhibitors of HIV-1 Protease Dimerization. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 957–962.
- (27) Cazenave, J. P.; Benveniste, J.; Mustard, J. F. Aggregation of Rabbit Platelets by Platelet-Activating Factor is Independent of the Release Reaction and the Arachidonate Pathway and Inhibited by Membrane-Active Drugs. *Lab. Invest.* **1979**, *41*, 275–285.
- (28) Dereudde-Bosquet, N.; Clayette, P.; Martin, M.; Benveniste, O.; Fretier, P.; Jaccard, P.; Vaslin, B.; Lebeaut, A.; Dormont, D. Lack of IL-10 Expression in Monocyte-Derived Macrophages in Response to in vitro Infection by HIV-1 Isolates. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **1997**, *13*, 9961–9966.
- (29) Fidgor, C. G.; Leemans, J. M. M.; Bont, W. S.; Vries, J. E. Theory and Practice of Centrifugal Elutriation (CE). Factors Influencing the Separation of Human Blood Cells. *Cell. Biophys.* **1983**, *5*, 105–118.
- (30) Gartner, S.; Markovitz, P.; Markovitz, D. M.; Kaplan, M. H.; Gallo, R. C.; Popovic, M. The Role of Mononuclear Phagocytes in HTLV-III/LAV Infection. *Science* **1986**, *233*, 215–219.
- (31) Kärber, G. Beitrag Zur Kollektiven Behandlung Pharmakologischer Reihenversuche. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **1931**, *162*, 956–959.
- (32) Rey, F.; Spire, B.; Dormont, D.; Barré-Sinoussi, F.; Montagnier, L.; Chermann, J. C. Characterization of RNA Dependent DNA Polymerase of a New Human T-Lymphotropic Retrovirus (Lymphadenopathy Associated Virus). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, *121*, 126–133.

JM9911276

Propriétés antirétrovirales et anti-inflammatoires d'un nouvel antagoniste du facteur d'activation des plaquettes, la PMS-601

M. Martin¹, N. Serradji², N. Dereuddre-Bosquet^{1,3}, O. Bensaïd², G. Fichet¹,
A. Lamouri², F. Heymans², P. Clayette^{1,3*}, J.J. Godfroid², D. Dormont¹

¹ CEA, service de neurovirologie, DSV/DRM, CRSSA, institut Paris-Sud sur les cytokines,
60-68, avenue de la Division Leclerc, BP 692265, Fontenay aux Roses cedex ;

² Université Denis-Diderot, Paris VII, laboratoire de pharmacochimie moléculaire, Paris ;

³ SPI-BIO, Massy, France

Résumé

Le facteur d'activation des plaquettes (PAF) joue un rôle majeur dans la survenue des désordres neurologiques associés à l'infection par le VIH : en favorisant le syndrome inflammatoire ; en prenant part aux processus neurotoxiques ; et en augmentant la réplication virale, tout particulièrement dans les cellules de la lignée macrophagique. Les propriétés antivirales et anti-inflammatoires d'antagonistes du récepteur au PAF ont donc été évaluées *in vitro* vis-à-vis de macrophages dérivés des monocytes infectés ou non par la souche VIH-1/Ba-L. Parmi les molécules testées, la PMS-601 a démontré la meilleure efficacité antivirale. L'étude du mécanisme d'action de cette molécule a permis de mettre en évidence une action de la molécule avec les phases précoces et tardives du cycle biologique du VIH. Par ailleurs, la PMS-601 a démontré des capacités à diminuer la synthèse des principaux médiateurs de l'inflammation dans les macrophages. Ces résultats suggèrent donc que la PMS-601 pourrait constituer une thérapeutique adjuvante aux antirétroviraux dans le cadre des infections par le VIH, d'autant qu'elle potentialise *in vitro* l'activité antivirale de l'AZT. © 2000 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

activité antivirale / macrophages / PAF / VIH

Summary - PMS-601: a new PAF-receptor antagonist with antiretroviral and anti-inflammatory properties.

The platelet-activating factor (PAF) plays a major role in neuropathogenesis associated with human immunodeficiency virus (HIV) infection by enhancing the inflammatory syndrome and viral replication, particularly in cells of the macrophage lineage, and its neurotoxic properties. We therefore evaluated the ability of PAF-R antagonists to inhibit HIV-1 replication and down-modulate the synthesis of pro-inflammatory mediators in healthy or HIV-1-infected macrophages. PMS-601 demonstrated the highest anti-HIV activity. Considering its mode of action and anti-inflammatory properties, PMS-601 interferes with early and late steps of the HIV biological cycle and decreases the synthesis of PAF, TNF- α , MIP-1 α , MIP-1 β and RANTES. Altogether, these results suggest that PAF-receptor antagonists, and particularly PMS-601, could be of potential value as treatment adjuvants in HIV infection. © 2000 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

antiviral activity / HIV / macrophages / PAF

* Correspondance et tirés à part.



INTRODUCTION

Les troubles neurologiques sont une des complications majeures de l'infection par le VIH. Environ 20 % des patients présentant un syndrome d'immuno-déficience acquise (sida) développent des désordres cognitifs et moteurs, et plus de 50 % ont des troubles neurologiques légers lors des phases plus précoces de la maladie [1, 2]. La neuropathogénèse de l'infection par le VIH s'appuie sur :

- l'entrée du virus dans le système nerveux central (SNC) ;
- la production de composants viraux et cellulaires provoquant l'inflammation et la neurotoxicité ;
- les dysfonctions et la mort neuronales.

La démence semble être le résultat d'une encéphalopathie métabolique nourrie par la réplication virale. Ainsi, Gendelman et al. ont montré récemment une réversion des signes cliniques de la démence simultanément à la diminution des niveaux de TNF- α , d'acide quinolinique et de monoxyde d'azote (NO) dans le liquide céphalorachidien (LCR) et le plasma d'un patient traité par une polychimiothérapie antirétrovirale [3]. La réplication virale et la production de protéines virales dans les cellules de la lignée macrophagique sont à l'origine des niveaux élevés de β -chimiokines, de β 2-microglobuline, d'acide quinolinique, de facteur d'activation des plaquettes (PAF) et de TNF α dans le SNC et le LCR des patients infectés par le VIH [4-9]. Le PAF, en tant que médiateur lipidique, régule positivement la synthèse des cytokines pro-inflammatoires, et particulièrement celle du TNF- α dans les macrophages [10, 11]. Le TNF- α a un rôle critique dans les désordres neurologiques au cours de la démence pour au moins deux raisons :

- il augmente la réplication du VIH dans la plupart des cellules en activant le facteur de transcription NF κ B [12, 13] ;
- il est associé à l'apoptose neuronale observée dans les cerveaux de patients séropositifs [14].

In vitro, l'apoptose neuronale induite par le TNF- α ainsi que l'augmentation de la réplication virale induite par cette cytokine, peuvent être bloquées par des antagonistes du récepteur au PAF [15-18], suggérant que ces molécules pourraient constituer une stratégie thérapeutique contre les désordres neurologiques associés au VIH.

Plusieurs études ont montré l'effet bénéfique des polychimiothérapies antirétrovirales sur la progression de la maladie et sur l'incidence des infections opportunistes liées au VIH. Cependant, elles semblent avoir un impact moins prononcé sur les troubles neurologiques liés à l'infection, du fait de leur faible aptitude à pénétrer dans le SNC.

Il nous a donc semblé intéressant d'évaluer la capacité d'antagonistes du récepteur au PAF à diminuer les processus inflammatoires et la réplication virale qui contribuent majoritairement à la pathogénèse du VIH dans les tissus, et tout particulièrement dans le SNC. L'activité antirétrovirale de 40 dérivés pipéraziniques a donc été, tout d'abord, évaluée dans des macrophages infectés par la souche VIH-1/Ba-L. Cette première étude nous a permis d'identifier l'un d'entre eux, la PMS-601, et ses caractéristiques antivirales et anti-inflammatoires ainsi que son mode d'action ont alors été explorés.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Isolement des cellules et culture

Les cellules mononucléées ont été isolées du sang périphérique de donneurs sains par un gradient de densité sur un coussin de Ficoll. Les monocytes ont ensuite été séparés des lymphocytes par élutriation à contre-courant. Le degré de pureté en monocytes a été vérifié par immunophénotypage CD11b et CD14. Les cellules ont ensuite été cultivées dans le milieu de culture RPMI 1640 supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), 2 mM de L-Glutamine, et 1 % d'une solution de trois antibiotiques (pénicilline, streptomycine et néomycine), et maintenues à +37 °C en atmosphère humide saturée en CO₂. Les monocytes ont été différenciés en macrophages pendant sept jours. La teneur énergétique des milieux de culture a été testée au moyen du test LAL (Sigma Chemical Co, St-Louis, MI, USA).

Molécules

La PMS-601 est issue de la synthèse chimique. Elle est dotée d'une activité anti-PAF déterminée par un test d'agrégation plaquettaire. La molécule a été resuspendue dans du diméthylsulfoxyde (DMSO), à la concentration de 200 mM. L'azidothymidine (AZT) et l'indinavir (IDV) ont été resuspendus dans du tampon phosphate (PBS) respectivement à la concentration de 1 mg/mL et de 10 mM. Les dilutions ont, par la suite, été réalisées dans le milieu de culture préalablement décrit.

Mesure de la viabilité cellulaire

La toxicité de la PMS-601 vis-à-vis des macrophages dérivés des monocytes (MDM) a été mesurée après deux à quatre semaines de traitement à l'aide d'une coloration au rouge neutre (RN). Son effet sur l'activité mitochondriale de ces cellules a également été mesuré à l'aide d'un test méthyltétrazolium (MTT) après trois jours de traitement.

Souches virales et évaluation de l'activité anti-VIH-1

Les MDM ont été infectés par trois isolats à tropisme macrophagique: la souche de référence VIH-1/Ba-L et deux isolats primaires, VIH-1-DAS et VIH-1-THI. Tous ces virus ont été amplifiés à l'aide de cellules mononucléées du sang ombilical activées par la PHA-P. Les surnageants ont été ultracentrifugés afin d'éliminer les facteurs solubles, comme les cytokines [19]. Les culots ont alors été resuspendus dans du milieu de culture, et le titre infectieux a été déterminé au moyen de cellules mononucléées du sang périphérique (CMSP) activées par la PHA-P et de la formule de Kärber [20].

Les MDM ont été infectés par 10 000 TCID₅₀ de chaque souche virale. Ces TCID₅₀ correspondent à une multiplicité d'infection (m.o.i.) de 0,01. Ces cellules ont subi deux types de traitement: elles ont été soit pré-traitées une heure, soit traitées 20 jours après l'infection par la PMS-601. Tous les trois à quatre jours, les surnageants de culture ont été collectés et conservés à -20 °C, et le milieu de culture renouvelé. La réplication virale a été mesurée en dosant l'activité de la transcriptase inverse (TI) dans les surnageants de culture à l'aide de la trousse de dosage RetroSys[®] de la société Innovagen (Lund, Suède).

Quantification du nombre de copies d'ADN proviral

Le nombre de copies d'ADN de VIH-1/Ba-L a été déterminé dans les macrophages par amplification génique (PCR) 24 heures après l'infection, en utilisant des amorces spécifiques du gène *gag* (SK38-SK39). Les MDM ont été lavés et lysés par le réactif DNA NOW (Biogentex, USA). L'ADN cellulaire a été extrait suivant des méthodes préalablement décrites [19]. Une gamme d'ADN de cellules 8E5 contenant deux copies du génome de VIH-1 a été amplifiée en parallèle des échantillons d'intérêt dans le but de réaliser une courbe d'étalonnage. Le gène *PrPN* a servi de gène rapporteur. Les produits d'amplification ont été séparés au moyen d'un gel d'agarose et révélés à l'aide du bromure d'éthidium. Les bandes spécifiques ont été visualisées et enregistrées à l'aide d'un transilluminateur (UVP Life Sciences, Cambridge, RU) et l'intensité de chacune quantifiée par un logiciel d'analyse d'image (NIH 1.2., W. Rasband NIH, Bethesda, USA).

Effets de la PMS-601 vis-à-vis du récepteur CD4 et du co-récepteur CCR5 du VIH

L'expression du récepteur CD4 et du co-récepteur CCR5 a été mesurée à la surface des MDM à l'aide des anticorps monoclonaux spécifiques Leu3a et 2D7, et d'une analyse de la fluorescence à l'aide d'un cytomètre en flux (FACScan). Les cellules ont été

préalablement traitées pendant 48 heures par 100 µM de la molécule. Par ailleurs, l'interaction directe avec ces récepteurs a été évaluée en incubant les cellules simultanément avec les anticorps et la molécule.

Effets anti-inflammatoires de la PMS-601

Les effets de la PMS-601 sur la synthèse du PAF et des cytokines pro-inflammatoires ont été déterminés au moyen de trousse de dosage spécifiques; le PAF, dans un milieu de culture contenant 1 % de SVF, à l'aide du kit SPA de la société Amersham (France); MIP-1α, MIP-1β et RANTES au moyen des trousse commercialisées par la société R&D et le TNF-α au moyen de celle commercialisée par la société Immunotech. Les monocytes ont été stimulés par 100 mg/mL d'un lipopolysaccharide bactérien (LPS, *Escherichia coli* serotype 0111: B4; Sigma) et les milieux de culture prélevés deux heures après.

Analyse des résultats

L'ensemble des expériences a été réalisé en duplicata ou en triplicat et répété au moins une fois à l'aide de cellules isolées d'autres donneurs. Les doses effectrices 50 % ont été calculées en cumulant les activités TI sur toute la cinétique de réplication virale, et en utilisant le programme informatique développé par J. et T.C. Chou. Les données ont été statistiquement analysées par un test *t* non apparié de Student. Les différences ont été considérées comme significatives pour un $p \leq 0,01$ (**) ou un $p \leq 0,05$ (*).

RÉSULTATS

Effet de la PMS-601 sur le niveau d'infection des MDM par le VIH et sur la réplication virale

La souche de référence VIH-1/Ba-L et les isolats primaires VIH-1-DAS et VIH-1-THI [19] répliquent efficacement dans les MDM; la production virale est optimale entre les jours 20 et 25 après l'infection (figure 1A). Dans nos conditions expérimentales, l'AZT à 100 mM inhibe totalement la réplication virale. De même, la PMS-601 inhibe, de façon dose-dépendante, la réplication virale en l'absence de toute cytotoxicité (résultats non présentés). Aucune réplication virale n'a pu être détectée lorsque les cellules ont été traitées par 100 µM de la PMS-601. Les doses effectrices 50 % sont proches de 10 µM pour les trois souches virales et l'index de sélectivité proche de 100; aucune cytotoxicité n'a été mise en évidence dans les cultures traitées jusqu'à des doses de 1 mM.

Les effets de la molécule sur les phases précoces et tardives du cycle biologique du VIH ont été ensuite

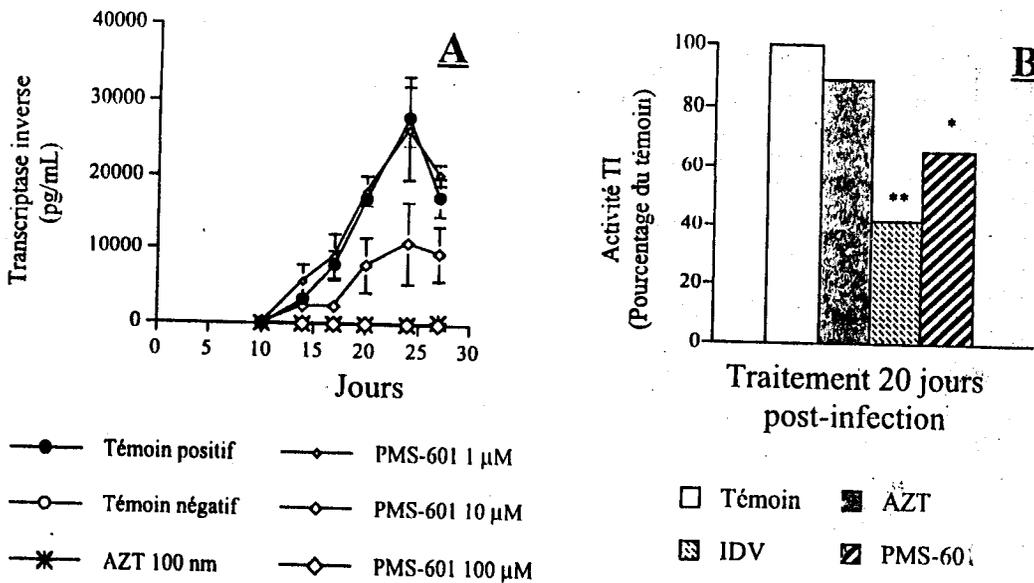


Figure 1. Activité antivirale de la PMS-601 vis-à-vis de MDM infectés par l'isolat de référence VIH-1/Ba-L. Les MDM ont été infectés par 0,01 m.o.i. de la souche virale. A : Effet-dose de la PMS-601 sur la cinétique de répllication virale. B : Effets de la PMS-601 (100 µM), de l'AZT (10 µM) et de l'IDV (10 µM) sur la production virale dans les macrophages chroniquement infectés ; les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin positif. Ces expériences ont été réalisées en triplicat et répétées à l'aide des cellules de deux autres donneurs (témoin positif : MDM infectés et non traités ; témoin négatif : MDM non infectés).

recherchés. D'une part, les macrophages infectés par la souche VIH-1/Ba-L ont été traités par 100 µM de la PMS-601 20 jours après le début de l'infection, lorsque la production virale est optimale. Un traitement durant 24 heures par 10 µM d'AZT ne perturbe pas la production de particules virales, tandis qu'un inhibiteur de la protéase virale comme l'indinavir diminue de 60 % la production virale. Dans ces conditions expérimentales, la PMS-601 diminue la production virale de 30 % (figure 1B), suggérant un effet de la molécule sur des phases tardives du cycle biologique du VIH.

D'autre part, les MDM ont été prétraités et le nombre de copies provirales quantifié par PCR. Dans ces conditions expérimentales, l'AZT inhibe totalement la synthèse d'ADN proviral. Le traitement par 100 µM de PMS-601 diminue d'environ 80 % le nombre de copies d'ADN proviral par rapport aux cellules non traitées (figure 2), suggérant que la molécule PMS-601 interagit également avec une des phases précoces du cycle biologique du VIH.

Effets de la PMS-601 vis-à-vis du récepteur CD4 et du co-récepteur CCR5 du VIH

Afin de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de la diminution du nombre de copies d'ADN proviral, nous avons recherché une éventuelle inter-

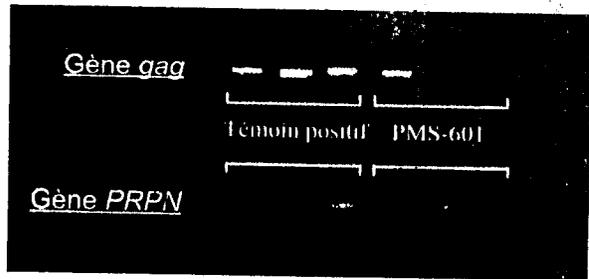


Figure 2. Synthèse des ADN proviraux dans des MDM infectés par la souche VIH-1/Ba-L et traités ou non par la PMS-601 (100 µM). Les MDM ont été infectés par 0,1 m.o.i. Cette expérience a été répétée une fois, et les résultats obtenus sont identiques (témoin positif : MDM infectés et non traités).

action de la molécule avec le récepteur CD4 et le co-récepteur CCR5 du VIH ainsi qu'un effet du traitement sur l'expression de ces récepteurs à la surface des MDM (figure 3). En effet, une interaction directe avec l'un de ces récepteurs, voire une modulation de leur expression, pourrait conduire à une diminution de l'entrée des particules virales dans la cellule cible. Aucune interaction de la PMS-601 avec le récepteur CCR5 ni aucune modulation significative de l'expression de ce récepteur à la surface des MDM n'a cependant été observée. En revanche, une

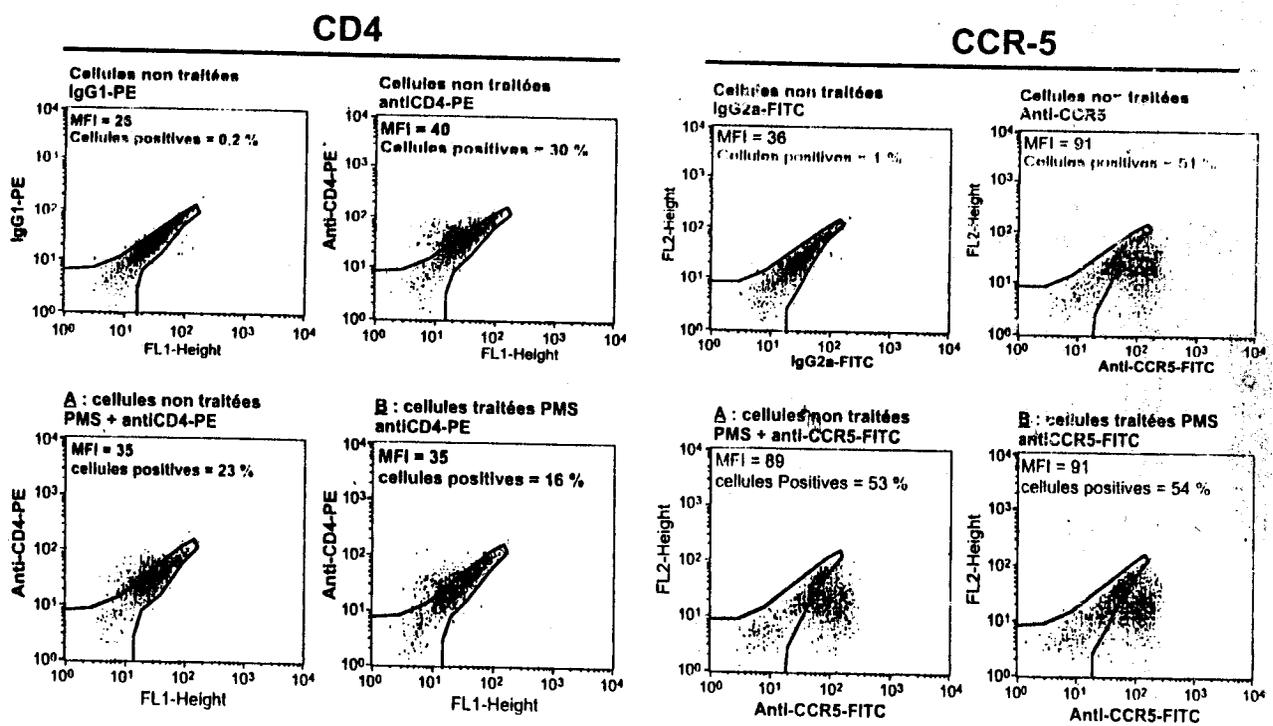


Figure 3. Effets de la PMS-601 sur le récepteur CD4 et le co-récepteur CCR5 à la surface des MDM. A : les cellules ont été incubées simultanément avec la PMS-601 (100 μ M) et les anticorps ; B : les cellules ont été traitées trois jours par la PMS-601 puis incubées avec les anticorps. Cette expérience a été réalisée en duplicat et répétée à l'aide des cellules d'un second donneur. Les résultats obtenus avec ce second donneur sont identiques.

diminution significative de la moyenne de fluorescence mesurée pour les macrophages traités simultanément par l'anticorps anti-CD4 et la PMS-601 a été constatée. De plus, l'expression de ce récepteur à la surface cellulaire est diminuée par un traitement de trois jours.

Propriétés anti-inflammatoires de la PMS-601

Le PAF et les cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle important dans les désordres neurologiques liés au VIH. De plus, la réplication virale est contrôlée en partie par ces médiateurs de l'inflammation. Les effets de la PMS-601 sur la synthèse de ces facteurs cellulaires ont donc été évalués dans des monocytes stimulés avec un LPS bactérien et dans des MDM. Dans les monocytes stimulés par le LPS, la synthèse du TNF- α , MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES est significativement diminuée, respectivement de 27 %, 29 %, 17 % et 42 % (figure 4). Dans les cultures de MDM, la synthèse de PAF diminue de 22 % avec la PMS-601. De plus, l'effet sur la synthèse des chimiokines pro-inflammatoires est plus importante avec une diminution de 66 %, 60 % et 44 % respectivement pour MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES.

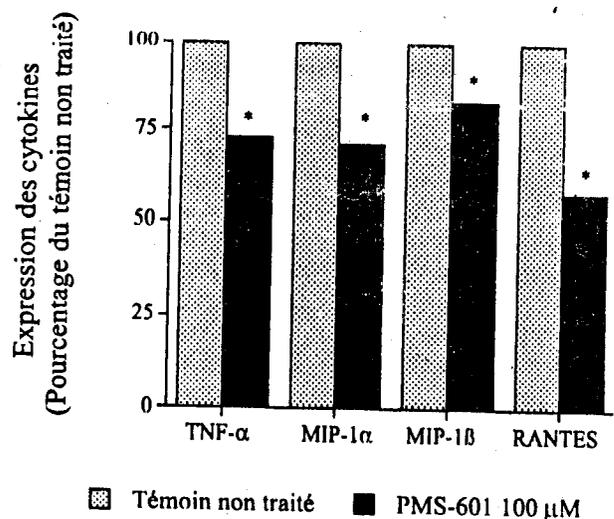


Figure 4. Effets de la PMS-601 sur la synthèse des cytokines pro-inflammatoires dans les monocytes. Les cellules ont été traitées par 100 μ M de la molécule puis stimulées par 100 ng/mL de LPS. Les cytokines ont été dosées dans les surnageants de culture deux heures après le début du traitement. Les résultats sont exprimés en pourcentage du témoin non traité. Cette expérience a été réalisée une seconde fois avec les cellules d'un autre donneur et les résultats sont strictement superposables.

DISCUSSION

L'utilisation des polychimiothérapies antirétrovirales dans le traitement des patients infectés par le VIH a permis de mieux contrôler la réplication virale et de diminuer l'incidence du sida et la mortalité liée à ce syndrome, tout du moins dans les pays développés [21]. Cependant, il est aujourd'hui admis que ces puissantes thérapies ne permettent pas l'éradication du virus :

- dans les lymphocytes T CD4⁺ infectés de façon latente ;
- dans des tissus tels que le SNC.

Leur faible biodisponibilité peut expliquer cet échec au niveau tissulaire mais également celui vis-à-vis des désordres neurologiques associés au VIH [22]. Il semble donc aujourd'hui intéressant de rechercher et de développer des traitements permettant de diminuer la réplication virale et les processus inflammatoires et neurotoxiques dans le SNC.

Les activités anti-VIH et anti-inflammatoires de la PMS-601, démontrées *in vitro* lors de cette étude, pourraient faire de cet antagoniste du récepteur au PAF un excellent candidat comme traitement adjuvant aux antirétroviraux. En effet, la PMS-601 présente une activité antivirale significative vis-à-vis de plusieurs isolats viraux à tropisme macrophagique, elle diminue le nombre de copies d'ADN proviral dans les MDM, et elle interagit aussi bien lors des phases précoces que tardives du cycle biologique du VIH. De plus, son antagonisme du PAF et ses capacités à inhiber la synthèse du TNF- α et des β -chimio-cines laissent supposer une capacité à diminuer les processus inflammatoires, dont les cellules de la lignée macrophagique sont la source principale. Or, la réplication virale comme les processus neurotoxiques sont, pour une part, dépendants de ces signaux pro-inflammatoires environnants [3, 12, 13, 23]. Par ailleurs, cette molécule potentialise l'activité antivirale de l'AZT dans les MDM, et les résultats d'une étude récente avec un autre antagoniste du PAF, le lexipafant, administré à des patients séropositifs présentant des troubles neurologiques [24], confortent son éventuelle utilisation comme thérapie adjuvante aux antirétroviraux actuellement utilisés en clinique.

REMERCIEMENTS

Les auteurs souhaitent remercier le centre de transfusion sanguine des armées (CTSA, Clamart, France), le service de cytophèrese de l'hôpital Saint-Louis (Paris, France), et la maternité Sainte-Félicité (Paris, France).

Ces études ont été soutenues par l'Agence nationale de recherches sur le sida (ANRS, Paris, France), la Fondation pour la recherche médicale (FRM-Sidaction, Paris, France), l'institut de formation supérieure biomédicale (IFSBM, Villejuif, France), et l'Association pour la recherche en neurovirologie (ARN, Griseilles, France).

RÉFÉRENCES

- 1 Gray F, Scaravilli F, Everall I, et al. Neuropathology of early HIV-1 infection. *Brain Pathol* 1996; 6 Suppl 1: 1-15.
- 2 McArthur JC. Neurologic manifestations of AIDS. *Medicine (Baltimore)* 1987; 66 Suppl 6: 407-37.
- 3 Gendelman HE, Zheng J, Coulter CL, et al. Suppression of inflammatory neurotoxins by highly active antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus-associated dementia. *J Infect Dis* 1998; 178 Suppl 4: 1000-7.
- 4 Glass JD, Fedor H, Wesselingh SL, McArthur JC. Immunocytochemical quantitation of human immunodeficiency virus in the brain: correlations with dementia. *Ann Neurol* 1995; 38 Suppl 5: 755-62.
- 5 Zheng J, Gendelman HE. The HIV-1 associated dementia complex: a metabolic encephalopathy fueled by viral replication in mononuclear phagocytes. *Curr Opin Neurol* 1997; 10 Suppl 4: 319-25.
- 6 Gallo P, Frei K, Rordorf C, Lazdins J, Tavolato B, Fontana A. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of the central nervous system: an evaluation of cytokines in cerebrospinal fluid. *J Neuroimmunol* 1989; 23 Suppl 2: 109-16.
- 7 Keller W, McArthur JC, Nance-Sproson T, McClernon D, Griffin DE. Beta-chemokines MCP-1 and RANTES are selectively increased in cerebrospinal fluid of patients with human immunodeficiency virus-associated dementia. *Ann Neurol* 1998; 44 Suppl 5: 831-5.
- 8 Tyor WR, Glass JD, Griffin JW, et al. Cytokine expression in the brain during the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Neurol* 1992; 31 Suppl 4: 349-60.
- 9 Heyes MP, Brew BJ, Saito K, et al. Inter-relationships between quinolinic acid, neuroactive kynurenic acids, neopterin and beta 2-microglobulin in cerebrospinal fluid and serum of HIV-1-infected patients. *J Neuroimmunol* 1992; 40 Suppl 1: 71-80.
- 10 Miguez R, Palacios I, Navarro F, et al. Anti-inflammatory effect of a PAF receptor antagonist and a new molecule with antiproteinase activity in an experimental model of acute urate crystal arthritis. *J Lipid Mediat Cell Signal* 1996; 13 Suppl 1: 35-49.
- 11 Dubois C, Bissonnette E, Rola-Pleszczynski M. Platelet-activating factor (PAF) enhances tumor necrosis factor production by alveolar macrophages. Prevention by PAF receptor antagonists and lipoxygenase inhibitors. *J Immunol* 1989; 143 Suppl 3: 964-70.
- 12 Mellors JW, Griffith BP, Ortiz MA, Landry ML, Ryan JL. Tumor necrosis factor-alpha/cachectin enhances human immunodeficiency virus type 1 replication in primary macrophages. *J Infect Dis* 1991; 163 Suppl 1: 78-82.
- 13 Vyakarnam A, McKeating J, Meager A, Beverley PC. Tumor necrosis factors (alpha, beta) induced by HIV-1 in peripheral blood mononuclear cells potentiate virus replication. *AIDS* 1990; 4 Suppl 1: 21-7.
- 14 An SF, Gray F, Scaravilli F. Programmed cell death in brains of HIV-1-positive pre-AIDS patients. *Lancet* 1995; 346 Suppl 8979: 911-2.
- 15 Le Naour R, Raoul H, Mabondzo A, Menin Y, Bousseau A, Dormont D. Treatment of human monocyte-derived macrophages with a TNF alpha synthesis inhibitor prior to HIV1

- infection: consequences on cytokine production and viral replication. *Res Virol* 1994 ; 145 Suppl 3-4 : 199-207.
- 16 Perry SW, Hamilton JA, Tjoelker LW, et al. Platelet-activating factor receptor activation. An initiator step in HIV-1 neuropathogenesis. *J Biol Chem* 1998 ; 273 Suppl 28 : 17660-4.
- 17 Weissman D, Poli G, Bousseau A, Fauci AS. A platelet-activating factor antagonist, RP 55778, inhibits cytokine-dependent induction of human immunodeficiency virus expression in chronically infected promonocytic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 Suppl 6 : 2537-41.
- 18 Clayette P, Dereuddre-Bosquet N, Martin M, Fretier P, Dormont D. Effects of RP 55778, a tumor necrosis factor alpha synthesis inhibitor, on antiviral activity of dideoxynucleosides. *Antimicrob Agents Chemother* 1997 ; 41 Suppl 4 : 875-7.
- 19 Dereuddre-Bosquet N, Clayette P, Martin M, et al. Lack of interleukin-10 expression in monocyte-derived macrophages in response to in vitro infection by HIV type 1 isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997 ; 13 : 961-5.
- 20 Kärber G. Beitrag zur Kollektiven Behandlung Pharmakologischer Reihenversuche. *Arch Exp Pathol Pharmacol* 1931 ; 162 : 956-9.
- 21 Brodt HR, Kamps BS, Gute P, Knupp B, Staszewski S, Helm EB. Changing incidence of AIDS-defining illnesses in the era of antiretroviral combination therapy. *AIDS* 1997 ; 11 Suppl 14 : 1731-8.
- 22 Dore GJ, Correll PK, Li Y, Kaldor JM, Cooper DA, Brew BJ. Changes to AIDS dementia complex in the era of highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 1999 ; 13 Suppl 10 : 1249-53.
- 23 Kelly MD, Naif HM, Adams SL, Cunningham AL, Lloyd AR. Dichotomous effects of beta-chemokines on HIV replication in monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol* 1998 ; 160 Suppl 7 : 3091-5.
- 24 Schifitto G, Sacktor N, Marder K, et al. Randomized trial of the platelet-activating factor antagonist lexipafant in HIV-associated cognitive impairment. *Neurological AIDS Research Consortium. Neurology* 1999 ; 53 Suppl 2 : 391-6.