

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de L'enseignement Supérieur et de La Recherche Scientifique

Université Ferhat Abbas-Sétif 1
Faculté de Technologie
Département de Génie des Procédés

Thèse

Présentée par

Mr. Hellal Abdelkader

En vue de l'Obtention du Titre de

Docteur en sciences

Option: Génie des Procédés Pharmaceutiques

Thème

*Synthèse d'une nouvelle génération de phosphonates à base des dérivés
aminophénols.*

*Applications : Etudes des propriétés biologiques des composés obtenus et de
leurs complexes*

Soutenue le 30/04/2106

Devant le Jury composé de:

Président: N.CHELLALI

Professeur

U.B.BA

Rapporteur: S.CHAAFAA

Professeur

U.F.ABBAS. Sétif 1

Examinatrice: S.SAIDI BESBES

Professeur

U.Oran 1

Examinatrice: M.EL KOLLI

Professeur

U.F.ABBAS. Sétif 1

Examineur: A.DJEBAIL

Professeur

U.H.L.Batna

Examineur: M.BOUNEKHEL

Professeur

U.F.ABBAS. Sétif 1

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Laboratoire d'Electrochimie des Matériaux Moléculaire et Complexes (LEMMC) sous la responsabilité du Professeur S.CHAFAA. Mes remerciements s'adressent à vous Mr. Pr. Chafaa Salah à qui ce travail a vu le jour, vous m'avez durement mené, vous m'avez guidé sans relâche malgré que de fois je baissais les bras mais vous étiez là et toujours là depuis le premier jour jusqu'au dernier, je ne saurai comment vous remercier. Mr. Chafaa consacra son temps à ce travail même parfois je brillais par le retard il était toujours là à m'attendre, il s'épuisa mais ne lâcha pas prise de cela me fut née un grand enseignement qui est la patience, le sérieux et la persévérance. Mr. Chafaa je ne saurai en dehors de mille fois merci sinon je prierai le tout miséricordieux et tout miséricordieux pour gratifier d'avantage dans cette vie et dans une autre.

Je suis honoré que Monsieur N.CHELLALI Prof. à l'Université de Bordj Bou-Arréridj, ait accepté de présider le jury de ma thèse. Je le remercie chaleureusement. Je remercie aussi Madame Meriem ElKolli Merbah Prof. à l'Université Ferhat Abbas de Sétif, Madame S.SAID BESBES, Prof. à l'Université de Oran 1, Monsieur A.DJEBAILI, Prof. à l'Université BATANA et Monsieur M.BOUNEKHEL Prof. à l'Université Ferhat Abbas de Sétif, d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse en qualité d'examineurs. Que leurs remarques et leurs critiques soient les bienvenues.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Madame Couache et tous les membres de laboratoire de biochimie à Médéa pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Je tiens à le remercier tout particulièrement pour sa confiance, son soutien ainsi que ses précieux conseils qui ont contribué à la réalisation de la partie biologique de ce travail.

J'adresse une pensée affectueuse à tous mes frères et sœurs qui m'ont aidé par leurs conseils et leur bonne humeur à mener à bien ce travail au quotidien: Surtout Mmes Boudejmaa, Rechidi, Djamel, Nadjib, Fayssal de Sétif, Fayssal de Bouira, Misoum de Médéa, Hakim de Boumerdes et Sadek de Tébessa.

Enfin, je tiens également à remercier ma famille :ma mère, mon père, mes sœurs : Saliha et Zahia et mes frères : Amar et Sofiane, et surtout ma femme qui ont tous su me faire confiance et me soutenir en toutes circonstances.

.....Abdelkader

Dédicace

Avec un grand respect, je tiens à dédies ce travail :

A ma mère, qui depuis ma naissance, n'a cessé de me bercer avec des bons conseils et sans doute celle qui me réconforte et m'encourage dans les moments les plus difficiles de ma scolarité.

« J'espère ma mère que je serai toujours à la hauteur de tes attentes »

A Mon père, celui qui ne se lassait jamais pour aménager tous ses efforts pour que je sois quelqu'un dans la vie. Pour lui, l'instruction est le socle fondamental de ses enfants.

« J'espère mon père que tu es fier de ton fils »

A ma femme qui m'a toujours poussé et motivé dans mes études. Sans elle, je n'aurais certainement pas fait d'études longues.

A ma petite chère et adorable « Meriem »

A Mes chères sœurs Saliha et Zahia, et Mes chers frères Amar et Sofiane qui n'ont jamais été absents dans les moments sublimes de ma scolarité,

A tous mes oncles, mes tantes, mes cousins et mes cousines.

A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin pour réaliser ce travail.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
-----------------------	---

CHAPITRE I

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES SUR :

A) Les phosphonates, les acides aminophosphoniques et leurs esters aminophosphonates

I.A1. Introduction	5
I.A2. les composés organophosphorés	6
I.A3. Les phosphonates	8
I.A3.1 Les phosphonates dans la nature	9
I.A3.2 Utilisations des phosphonates	10
I.A3.2.1 Dans l'agriculture	10
I.A3.2.2 Dans la médecine	12
I.A4. Les acides α -aminophosphoniques et leurs esters α -aminophosphonates	15
I.A4.1 Propriétés générales	15
I.A4.2 Synthèse des aminophosphonates	17
I.A4.2.1 La réaction de Kabachnik-Fields (phospha-Mannich)	18
I.A4.2.2 La réaction de Pudovik -Kabachnik	23
I.A4.2.3 La réaction de Mitsunobu	24
I.A4.2.4 Autre réactions	24

B) Activités biologiques des acides α -aminophosphoniques et leurs esters

I.B1 Introduction	26
I.B2 Inhibiteurs enzymatiques	26
I.B3 Pouvoir agonistes et antagonistes	28
I.B4 L'activité inhibitrice	30
I.B5 Autres activités biologiques	31

Chapitre II:

Partie expérimentale

Partie A

Synthèses et caractérisations d'acides α -aminophosphoniques

II.A.1 Objectif stratégique	37
II.A.2 Produits chimiques/Instrumentation	37
II.A.3 Stratégie de synthèse	38
II.A.4 Méthodes d'analyse	38

Partie B

Etude théorique des molécules synthétisées par la méthode DFT

II.B.1 Introduction	39
II.B.2 Théorie de la fonctionnelle de la densité "DFT"	39

Partie C	
<i>Evaluation de l'activité antioxydante des acides α-aminophosphoniques</i>	
II.C.1 Introduction	41
II.C.2 Matériels et réactifs	41
II.C.3.1 Méthodes	42
II.C.3.1.1 Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil)	42
II.C.3.1.2 Test au β -carotène/ Acide Linoléique	42
II.C.3.1.3 Chélation du fer ferreux	43
II.C.3.2 Analyses Statistiques	43
Partie D	
<i>Détermination de l'activité antibactérienne et antifongique</i>	
II.D.1 Introduction	44
II.D.2 Matériels et réactifs	44
II.D.3 Les germes à testés	44
II.D.4 Technique de disque	45
II.D.5 Détermination de la CMI, la CMB et la CMF	46
II.D.6 Evaluation du pouvoir bactéricide et bactériostatique	47
II.D.7 Activité antifongique	47
II.D.8 Analyses statistiques	47
RESULTATS ET DISCUSSION	
CHAPITRE III :	
<i>Synthèses et caractérisations</i>	
III.1 Introduction	50
III.2 Détermination des propriétés physiques des produits synthétisés	50
III.3 Caractérisation des produits synthétisés	52
III.4 Conclusion	71
CHAPITRE IV :	
<i>A) Calculs théorique d'acides aminophosphoniques par la méthode DFT</i>	
IV.A.1 Introduction	72
IV.A.2 Optimisation des structures	72
IV.A.3 Analyse vibratoire	77
IV.A.4 Analyse des Charges de Mulliken	83
IV.A.5 Le Potentiel Electrostatique Moléculaire PEM	86
IV.A.6 Les orbitales moléculaires	88
IV.A.7 Indices de réactivité	90
IV.A.8 Propriétés thermodynamiques	94
IV.A.9 Conclusion	98
<i>B) Etude qualitative de la relation structure-propriétés</i>	
IV.B.1 Introduction	101
IV.B.2. Les propriétés QSAR qui caractérisant la structure moléculaire	101

IV.B.3. Les propriétés « drug-like »	104
IV.B.4. Résultats de calculs	105
IV.B.5. Risques de toxicité	109
IV.B.6. Conclusion	110

CHAPITRE V :

A) Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique

V.A.1 Introduction	113
V.A.2 Evaluation de l'activité antibactérienne	113
V.A.3 Paramètres de l'activité antibactérienne	123
V.A.4 Evaluation de l'activité antifongique	125
V.A.5 Détermination de la (CMI) et la (CMF)	128
V.A.6 Activité antimicrobienne des complexes : acides α -aminophosphonique/ Cu^{2+}	129
V.A.7 Conclusion	133

B) Détermination de l'activité antioxydante in vitro

V.B1. Introduction	135
V.B2. L'essai de piégeage du radical DPPH $\cdot$	135
V.B3 Méthode du blanchiment du b-carotène:	144
V.B4 Chélation du fer ferreux	152
V.B5 Conclusion	157
CONCLUSION GENERALE	160

LISTE DES FIGURES

Fig.I.1: Structure générale des phosphonates.	8
Fig.I.2: Les phosphates et leurs analogues phosphonates.	8
Fig.I.3: L'acide 2-aminoéthylphosphonique.	10
Fig.I.4: Structure générale des dérivés phosphates / phosphinates/ phosphonates.	11
Fig.I.5: Exemples de quelques insecticides et herbicides à base de la famille « organophosphorés».	11
Fig.I.6: Exemples de quelques médicaments de la famille « organophosphorée».	13
Fig.I.7: La fosmidomycine et ses dérivés.	14
Fig.I.8: Analogues phosphonate-fluorés.	15
Fig.I.9: Structure générale des aminophosphonates.	15
Fig.I.10: Formules structurales des acides aminocarboxyliques et de leurs dérivés.	16
Fig.I.11: Premier inhibiteur enzymatique décrit dans la littérature.	26
Fig.I.12: Lead et nouveaux inhibiteurs.	27
Fig.I.13: Inhibiteurs de deux aminopeptidases à zinc.	27
Fig.I.14: Analogues et homologues phosphoniques de la tyrosine.	27
Fig.I.15: Formules structurales de quelques dérivés de catéchol .	28
Fig.I.16: Antagonistes du récepteur NMDA.	29
Fig.I.17: Antagonistes du récepteur AMPA.	29
Fig.I.18: L-AP4 et agoniste le plus efficace décrite par Sibille.	30
Fig.I.19: Fosmidomycine et un analogue.	30
Fig.I.20: Inhibiteurs faibles décrits par Vincent.	31
Fig.I.21: DOTP.	31
Fig.IV.A6: Courbes de corrélation des fonctions thermodynamiques demAPac.	97
Fig.IV.A7: Courbes de corrélation des fonctions thermodynamiques de oAPac.	97
Fig.IV.A8: Courbes de corrélation des fonctions thermodynamiques de pAPac.	98
Fig.V.A1: Histogramme de comparaison des zones d'inhibition entre les 4AP et le S1 (pAPac).	116
Fig. V.A2: Histogramme de comparaison des zones d'inhibition entre les 3AP et le S2 (mAPac).	117
Fig.V.A3: Histogramme de comparaison des zones d'inhibition entre les 2AP et le S3 (oAPac).	118
Fig.V.A4: Comparaison des pouvoirs inhibiteurs (contres bactéries G+), à différentes concentrations, entre Antibiotique standard/produits synthétisés S1 (pAPac), S2 (mAPac), S3 (oAPac).	119
Fig.V.A5: Comparaison des pouvoirs inhibiteurs (contres bactéries G-), à différentes concentrations, entre Antibiotique standard/produits synthétisés S1 (pAPac), S2 (mAPac), S3 (oAPac).	120
Fig.V.A6: Histogramme de comparaison des zones d'inhibition de 4AP et pAPac.	126
Fig.V.A7: Histogramme de comparaison des zones d'inhibition de 3AP et mAPac.	126
Fig.V.A8: Histogramme de comparaison des zones d'inhibition de 2AP et oAPac.	127
Fig.V.A9: Histogramme de comparaison des zones d'inhibition des acides aminophosphoniques et leurs complexes de cuivre.	131

Fig.V.A10 : Histogramme de comparaison des zones d'inhibition des acides aminophosphoniques et leurs complexes de cuivre.	132
Fig.V.B1: Réduction de l'absorbance des produits testés en fonction des concentrations.	136
Fig.V.B 2: Activité anti-radicalaire en pourcentage (IC%) des acides aminophosphoniques et de standards acide gallique.	137
Fig.V.B3: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour pAPac .	138
Fig.V.B4: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour mAPac .	139
Fig.V.B5: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour oAPac .	139
Fig.V.B6: Histogramme des valeurs des concentrations inhibitrices IC ₅₀ des différents composés en µg/ML.	140
Fig.V.B.7: Corrélation IC ₅₀ -IP des produits testés.	144
Fig.V.B 8: Structure chimique du BHT.	145
Fig.V.B 9: Cinétique de la décoloration du β-carotène induite par oAPac, pAPac, mAPac et le BHT en fonction du temps.	146
Fig.V.B10: Histogramme de comparaison des absorbances des produits testés après 120min.	146
Fig.V.B11: Pourcentages d'inhibition du blanchissement du b-carotène en fonction des concentrations des du BHT et (oPAac, pAPac et mAPac) en fonction du temps.	147
Fig.V.B12: Pourcentage d'inhibition des produits testés après 120min.	148
Fig.V.B13: Pourcentages d'activité d'inhibition de la décoloration du β-carotène en fonction des différentes concentrations utilisées pour BHT, oAPac, mAPac, pAPac .	149
Fig.V.B 14: Histogramme de comparaison des valeurs des concentrations inhibitrices IC ₅₀ des différents composés en µg/ML.	150
Fig.V.B15: Structure chimique du BHT.	151
Fig.V.B16: Corrélation IC ₅₀ -Moment dipolaire des produits testés.	152
Fig.V.B17: Variations des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations.	153
Fig.V.B.18: Activité chélatrice des composés EDTA, oAPac, mAPac et pAPac.	154
Fig.V.B.19: Comparaison de potentiel chélateur des produits testés selon les IC ₅₀ .	156
Fig.V.B20: Relation entre l'électronégativité et le type de liaison.	175

LISTE DES SCHEMAS

Schéma.I.1: Réaction de Moedritzer et Irani	18
Schéma.I.2: Réaction de Kabachnik-Fields	19
Schéma.I.3: Propositions de mécanismes de la réaction de Kabachnik-Fields	20
Schéma.I.4: Mécanisme de formation de “imine” proposé pour la réaction Kabachnik–Fields	21
Schéma.I.5: The “ α -hydroxyphosphonate” mechanism proposed for a Kabachnik–Fields reaction	21
Schéma.I.6: Mécanisme proposé pour la réaction de Kabachnik-Fields	22
Schéma I.7: Réaction de Pudovik sur une imine chirale	23
Schéma I.8: Réaction de Pudovik catalysée par CdI_2	23
Schéma I.9: Réaction de Mitsunobu	24
Schéma I.10: Alkylation énantiosélective	25
Schéma III.1: Séquences réactionnelles de synthèse des acides α -amino-phosphonique	50
Schéma III.2: Voies principales de la réaction de «Irani-Moedritzer »	68
Schéma III.3 : Mécanisme réactionnel proposé pour la formation des acides α -aminophosphoniques	70
Schéma V.A1 : Réactions de synthèse des complexes de cuivre	130
Schéma V.B1: Réaction de réduction du radical libre DPPH•	135
Schéma V.B2: Formation du radical libre Phenolate.	142
Schéma V.B3: Stabilisation du phosphonate par bandes hydrogènes	142

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1 : Classes des COP	7
Tableau III.1: Valeurs rapports frontaux des produits synthétisés	51
Tableau III.2: Aspect et couleur des produits obtenus	51
Tableau III.3: solubilité des produits synthétisés	52
Tableau III.4: Propriétés générales des produits synthétisés	52
Tableau III.5: Principales bandes d'absorption infrarouge des produits synthétisés et de leurs produits de départ	55
Tableau III.6: Résultats des spectres d'absorption électroniques des produits synthétisés	59
Tableau III.7: Résultats de l'analyse élémentaire	67
Tableau III.8: Paramètres de prédiction du mécanisme réactionnel	68
Tableau IV.A1: Données de la structure géométrique Optimisée de oAPac par B3LYP/6-31G(d, p)	74
Tableau IV.A2: Données de la structure géométrique Optimisée de mAPac par B3LYP/6-31G(d, p)	75
Tableau IV.A3: Données de la structure géométrique Optimisée de pAPac par B3LYP/6-31G(d, p)	76
Tableau IV.A4 : Comparaison des valeurs expérimentales et théoriques de fréquences (cm^{-1}), intensités des pics, A^{IR} (km/mol) de mAPac , oAPac and pAPac	82
Tableau IV.A5 : Charges atomique Mulliken calculés par B3LYP/6-31G(d,p) pour mAPac , oAPac et pAPac .	83
Tableau IV.A6: Comparaison des énergies HOMO, LUMO, écarts énergétiques (HOMO/LUMO) et propriétés moléculaires de mAPac , oAPac et pAPac (eV)	92
Tableau IV.A7: Calculs par B3LYP/6-31G(d, p) des moments dipolaires électriques (Debye), polarisabilité (a.u), composants β_x et β_{tot} de mAPac , oAPac et pAPac	94
Tableau IV.A8 : Paramètres thermodynamiques Calculés de pAPac , mAPac et oAPac par B3LYP/ 6-31G (d, p)	95
Tableau IV.A9: Variations des propriétés thermodynamiques en fonction de températures pour mAPac , oAPac et pAPac	96
Tableau IV.B1: Calculs des propriétés moléculaires et drogues Likeness par Molinspiration et Molsoft	106
Tableau IV.B2: Les résultats de scores de bioactivité prédites par Molinspiration	108
Tableau IV.B3: Risques de toxicité calculés par Osiris	110
Tableau V.A1: Diamètres (mm) des zones d'inhibition de 4AP, pAPac et le contrôle positif	114
Tableau V.A2: Diamètres (mm) des zones d'inhibition de 3AP, mAPac et le contrôle positif	114
Tableau V.A3: Diamètres (mm) des zones d'inhibition de 2AP, oAPac et le contrôle positif	115
Tableau V.A4: Concentration Minimale Inhibitrice(CMI) et bactéricide (CMB) de oAPac, mAPac, pAPac, 4AP, 2AP et 3AP	124
Tableau V.A5: Diamètre d'inhibition (mm) de oAPac, mAPac, pAPac, 4AP, 2AP, 3AP et le standard « Nystatin »	125
Tableau V.A6: Concentrations minimales inhibitrice (CMI), Concentrations minimales fongicide (CMF) et rapport CMF/CMI des oAPac, mAPac, pAPac, 2AP, 3AP et 4AP	128

Tableau V.A7: Diamètres (mm) des zones d'inhibition des acides aminophosphoniques et leurs complexes de cuivre	131
Tableau V.A8 : Diamètres (mm) des zones d'inhibition des acides aminophosphoniques et leurs complexes de cuivre	131
Tableau V.B1: Valeurs des IC ₅₀ trouvées pour composés étudiée	140
Tableau V.B2: Activités Scavenging et valeurs d'IC ₅₀ de (oAPac, pAPac, mAPac) et le standards AG	141
Tableau V.B3: Les valeurs de PI et IC ₅₀ de composés étudiés	144
Tableau V.B4: Variation des absorbances et des pourcentages d'inhibition des mAPac, oAPac et pAPac en fonction du temps	145
Tableau V.B5: Valeurs des IC ₅₀ trouvées pour composés étudiée	150
Tableau V.B6: Valeurs des IC ₅₀ et moments dipolaires correspondant	152
Tableau V.B7: La concentration de chélation de Fe ²⁺ (IC ₅₀) de l'EDTA, oAPac, mAPac et pAPac	155

Abréviations

2AP: Ortho aminophénol.

3AP: Méta aminophénol.

4AP: Para aminophénol.

Abs : Absorbance.

Å : Angström.

ADN: Acide Désoxyribonucléique.

ARN: Acide ribonucléique.

AMPA: Récepteur α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate.

AP-5: Acide Amino-5-phosphonovalérique.

a.u: Unité atomique.

B3LY P: Becke Three Parameters Lee-Yang-Parr.

BHT: 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxytoluène.

°C: Degré Celsius

CCM: Chromatographie sur Couche Mince

CCP: Acide 3-((R)-2-Carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonique

CFU/mL: Colony Forming Unit/ Milliliter

CI50 : Concentration d'inhibition à 50%

CMB : Concentration minimale Bactéricide

CMF : Concentration Minimale Fongicide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

COP : Composé Organophosphoré

Cp : Capacité calorifique

DFT : Density Functional Theory

DopaP: [3, 4-dihydroxy phenylglycine-1-amino-1-(3',4'-acide dihydroxyphenyl) methyl phosphonique]

DPPH : 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl

DMSO: Diméthyle Sulfoxyde

E_{HOMO}: Energy of the Highest Occupied Molecular Orbital

E_{LUMO}: Energy of the Lowest Occupied Molecular Orbital

EOR : Espèce réactives à oxygène

eV : Electron volt

FTIR : Infra Rouge à Transformé de Fourier

HAT: Hydrogen Atom Transfer.

HOMO: Orbitale Moléculaire Haute Occupée.

KA: Récepteurs Acide kaïnique.

PI : Potentiel d'ionisation.

ppm : Partie par million.

IR : Infra-Rouge.

log P : Coefficient de partage.

ℓ : Longueur.

LUMO : Orbitale Moléculaire Basse Occupée.

M : Molaire.

m: Masse.

NMDA : N-méthyl-D-aspartate.

QSAR : Quantitative Structure Activity Relationship.

Rf : Rapport frontal (CCM).

TPK : Tyrosine Protéine-kinases.

pK_a : Constante d'acidité.

RMN : Résonances Magnétique Nucléaire.

TMS : Tétraméthylsilane.

UV : Ultraviolet.

V: Volume.

% : Pourcentage.

α: Alpha.

η : Rendement.

ε_λ : Coefficient d'extinction molaire.

μg : Microgramme.

μ : Moment dipolaire.

χ : Electronegativité.

λ_{max} : Longueur d'onde maximale.

Introduction générale

Découvert en 1669 par H. Brand, le phosphore est l'un des principaux éléments de l'écorce terrestre (environ 0.1%). C'est un macronutriment essentiel pour tous les organismes vivants, il est omniprésent, en tant que constituant moléculaire, aussi bien dans le règne animal et végétal que dans de nombreux composés inorganiques se trouvant à la surface de la terre. Le phosphore représente 2-4% du poids sec de la plupart des cellules; il est incorporé à de larges composés essentiels comprenant acides nucléiques, ATP, phosphoprotéines, phospholipides et des polysaccharides. Dans la plupart de ces composés, le phosphore se trouve dans son état d'oxydation le plus élevé et se présente sous forme de phosphate [1].

Ayant un profil pharmacologique particulièrement intéressant, les phosphonates, composés contenant le phosphore, ont suscité l'intérêt des chercheurs et le nombre d'études concernant leur synthèse ou leur activité biologique ne cesse de croître [2]. La raison d'un tel engouement provient principalement de la différence de stabilité relative des groupements phosphate et phosphonate. En effet, la facilité avec laquelle les phosphates peuvent être hydrolysés, constitue un problème crucial pour la conception d'analogues de molécules biologiquement actives. La faible stabilité métabolique de cette fonctionnalité diminue fortement la biodisponibilité des médicaments et, par conséquent, leur efficacité. La substitution d'un atome d'oxygène par un atome de carbone permet généralement d'accéder à des composés aussi actifs, plus stables et plus lipophiles [1]. Les molécules possédant un groupement phosphonate ont un champ d'activités biologiques très étendu [2].

Les phosphonates sont omniprésents dans la nature et trouvent des applications dans les domaines de l'agriculture, de la médecine et de l'industrie chimique [3]. Les dérivés acides aminophosphoniques constituent une classe importante de composés phosphonates en raison de leurs activités biologiques polyvalentes [4], et qui ont attiré l'attention des chercheurs parce qu'ils sont considérés comme des analogues structuraux des α -aminoacides correspondants. Pendant longtemps, les analogues phosphorés des acides aminés, dans lesquels la fonction acide carboxylique est remplacée par un groupement phosphonique, $P(O)(OH)_2$, ou un groupe phosphinique, $P(O)(OH)R$, ainsi que d'un groupe phosphonate, $P(O)(OR)_2$, ont suscité un intérêt particulier dans la préparation des analogues isostériques ou bioisostériques de nombreux produits naturels [5].

Dans ce domaine, les acides α -aminophosphoniques, analogues bioisostériques d'acides α -aminés, occupent une place importante et révèlent des propriétés biologiques et biochimiques variées et intéressantes, peuvent être considéré comme: pesticides [6], antibiotiques [7], inhibiteurs de la protéase du VIH [8], antiviraux [9] et agents antitumoraux [10].

Compte tenu de l'immense importance des α -aminophosphonates, les tendances des chercheurs au cours des dernières années ont été orientées vers diverses méthodologies pour la synthèse de ces composés [11]. Cependant, beaucoup de ces procédés rapportés présentent des inconvénients tels que la durée de réaction prolongée, l'utilisation de sources coûteuses et dangereuses du phosphore, des températures élevées, la synthèse à des étapes multiples, des quantités stœchiométriques de catalyseur coûteux et des catalyseurs sensibles à l'humidité et ou hautement toxiques, sélectivités faibles des produits, l'utilisation de solvants organiques nocifs, et également impliquer l'utilisation de catalyseurs coûteux qui sont généralement non récupérable. L'utilisation de méthodologies de synthèse non dangereuse pour les réactions organiques est l'un des derniers défis aux chimistes organiciens. Actuellement, les besoins pour utiliser une méthodologie verte dans tous les domaines de la chimie et la préoccupation croissante pour l'environnement exige l'utilisation des procédés respectueux de l'environnement et économiques.

Un grand nombre de procédés pour la préparation de diverses α -aminophosphonates ont été publiés depuis la première synthèse d'aminophosphonates [12]. Cependant, la synthèse *one-pot* d' α -aminophosphonates reste un favori en raison de son parcours polyvalent et les réactions à haut rendement. Dans les dernières décennies, des articles synthétiques intensifs ont été effectués dans la préparation d'acides α -aminophosphoniques et leurs esters [13]. Bien que, la conscience de l'environnement d'aujourd'hui impose, sur les chimistes industriels et académiques, l'utilisation de milieux aqueux comme solvant [14].

En raison des facteurs mentionnés ci-dessus, depuis plusieurs années, les tendances de notre laboratoire (LEMMC), ont été orientées vers la conception, la synthèse et l'étude des effets biologiques, chélatrices, ...etc. des α -aminophosphonates [15-20].

Ce travail de recherche s'articule autour des principaux axes suivants:

Le premier axe porte sur la synthèse, dans un milieu aqueux selon le procédé *d'Irani-Moedritzer*, d'acides α -aminophosphoniques, avec l'objectif d'atteindre de nouveaux α -aminophosphonates,

Le second axe est focalisé sur l'étude théorique par la modélisation moléculaire à l'aide de logiciels adéquats dans le but est de déterminer les réactivités chimiques et les propriétés QSAR des acides α -aminophosphoniques obtenus.

Le troisième axe est basé sur l'exploitation des résultats et des informations de l'étude théorique dans l'étude pratique, *in vitro*, de leurs activités antioxydantes, antibactériens et antifongiques.

Pour réaliser ces objectifs tracés, nous avons établi les chapitres suivants:

La première partie de cette thèse représente une synthèse bibliographique sur le monde des phosphonates, ses dérivés acides α -aminophosphoniques et ses propriétés biologiques (*Chapitre I*).

La seconde partie (*Chapitre II*) est consacrée à une présentation générale de différentes méthodes et logiciels utilisés pour réaliser ces travaux.

En fin, les résultats de différentes études font l'objet de la troisième partie (chapitres III, IV et V). Les résultats que nous présentons dans ce mémoire se rapportent à :

- L'exposition des résultats de la synthèse et de la caractérisation de trois acides α -aminophosphoniques.
- L'étude théorique de la structure et de la réactivité chimique des acides α -aminophosphoniques synthétisés, tout on déterminant certaines propriétés caractéristiques des produits obtenus.
- La prédiction théorique des propriétés QSAR et « *Drug Likeness* » pour les acides α -aminophosphoniques synthétisés ainsi que les produits de départ correspondants.
- On se basant sur les résultats obtenus des parties précédentes, l'évaluation pratique, *in vitro*, de certaines activités biologiques de nos produits, entant qu'antioxydants, antibactériens et antifongique, a été faite.

Enfin, cette thèse est clôturée par une conclusion générale et des suggestions utiles pour la poursuite de ce travail.

Références bibliographies

- [1] J.R. Van Wazer. Phosphorus and its compounds, *Interscience Publishers*, 93(1961).
- [2] a) F.R. Atherton, C.H. Hassal, R.W. Lambert, *J.Med.Chem.*, 29, 29(1986). b) D.F. Wiemer, *Tetrahedron*, vol. 53, 16609(1997) c) R. Engel, *Chem.Rev.*, 77, 349(1977).
- [3] E. Breuer, *The Chemistry of Organophosphorus Compounds*, vol. 4, John Wiley & Sons, New York, New Y., USA (1996).
- [4] R.A. Cherkasov, V.I. Galkin, *Usp.Khim*, 67, 940–968(1998).
- [5] (a) P. Kafarski, B. Lejczak, *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents*, 1, 301(2001); (b) P.Kafarski, B. Lejczak, *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat.Elem.*, 63, 193 (1991); (c) R.L. Hil-derbrand, *The Role of Phosphonates in Living Systems*; CRC: Boca Raton, FL (1983).
- [6] C. Fest and K.J. Schmidt, *The Chemistry of Organophosphorus Pesticides*, vol. 12, *Springer*, (1982).
- [7] M.S. Bhatia, P. Pawanjit, *Experientia*, vol. 32, no. 9, p. 1111(1976).
- [8] A. M.Polozov and S. E.Cremer, *Journal of Organometallic Chemistry*, vol. 646, no. 1-2, pp. 153–160, (2002).
- [9] J. Huang and R. Chen, *Heteroatom Chemistry*, vol. 11, pp. 480–492 (2000).
- [10] G. Lavielle, P. Hautefaye, C. Schaeffer, J.A. Boutin, C.A. Cudennec, A. Pierré, *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 34, no. 7, pp. 1998–2003 (1991).
- [11] (a) L. Maier, *Phosphorus, Sulfur, Silicon Relat. Elem.*, 53, 43 (1990). (b) L. Maier; P. J. Diel, *Phosphorus, Sulfur, Silicon Relat. Elem.*, 57, 57(1991).
- [12] (a) R. Ghosh, S. Maiti, A. Chakraborty, D.K. Maiti, *J. Mol. Catal. A.: Chemical*, 210, 53(2004). (b) A. Heydari; H. Hamadi; Pourayoubi, *M. Catal. Commun.*, 8, 1224(2007).
- [13] V. P. Kukhar; V.P. Solodenko, *Phosphorus, Sulfur and Silicon and Relat. Elem.*, 92, 239(1994).
- [14] H.M.A. Asghar, S.N. Hussain, H. Sattar, E. Pelham, L. Roberts, and N. W.Brown, *Korean Journal of Chemical Engineering*, vol.31, no. 5, pp. 834–840(2014).
- [15] V. Bohmer, W. Vogt, S. Chafaa, J. Meullemestre, M.J. Schwing, F. Vierling, *Helv.Chim. Acta*, 76, 139–149(1993).
- [16] S. Chafaa, PhD. thesis, University Louis Pasteur, Strasbourg (France)(1993).
- [17] F. Benghanem, S. Chafaa, G. Bouet, M.A. Khan, *Phosphorous, Sulfur, Silicon, Relat Elem*, 170,159–169(2001).
- [18] Bentouhami, E., Bouet, G., Khan, M. A. *Phosphorus, Sulfur, Silicon, Relat Elem*, 178, 903–921(2003).
- [19] E. Bentouhami, G. Bouet, M.J. Schwing, M.A Khan, *J. Sol. Chem.*, 35, 889–916 (2006).
- [20] N. Aliouane, S. Chafaa, T. Douadi, J. J. Helesbeux, M.A. Khan, G. Bouet, O. Duval, *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*. Vol. 186, p. 354 – 364 (2011).

CHAPITRE I

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES SUR :

A) Les phosphonates, les acides aminophosphoniques et leurs esters aminophosphonates

I.A1. Introduction

Le phosphore (P) est un élément qui est largement distribué dans la nature. Il est considéré, avec l'azote (N) et le potassium (K), comme un constituant fondamental de la vie des plantes et des animaux. Dans ce qui est peut-être la méthode la plus dégoûtante de découvrir un élément, le phosphore a été isolé pour la première en 1669 par Hennig Brand, médecin et alchimiste allemand, en faisant bouillir, filtrer et traiter jusqu'à 60 seaux d'urine. Maintenant, le phosphore est principalement obtenu à partir de la roche phosphatée ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) [1]. Le phosphore est un élément du groupe V_A de la troisième période du tableau périodique. Son numéro atomique est 15, de structure électronique $(1s^2)(2s^2)(2p^6)(3s^2)(3p^3)$ et de masse atomique 28,0855.

Le phosphore est absent à l'état naturel sous sa forme élémentaire, il est omniprésent en tant que constituant moléculaire, aussi bien dans le monde animal ou végétal que dans de nombreux composés inorganiques se trouvant à la surface de la terre [2].

Le phosphore peut former des liaisons avec de nombreux autres éléments. Il peut également former des liaisons avec un nombre d'atomes (Nombre de coordination) qui peut varier de 1 à 6 et plus. En outre, il peut avoir différentes valences, soit 3 ou 5. Il a des orbitales (d) vides qui acceptent facilement des électrons provenant de bons donneurs. La chimie du phosphore est utilisée dans plusieurs domaines clés. En effet, l'agrochimie est l'un des champs d'applications les plus importants pour les dérivées organophosphorés biologiquement actifs: engrais, insecticides ou herbicides, comme le glufosinate ou le glyphosate [3]. Egalement, la médecine et la pharmacochimie ont largement intégré ces familles de composés.

D'une manière générale, la biologie et la santé sont les témoins d'avancées remarquables en chimie du phosphore. Outre les marqueurs phosphorés utilisés en radio diagnostique, deux aspects semblent prédominer : l'accès à de nouvelles molécules bioactives et le développement d'outils de synthèse. Ceci conduit à l'émergence de nouvelles molécules

aux propriétés antibiotiques, antalgiques, anticancéreuses et antivirales avérées. Utilisés dans des systèmes de filtration, d'échange ioniques ou de séparation de gaz, les matériaux obtenus trouvent aussi des applications en optique, électronique ou en catalyse, notamment dans le craquage des produits pétroliers, et font l'objet d'importance particulière dans le domaine de l'énergie, où ils apparaissent susceptibles de jouer le rôle d'électrolytes solides pour la conduction de protons dans les cellules à carburant. Les dérivés phosphorés, notamment les composés organophosphorés, sont aussi utilisés comme retardateurs de flammes ; par modification de surface ou la formation d'une couche protectrice [3].

I.A2. Les Composés organophosphorés

Un composé organophosphoré (COP) est un type de composé organique comportant au moins un atome de phosphore lié directement à un carbone. Leur mise au point remonte aux travaux de Schader, en Allemagne, en 1934 [4] puis pendant la Seconde Guerre mondiale comme succédanés de la nicotine. La famille des COP est constituée d'une grande diversité de structure aliphatique ou aromatique. La chimie des organophosphorés est la science correspondant à explorer les propriétés et la réactivité des organophosphorés [5].

Les composés organophosphorés se répartissent en différentes classes selon le degré d'oxydation du phosphore et la nature des substituants, notamment la présence d'un atome d'oxygène ou d'un autre chalcogène (Tableau I.1) [6].

Les propriétés physico-chimiques (volatilité, stabilité, solubilité ...etc.), la toxicité et le devenir dans l'environnement des COP sont très variables et dépendent de la nature des substituants (atomes de soufre, oxygène, chaînes latérales ...etc.) liés à l'atome de phosphore et du type de liaisons (covalente ou double liaison) liant le ou les substituants à l'atome de phosphore. Les composés organophosphorés (COP) constituent une importante classe de substances chimiques organiques, ils ont en commun une certaine propriété comme la liposolubilité.

Les organophosphorés sont utilisés actuellement dans la composition des médicaments, détergents, additifs aux dentifrices, insecticides, huiles additives, agents plastifiants, additifs, dans les carburants, agents de flottation, antioxydants, agents ignifuges agents, extractants ou complexants [7].

Le tableau ci-dessous regroupe les différentes classes des COP :

Tableau I.1 : Classes des COP [6].

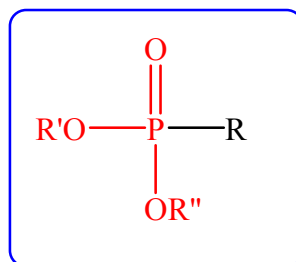
Nombres d'oxydation					
-III	-I	0	+I	+III	+V
Phosphines $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \diagdown \quad / \\ \text{P} \\ \\ \text{H} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{R}_3 \quad \text{R}_1 \\ \\ \text{P} \\ \\ \text{R}_2 \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{R}_3 \quad \text{R}_1 \\ \diagdown \quad / \\ \text{P}^+ \\ \\ \text{R}_2 \end{array}$	Oxyde de phosphine $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}_3 - \text{P} - \text{R}_1 \\ \\ \text{R}_2 \end{array}$	Phosphore P_4 P_6	Acide hypophosphoreux $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H} - \text{P} - \text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$ Acide phosphinique $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}_2 - \text{P} - \text{R}_1 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	Acide phosphoreux $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H} - \text{P} - \text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$ Acide phosphonique $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R}_1 - \text{P} - \text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$ Phosphite $\begin{array}{c} \text{OR}_1 \\ \\ \text{R}_3\text{O} - \text{P} - \text{OR}_2 \end{array}$	Acide phosphorique $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{HO} - \text{P} - \text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$

Les composés organophosphorés s'avèrent très précieux pour la synthèse organique. Outre l'oléfination de Wittig, réaction la plus connue, ils offrent aux chimistes de synthétiser de nombreux outils permettant la réalisation des étapes primordiales pour l'élaboration des molécules cibles. Actuellement utilisés dans de nombreux domaines comme: huiles additives, insecticides [8], agents plastifiants, agents de flottation, additifs dans les carburants, stabilisateurs, antioxydants, agents ignifuges, surfactants [9], antiviraux [10], agents complexant ou extractant [11,12], ...etc. Cependant, les activités biologiques ont donné aux composés organophosphorés leurs développements commerciaux les plus considérables, notamment en tant qu'insecticides. Les champs d'application des phosphates, phosphonates et autres phosphines, sont extrêmement nombreux et touchent pratiquement l'ensemble des aspects de la vie de tous les jours [13].

Parmi les organophosphorés, nous nous sommes intéressés à la famille des phosphonates et notamment les acides aminophosphoniques et leurs esters.

I.A3. Les phosphonates

Les phosphonates sont des composés organophosphorés caractérisés par le groupe $RPO(OR')(OR'')$, dans lequel R , R' et R'' représentent un atome d'hydrogène, un groupement alkyle ou un groupement aryle (Fig.I.1).



R, R', R'' : Hydrogène, Radicaux alkyles ou aryles.

Fig.I.1: Structure générale des phosphonates.

Les phosphonates sont analogues des phosphates naturels (phosphates glycosidiques, nucléotidiques, phospholipides, phosphates produits par la glycolyse), mais ils ont des propriétés chimiques et biologiques différentes, ce qui leur confère des applications biologiques et médicales [14]. Dans ces composés la liaison **P-O** est remplacée par une liaison **P-C** plus stable ce qui empêche leur hydrolyse par les phosphatases. Des données cristallographiques ont permis de prédire les positions relatives des atomes d'oxygène du groupement phosphorylé et d'autres positions fixes pour les groupements phosphate et phosphonate (Fig.I.2) [15].

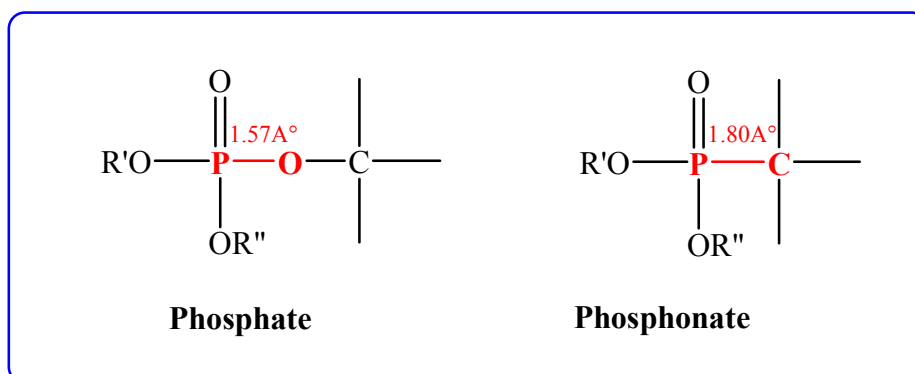


Fig.I.2: Les phosphates et leurs analogues phosphonates [15].

La variation des distances **P-C/P-O** est de 0,8 % seulement, la distance la plus longue étant pour le phosphonate [15]. Le pourcentage de variation des distances entre d'autres points est encore plus faible. Ces calculs ont été réalisés avec plusieurs types de composés, et des variations similaires ont toujours été trouvées. Ainsi, le terme isostérique peut être utilisé. L'encombrement stérique d'un phosphonate est donc très proche de celui d'un phosphate. Toutefois, il faut noter une différence de pK_a entre les deux groupements. En effet, le deuxième pK_a d'un phosphonate est en général de 0,5 à 1,5 unités moins acide que celui d'un phosphate [15]. Les phosphonates peuvent être considérés comme des inhibiteurs des protéine-kinases spécifiques au niveau de la phosphorylation d'une tyrosine (TPK), enzymes impliquées dans la modulation du développement et de la différenciation cellulaire [16,17].

Ces enzymes sont donc des cibles pour la préparation de médicaments anticancéreux. De plus, les phosphonates ont également une application pour la préparation d'anticorps catalytiques [18]. En effet, ils sont utilisés comme mimes de l'état de transition de réactions chimiques (par exemple l'hydrolyse d'esters ou d'amides) [19]. Ces analogues d'états de transition sont ensuite utilisés pour stimuler une réponse immunitaire et permettent la formation d'anticorps stabilisant ces intermédiaires de réaction. Les anticorps ainsi produits sont utilisés comme catalyseurs en synthèse chimique et par exemple peuvent permettre la réduction stéréosélective de cétones prochirales par du $NaBH_3CN$ [20].

I.A3.1 Les phosphonates dans la nature

Les composés possédant une liaison carbone-phosphore dans leur structure sont rares parmi les produits naturels. À ce jour, seulement une vingtaine de phosphonates naturels ont pu être isolés et caractérisés. Ces molécules ont été extraites de microorganismes mais aussi d'animaux terrestres et aquatiques. Cette rareté les rend uniques puisque la plupart parmi eux présentent une activité biologique importante et intéressante. Il est à noter que des propriétés antibactériennes, antivirales, antibiotiques, pesticides ou anticancéreuses ont été observées chez plusieurs composés de ce type. Leur activité serait liée à la nature relativement inerte du lien C-P mais aussi aux similitudes physiques entre les groupements acides phosphoniques, phosphates et acides carboxyliques. Cette dernière caractéristique expliquerait leur capacité à inhiber plusieurs processus enzymatiques [21,22]. Le premier composé naturel isolé contenant un lien C-P est l'acide 2-aminoéthylphosphonique (AEP) (Fig.I.3). Il a été isolé d'un protozoaire pour la première fois en 1959. C'est un des phosphonates les plus abondants dans la nature. En effet, depuis sa découverte, il a été isolé de plusieurs autres sources différentes (invertébrés marins, microorganismes, humains) [23].

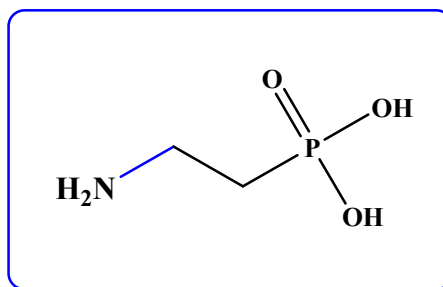


Fig.I.3: L'acide 2-aminoéthylphosphonique.

I.A3.2 Utilisations des phosphonates

Les composés organophosphorés, notamment les phosphonates, ont des applications très répandues dans le monde, principalement dans l'agriculture comme insecticides, herbicides et régulateurs de la croissance des plantes [24]. Ils ont également été utilisés comme agents neurotoxiques dans la guerre chimique et comme agents thérapeutiques, tels qu'écothiopate utilisé dans le traitement du glaucome [25]. Dans les domaines de recherche académiques, les composés organophosphorés trouvent des applications importantes dans la synthèse organique (Wittig, Mitsunobu, Staudinger, organocatalyse, etc.) [26]. L'utilisation de composés organophosphorés comme ligands achiraux ou chiraux pour la transition métal-catalase est aussi une croissance rapide à la fois la synthèse de laboratoire et la production industrielle [27]. De plus, les composés organophosphorés peuvent être utilisés comme retardateurs de flamme pour les tissus et des agents stabilisants dans l'industrie des plastiques, des agents d'extraction sélectifs pour les sels de métaux à partir de minerais, les additifs aux produits pétroliers et à la corrosion comme inhibiteurs [28].

I.A3.2.1 Dans l'agriculture

Pendant des années, de nombreux composés organophosphorés ont été fabriqués et utilisés en très grandes quantités dans l'agriculture, non seulement comme les insecticides mais aussi comme herbicides et dans d'autres applications. Les composés du phosphore ont des avantages distincts dans le marché des pesticides; ils sont relativement faciles à faire, facilement biodégradable par hydrolyse, de sorte que les problèmes de l'activité résiduelle, si grave avec les pesticides d'hydrocarbures chlorés, sont à éviter. Les composés actifs sont des esters normaux, des amides, des thiols ou des dérivés de l'acide phosphorique ou phosphonique:

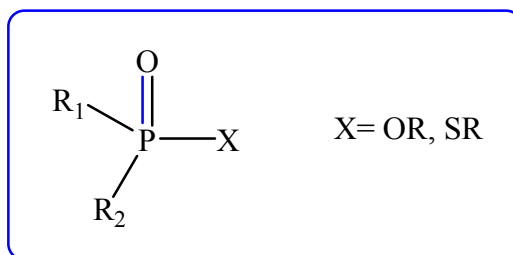


Fig.I.4: Structure générale des dérivés phosphates / phosphinates/ phosphonates.

Dont, R_1 et R_2 sont des groupes alkyle ou aryle généralement simples, qui tous peuvent être liés directement au phosphore (en phosphinates), ou liés par l'intermédiaire d'un groupe -O- ou -S- (dans phosphates), ou bien R_1 peut être lié directement et R_2 , lié par l'intermédiaire de l'un des groupes ci-dessus (phosphonates). Le Parathion (**1**) a été l'un des premiers insecticides produits et commercialisés; sa toxicité (DL_{50}) est de 55mg/kg, ce qui est assez faible, mais nécessite encore une manipulation minutieuse pour l'application sur le terrain. Il était très populaire dans les années 1960, mais après cette période, l'intérêt du Parathion a considérablement diminué avec l'introduction d'agents plus sûrs. Certainement, de nombreux composés sont maintenant produits qui sont relativement inoffensifs pour les humains mais avec une excellente toxicité pour les insectes par exemple l'insecticide de jardin bien connu Malathion (**2**) et Phosmet (**3**) avec DL_{50} jusqu'à 4000 mg/kg (Fig.I.5).

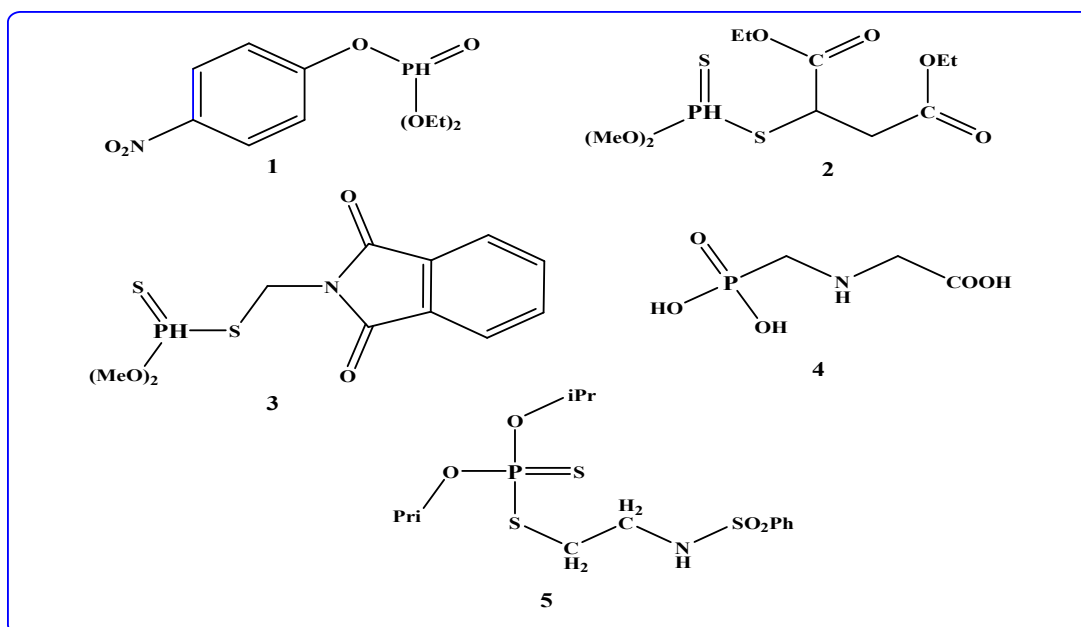


Fig.I.5: Exemples de quelques insecticides et herbicides à base de la famille « organophosphorés ».

D'autre part, les composés du phosphore étaient entrées tardives dans les domaines des herbicides organiques, et à cette date seulement quelques composés ont atteint une grande importance commerciale. Le Glyphosate (4) a été le premier découvert et est encore utilisé (Fig.I.5). Il agit par l'inhibition de l'enzyme de la plante 5-enolpyruvoyl-shikimate-3-phosphate synthétase, qui est impliqué dans la biosynthèse des acides aminés aromatiques et d'autres composés aromatiques dans les plantes. De nombreux autres composés du phosphore présentent une activité herbicide, et beaucoup d'efforts de recherche en cours qui se passe dans ce domaine. En plus des dérivés d'acides aminés contenant du phosphore, d'autres types de structure sont d'un intérêt, tel que l'on voit dans BETASAN (5) (Fig.I.5) [29].

I.A3.2.2 Dans la médecine

Une source de composés (C-P) d'origine naturelle a été reconnue en 1969 [30]. Dans un bouillon de fermentation de la bactérie *Streptomyces fradiae*, un nouvel acide phosphonique qui a des propriétés d'un antibiotique a été isolé. Le composé a été nommé Fosfomycine (6) (Fig.I.6) et sa découverte a été un événement extrêmement important dans la chimie du phosphore. La Fosfomycine est actif contre les bactéries Gram-négatives et Gram-positives, et son efficacité est comparable à celle des antibiotiques bien connus (Tetracycline) [31]. Une activité anticancéreuse de haut niveau a été trouvée dans un grand nombre de composés du phosphore de structure très différents, et il y a beaucoup de recherches en cours dans ce domaine. Probablement le premier composé organophosphoré pour recevoir l'acclamation comme un agent chimio-thérapeutique précieuse est le cyclophosphamide (médicament anticancéreux) (7) (Fig.I.6). Son activité a été découverte en 1958 [32], et reste dans l'utilisation clinique à ce jour [33].

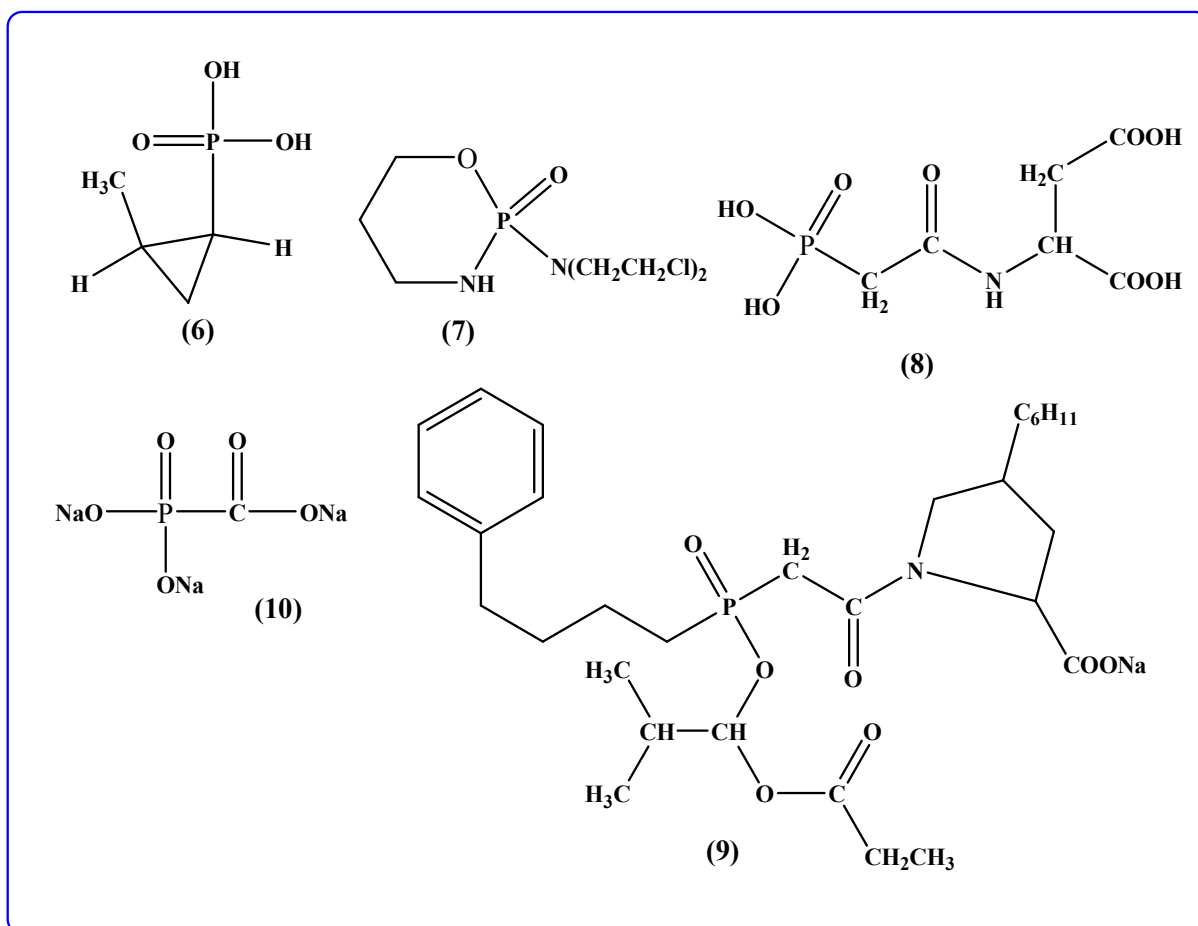


Fig.I.6: Exemples de quelques médicaments de la famille « organophosphorée ».

Dans la conception de médicaments anticancéreux, des justifications ont été faites. La plus évidente est qu'une phosphonate, réplique exacte d'un phosphate biologiquement actif connu, peut inhiber le processus dans lequel le phosphate est impliqué. Le groupe CH_2 attaché à l'atome P a une taille et angle de liaison très similaire avec l'atome d'oxygène d'un phosphate. La grande stabilité de la liaison P-C devrait bloquer tout processus naturels impliquant l'hydrolyse d'un groupe ester de phosphate. Une deuxième raison est qu'un acide phosphonique conçu pour être semblable à un acide carboxylique naturel pourrait inhiber le travail biochimique de l'acide [34]. En utilisant ces concepts, une grande quantité d'acides phosphoniques a été synthétisés et donc avaient des propriétés chimiothérapeutiques utiles. Quelques exemples de la rationalisation ci-dessus sont, le (PALA): (N-phosphono acetyl-Laspartic acid (8) qui est un médicament anticancéreux puissant et le Fosinopril (9) qui a une activité antihypertensive [31]. Les composés de phosphore peuvent aussi avoir une activité antivirale, le premier composé actif découvert a eu la très simple structure du phosphono-formiate trisodique. Son activité a été découverte en 1978 [35], et est encore en

usage clinique sous le nom « Le foscarnet » (10). Il inhibe l'ADN polymérase virale, et il est un agent utile dans le traitement de l'herpès et est également actif contre le VIH.

De nombreux phosphonates, analogues de phosphates naturels, sont des inhibiteurs d'enzymes [36]. Parmi ces molécules, la fosmidomycine (11) et ses dérivés (12) à (14) (Fig.I.7) ont des propriétés antibactériennes et antipaludéennes [37]. De plus, il a été montré que ces composés ont une activité inhibitrice de la DXR, enzyme de la voie du MEP [38].

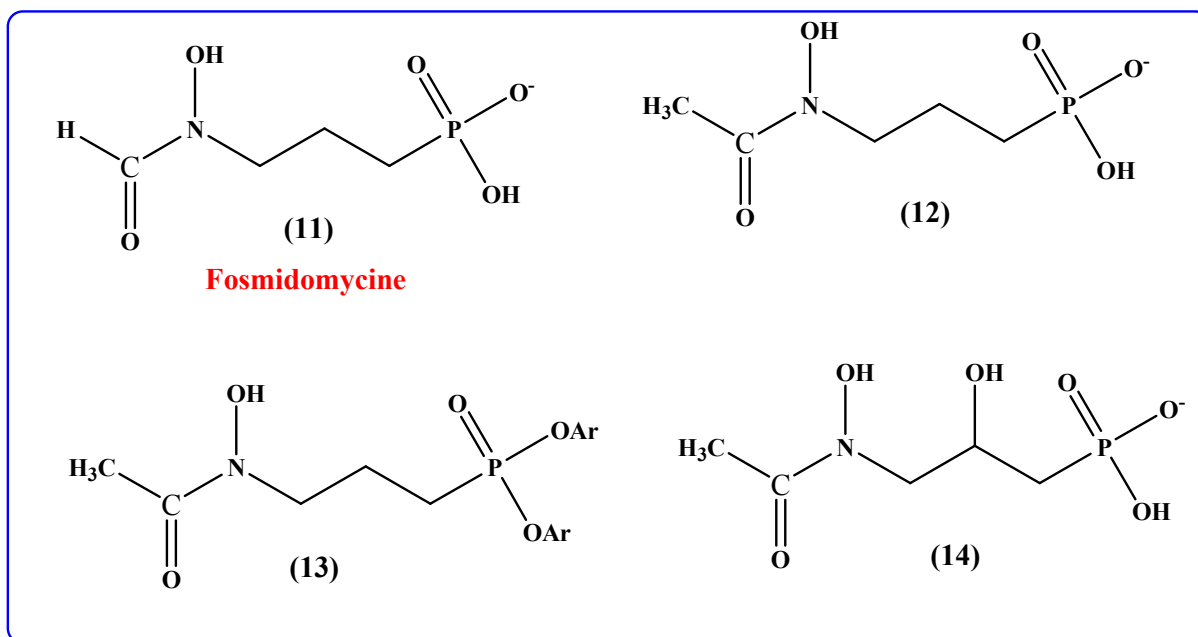


Fig.I.7: La fosmidomycine et ses dérivés [37].

Dans la littérature, des phosphonates comportant des atomes d'halogènes en α (Fig.I.8) du phosphore ont été décrits et possèdent des propriétés biologiques intéressantes [39]. Les phosphonates halogénés, en particulier fluorés, sont en effet des mimes meilleurs de phosphates que les phosphonates non halogénés [40] d'un point de vue isostérique et isopolaire [40].

De plus, de tels composés sont préférés par rapport à leurs analogues non halogénés parce qu'il y a [42]:

- Une diminution du pK_{a2} ,
- Une augmentation de l'angle du dièdre C-CX₂-P,
- Une augmentation de la polarité du groupement pontant,
- Une possibilité de réaliser des liaisons hydrogènes de type H...X.

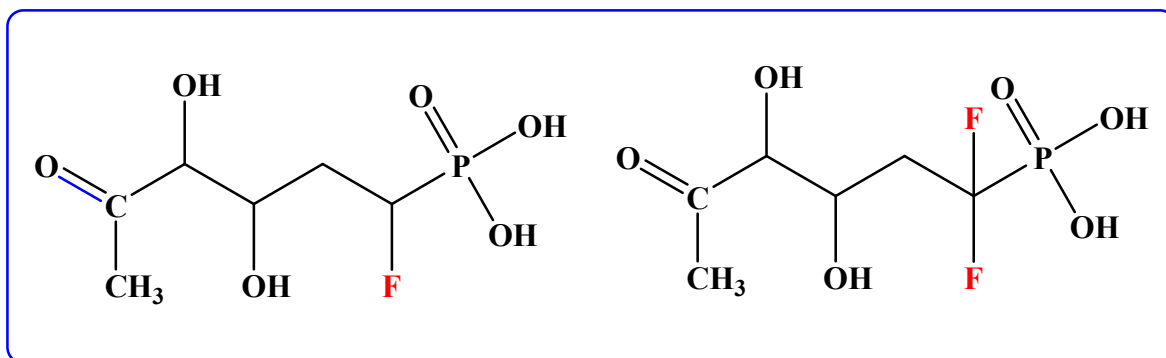


Fig.I.8: Analogues phosphonate-fluorés [42].

I.A4. Les acides α -aminophosphoniques et leurs esters α -aminophosphonates

I.A4.1 Propriétés générales

Le rôle vital des acides aminés dans la chimie de la vie et comme unités structurales de base des peptides et des protéines a conduit vers d'intenses recherches de leurs analogues. Une classe intéressante de ces analogues est formée par les acides α -aminophosphoniques et leurs esters aminophosphonates. Ces derniers sont des analogues des aminocarboxylates dans lesquels un ou plusieurs groupe(s) carboxylique(s) sont remplacés par des fonctions phosphoniques [43].

Ce sont des composés organiques contenant une liaison $-N-C-P$ dans lesquels le phosphore est pentavalent.

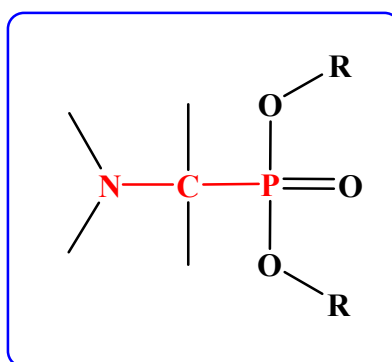


Fig.I.9: Structure générale des aminophosphonates.

Leur toxicité négligeable vis-à-vis des mammifères et le fait qu'ils miment les aminoacides rendent ces composés extrêmement importants car ils concurrencent les fonctions carboxyliques dans le site actif des enzymes et des récepteurs cellulaires.

Bien qu'étant des bioisostères, ces molécules ont des propriétés physicochimiques différentes. Les acides phosphoniques diffèrent des acides carboxyliques par leur encombrement, leur géométrie et leur acidité. En effet, l'atome de phosphore a un rayon significativement plus grand que celui de l'atome de carbone, l'acide carboxylique a une géométrie trigonale plane alors que l'acide phosphonique a une géométrie tétraédrique, l'acide phosphonique est plus acide que l'acide carboxylique d'environ trois unités de pKa [44].

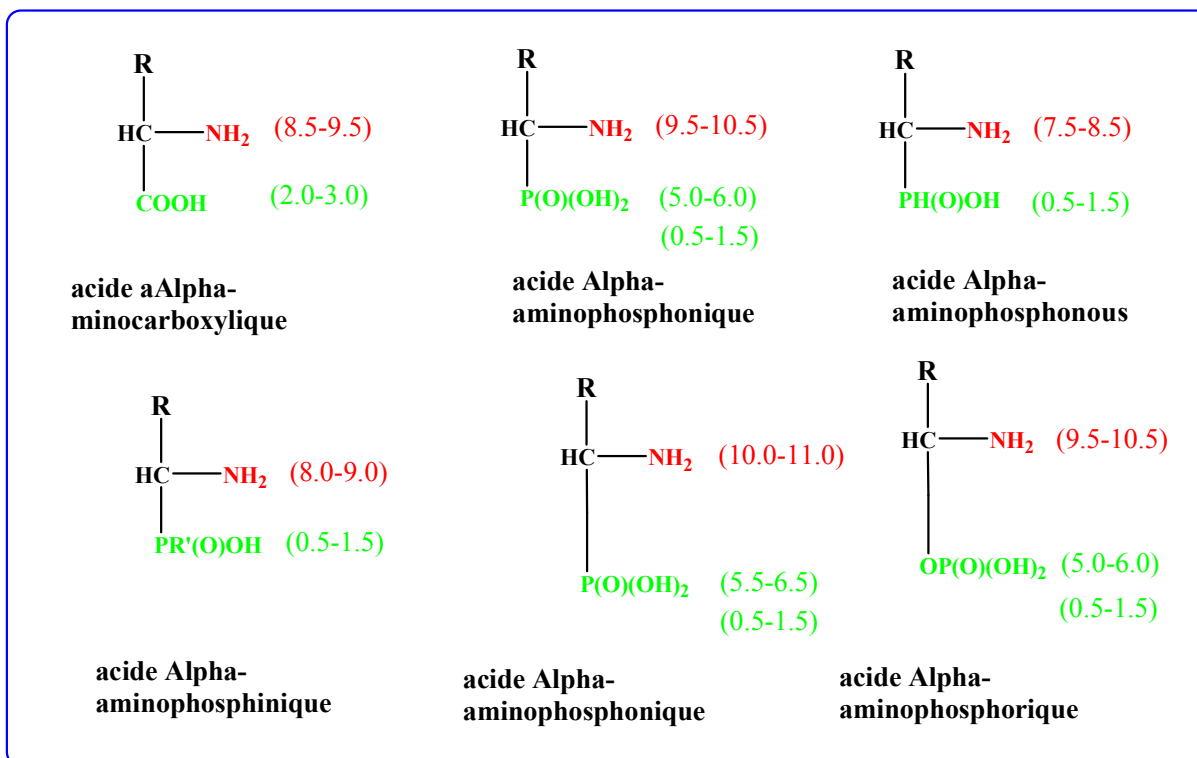


Fig.I.10: Formules structurales des acides aminocarboxyliques et de leurs dérivés [44].

(La gamme de pK_a des groupements donneurs est indiquée entre les parenthèses).

Une comparaison des caractères de base des acides α -aminocarboxyliques simples et leurs dérivés phosphoniques (Fig.I.10) montre que le pK_a des acides augmente dans l'ordre : Phosphonous ~ Phosphinique < Carboxylique < Phosphonique ~ Phosphorique.

Le premier proton des dérivés acides phosphoniques et phosphoriques est très acide et, pareillement comme dans les acides phosphonous et phosphiniques, pK ~1 [45].

En ce qui concerne la possibilité de faire des liaisons métal-ligand (réaction de complexation) de ces dérivés phosphono, la chélation bidentate (N, O) est de plus grande importance pour la plupart des ions métalliques de transition d'intérêt biologique (Fe, Mg,

Ni,...etc.). En raison de la basicité relativement élevée du groupement PO_3^{2-} , il y a également une possibilité pour la coordination monodentate du groupement phosphonate dans les solutions acides. Dans les solutions alcalines, la coordination monodentate ($-\text{NH}_2$) peut aussi se produire, par exemple avec $\text{cis-Pt}(\text{NH})_2^{2+}$ [46].

L'ordre de la stabilité des complexes de (N, O) correspond à l'ordre global de basicité des groupements donneurs; plus la basicité du donneur est élevée, plus la stabilité des complexes formés est élevée [47].

I.A4.2 Synthèse des aminophosphonates

Ils ont été synthétisés dans les années 40 et se sont avérés la première fois pour se produire dans l'organisme vivant vers la fin des années '50. En 1959, Horiguchi et Kandatsu découvrent l'acide 2-aminoethanephosphonique (AEP) dans le rumen des protozoaires ciliés des moutons [48], c'est le plus simple aminophosphonate naturelle. Cet acide est présenté dans certains organismes en quantités remarquablement élevés [49] comme des composés libres dans les tissus, tandis qu'elles se produisent habituellement sous les formes attachées tels que les phosphonopéptide, les phosphonolipides et les phosphonoglycolipides [50].

La découverte des aminophosphonates dans les systèmes vivants a stimulé l'intérêt pour ce groupe de composés et les recherches orientées vers la synthèse des analogues acides phosphoniques des acides aminés protéiques et non protéiques ont eu comme conséquence une nouvelle classe de médicaments et d'autres composés bioactive avec une grande variété d'applications commerciales s'étendant de l'agriculture à la médecine [51].

Les acides aminoalkylphosphoniques occupent une place de choix entre tous les acides fonctionnalisés. Le premier acide synthétisé est l'acide aminométhylphosphonique décrit en 1940 [52]. Ce n'est qu'au début des années 1970 que Kosolapoff et Maier ont synthétisés quelques composés de ce genre et que leurs importances biologiques ont été reconnues [53].

De nombreuses stratégies ont été développées pour synthétiser des acides α -aminophosphoniques [54-55].

Il existe deux voies principales :

1. Une voie directe

Elle permet l'obtention directe des acides α -aminophosphoniques par une réaction de type Mannich. Cette réaction utilise comme substrat une amine primaire ou secondaire, la formaldéhyde et l'acide phosphoré.

La fameuse méthode de préparation directe des acides α -aminophosphoniques est celle décrite par *Moedritzer et Irani* [56], dans laquelle une amine réagit en présence de formaldéhyde avec l'acide phosphoreux. La réaction nécessite un milieu fortement acide et un chauffage à reflux. Elle est schématisée selon la réaction globale;

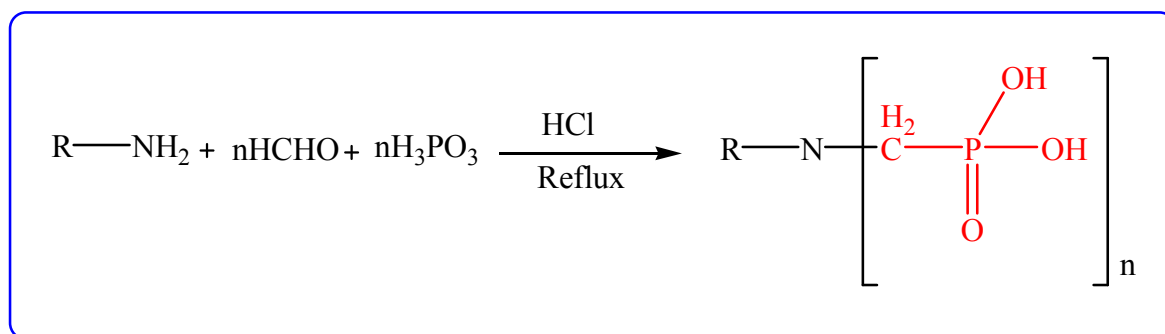


Schéma I.1: Réaction de Moedritzer et Irani [52].

Cette méthode est moins générales que les autres, mais elle présente l'avantage qu'elle permet l'obtention des acides aminophosphoniques directement sans passer par l'étape d'hydrolyse des esters aminophosphonates.

2. Voie indirecte

Cette voie consiste à préparer et hydrolyser des esters aminophosphonates :

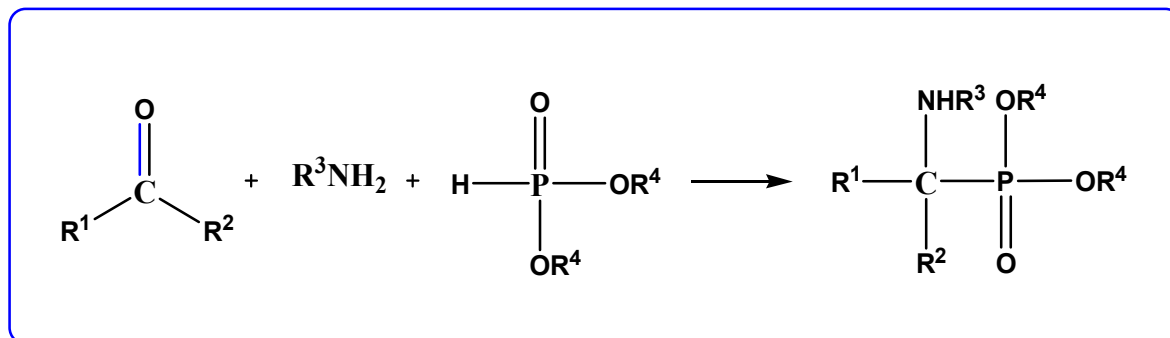
La plupart des méthodes décrites pour la synthèse utilisent des composés carbonylés tels que les aldéhydes, les cétones comme composés de départ. Les différentes stratégies sont les suivantes :

I.A4.2.1 La réaction de Kabachnik-Fields (phospha-Mannich)

La réaction de Kabachnik-Fields (phospha-Mannich) est la méthode de base pour la préparation des α -aminophosphonates, composés précieux et biologiquement actifs, elle représente un bon choix pour la synthèse des α -aminophosphonates qui sont d'une importance considérable en raison de leurs activités biologiques. C'est l'un des premières méthodes de la préparation des acides α -aminophosphoniques et leurs esters. Cette réaction, indépendamment découverte par Kabachnik et Medved [57] et par Fields [58] en 1952, est une réaction à trois composants s'effectuant en one pot (Schéma I.2).

Kabachnik et Fields ont montré indépendamment que la réaction d'une amine, d'un composé carbonylé et d'un dialkylphosphite mène à la formation de dérivés α -

aminophosphonates. Cette réaction porte aujourd'hui le nom de ses créateurs et est donc connue sous le nom de réaction de Kabachnik-Fields.



$\text{R}^1, \text{R}^2, \text{R}^3, \text{R}^4$: Radicaux alkyls ou aryls.

Schéma I.2: Réaction de Kabachnik-Fields.

Bien que plusieurs mécanismes aient été proposés, le mécanisme réactionnel de la réaction de Kabachnik-Fields n'est, à l'heure actuelle, pas complètement élucidé [59]. Il semble que le mécanisme dépend de la nature des réactifs [60].

La réaction de Kabachnik-Fields a été étendue à des espèces comprenant la fonction $>\text{P}(\text{O})\text{H}$, à des phosphites cycliques, acycliques et H-phosphinates cycliques, ainsi que les oxydes de phosphines secondaires. D'autre part, des amines hétérocycliques ont également été utilisées pour préparer une nouvelle α -aminophosphonique, phosphinique et des dérivés d'oxyde de la phosphine. Donc, la gamme de composés qui peut être impliquée dans ce procédé est extrêmement large. La réaction peut être effectuée avec ou sans catalyseur, avec ou sans solvant. Il y a beaucoup d'exemples de cette réaction dans la littérature.

- **Mécanismes possibles pour la réaction Kabachnik-Fields**

Deux mécanismes généraux ont été proposés (Schéma I.3) qui se distinguent par l'ordre dans lequel se font les deux étapes. En cas général, ces réactions à trois composants peuvent avoir lieu par l'intermédiaire d'une imine ou un α -hydroxyphosphonate. Le suivi de quelques réactions de Kabachnik-Fields par la spectroscopie IRFT a indiqué la participation de l'imine comme intermédiaire in situ qui a également été justifiée par des calculs théoriques.

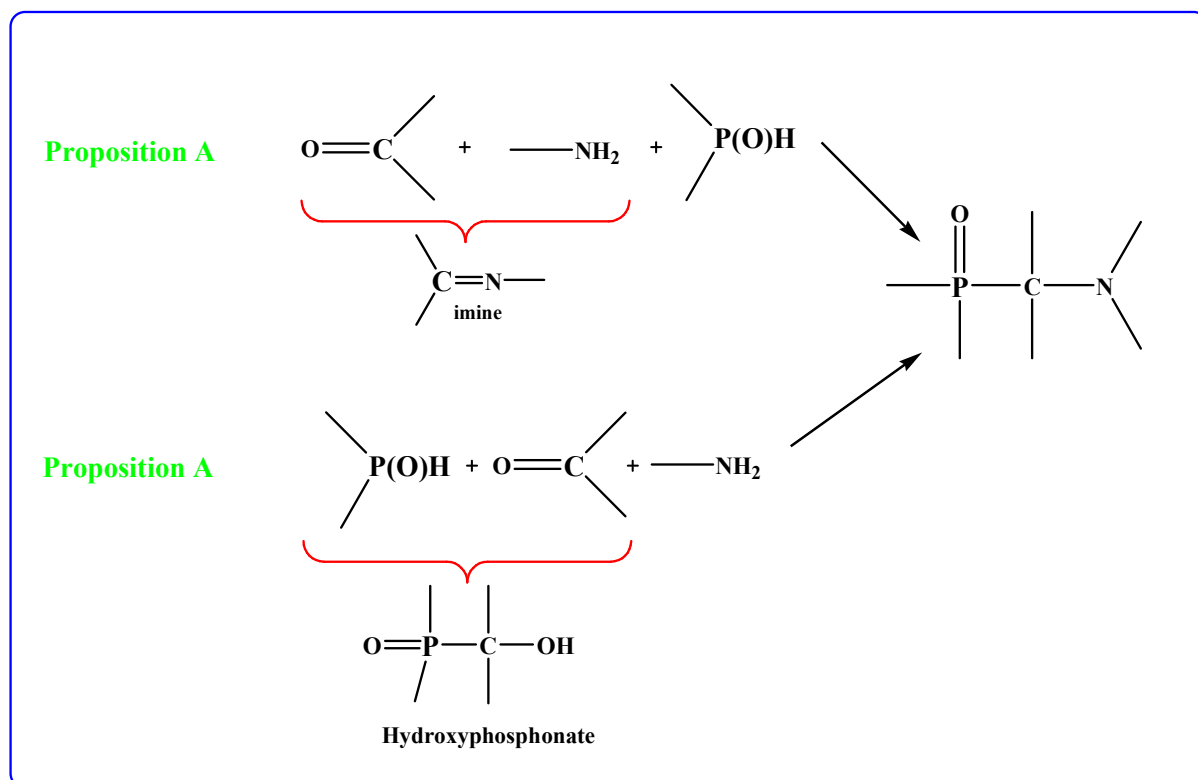


Schéma I.3: Propositions de mécanismes de la réaction de Kabachnik-Fields [61].

Cherkasov *et al.* ont étudié le mécanisme de la réaction Kabachnik-Fields en détail. L'une des possibilités est que :

- Une imine (base de Schiff) est formé à partir du composé carbonyle et l'amine (primaire), et puis le dialkylephosphite est ajouté à la liaison C=N de l'intermédiaire.
- L'autre voie assume la formation d'une α -hydroxyphosphonate par l'addition de la dialkylphosphite au groupe carbonyle de la composante oxo, alors le hydroxyphosphonate subit une substitution par l'amine pour fournir α -aminophosphonate.

Sur la base des études cinétiques, il est clair que le mécanisme dépend de la nature des réactifs. Par exemple, la condensation de l'aniline, le benzaldéhyde et un dialkyle phosphite a été supposé suivre le mécanisme de formation de l' "imine " (voie 1). Fait intéressant, il a été trouvé que, avant la condensation de l'aniline et du benzaldéhyde, un H-liaison est formée entre la fonction P=O du phosphite et l'unité de H-N de l'aminé (Schéma I.4) [62].

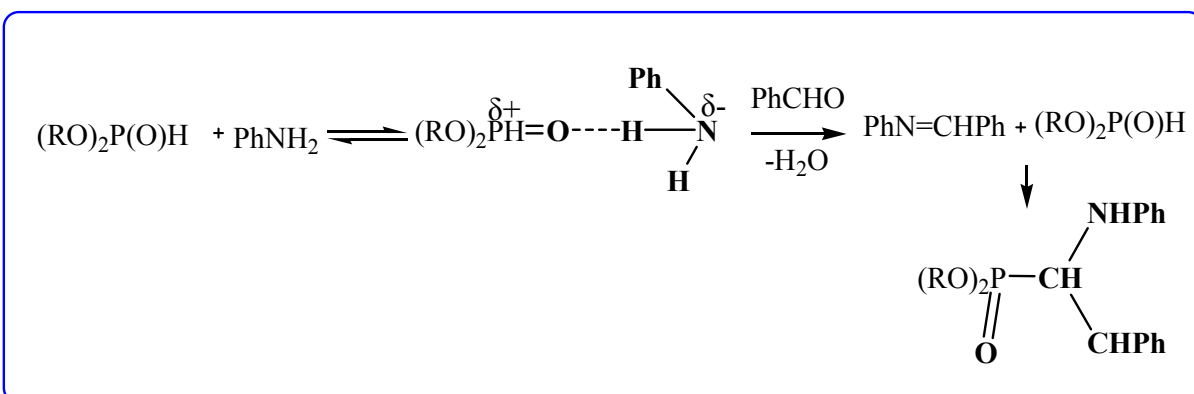


Schéma I.4: Mécanisme de formation de l "imine" proposé pour la réaction Kabachnik–Fields [62].

Dans un autre cas, Cherkasov *et al.* suggéré que la réaction de la plus nucléophile cyclohexyl-amine, le benzaldéhyde et un dialcylphosphite a lieu par l'intermédiaire du "hydroxyphosphonate" itinéraire. Ici encore, une interaction a été corroborée précéder l'addition de la dialcylphosphite sur l'unité C=O de l'oxo-composé. Selon ce document, uneliasion H est formée entre le groupement P(O)H du phosphite et l'atome d'azote de l'aminé (Schéma I.5) [62].

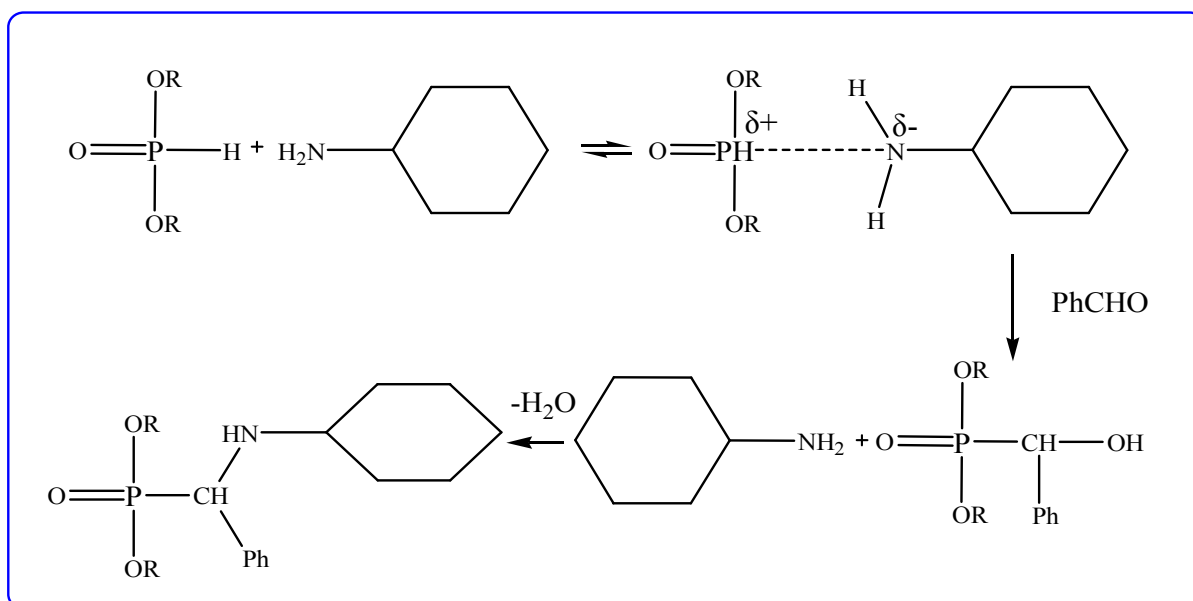


Schéma I.5: Mécanisme de formation de "α-hydroxyphosphonate" proposé pour la réaction de Kabachnik–Fields [62].

Par la suite, Zefirov et Matveeva ont montré que la condensation du cyclohexylamine, benzaldéhyde et le dialcylphosphite suit la "voie imine", et a conclu qu'il n'y a pas de véritable preuve expérimentale de la route hydroxyphosphonate [63]. Il est également à noter que la réaction de la cyclohexylamine, le benzaldéhyde et l'oxyde de dibutylphosphine, qui peut être considérée comme une condensation Kabachnik-Fields étendus, a été montré à

procéder selon le Mécanisme "imine" [64]. Il semble probable que le mécanisme réel est fonction des composantes de la réaction, bien que la voie "imine" semble être plus général que la voie impliquant un intermédiaire " α -hydroxyphosphonate". R. Gancarz et I. Gancarz étayées qu'une réversible formation de l' α -hydrox-phosphonate peut également se produire, et si elle est réarrangée pour le correspondant phosphate, cela devient une itinéraire "impasse" [65]. Gancarz [66] a expliqué que la présence d'un électrophile (le composé carbonylé) et de deux nucléophiles (une amine et un hydrogénophosphonate de dialkyle) peut conduire à une compétition sur le centre électrophile. Cet auteur a étudié l'influence de la nature du dérivé carbonylé (pentanal, propanone, fluorénone et benzophénone) sur la réaction de Kabachnik-Fields effectuée en présence de *n*-butylamine et d'hydrogénophosphonate de diéthyle. Il a montré, par des analyses RMN ^1H et ^{31}P ainsi que par modélisation, que l'addition nucléophile de l'amine et la formation d'imine sont plus rapides que l'attaque nucléophile de l'hydrogénophosphonate de diéthyle sur le composé carbonylé dans le cas du pentanal et de la propanone. Par contre, il a observé un comportement inverse dans le cas de la benzophénone et de la fluorénone. Outre les facteurs électroniques et stériques, Gancarz explique cette différence de comportement par le caractère acide dur des dérivés carbonylés aliphatiques qui réagissent préférentiellement sur l'amine de caractère base dure d'après la terminologie de Pearson [67]. Par contre, les dérivés carbonylés aromatiques sont des acides mous qui réagissent préférentiellement sur l'hydrogénophosphonate de dialkyle qui est une base molle. On peut dire que, selon Gancarz « *The softer carbonyl compound reacts faster with the softer P-nucleophile and the slower it reacts with the harder amine nucleophile* » [66].

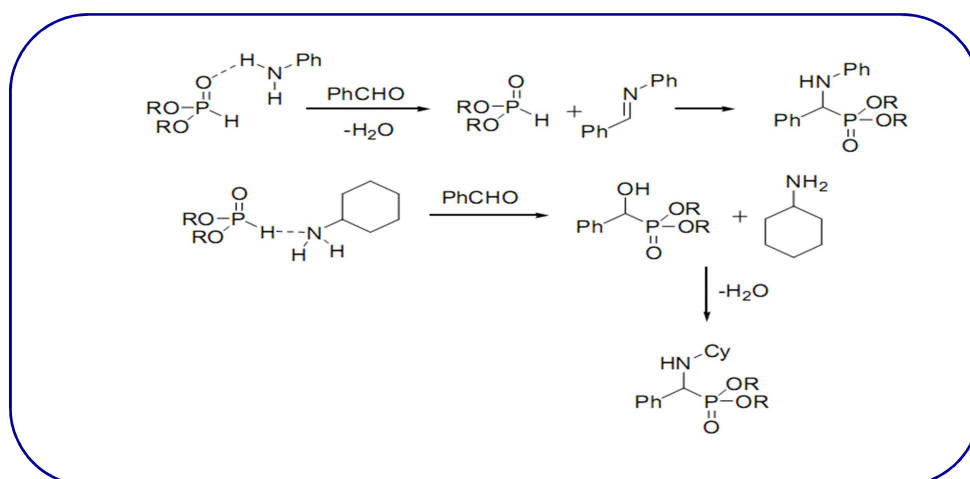


Schéma I.6: Mécanisme proposé pour la réaction de Kabachnik-Fields.

I.A4.2.2 La réaction de Pudovik -Kabachnik

L'addition catalysée ou non-catalysée d'un composé hydrophosphorylé sur une imine est en fait une réaction de Pudovik [68].

Beaucoup d'acides aminophosphoniques ont été obtenus par l'addition du diéthyle phosphite sur une imine portant un groupement benzyle qui pourra être clivé par la suite par une réaction d'hydrogénation avec un catalyseur de palladium. Cette réaction peut être effectuée en présence des catalyseurs acides ou basiques ou juste en chauffant. Beaucoup d'exemples de cette réaction sont décrits dans la littérature et plusieurs revues y sont en partie consacrées [69]. Voici un exemple de cette réaction appliquée à une imine chirale. L'aminophosphonate est obtenu par réaction avec un excès de sel de sodium du diéthyle phosphite en solution dans le diéthyle phosphite avec un rendement de 98% et un excès diastéréomérique de 95% [70]. L'hydrogénation du groupement α -méthyl-benzyle et la déprotection du groupement phosphonate conduisent au dérivé aminophosphonique.

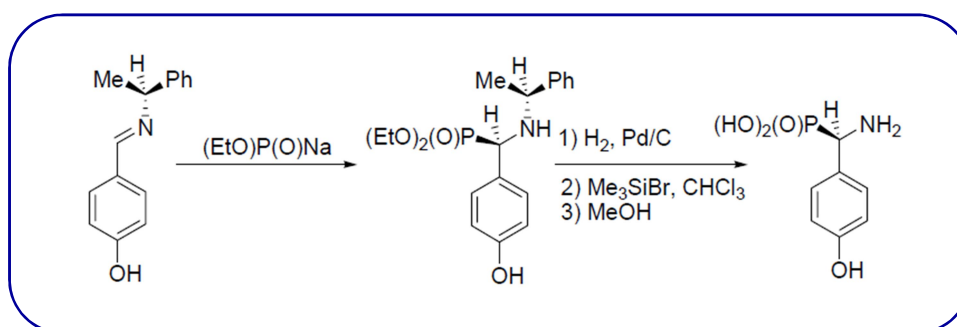


Schéma I.7: Réaction de Pudovik sur une imine chirale [70].

La réaction de Pudovik peut aussi être activée par un acide de Lewis comme ZnCl_2 , PdCl_2 , NiCl_2 , LaCl_3 , AlCl_3 et CdI_2 . Kabachnik *et al.* ont synthétisé différents aminophosphonates par une réaction de Pudovik catalysée par de l'iodure de cadmium [71].

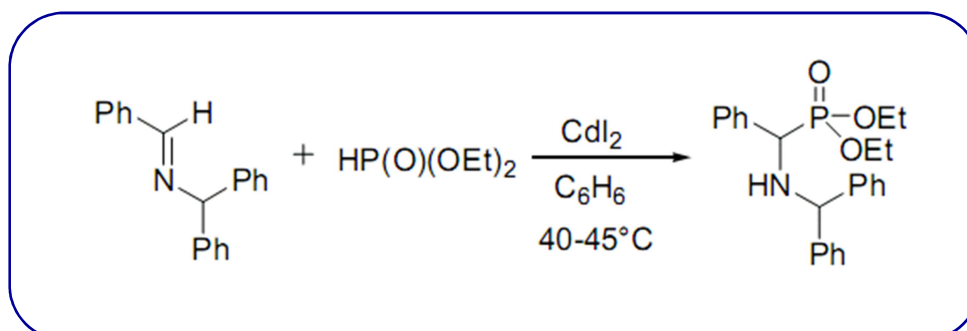


Schéma I.8: Réaction de Pudovik catalysée par CdI_2 [71].

I.A4.2.3 La réaction de Mitsunobu

Cette réaction est basée sur l'amination nucléophile d'un hydroxyphosphonate. Elle peut être réalisée par une réaction one-pot entre un alcool, un azodicarboxylate, de la triphénylphosphine et un nucléophile (ici HN_3) [72].

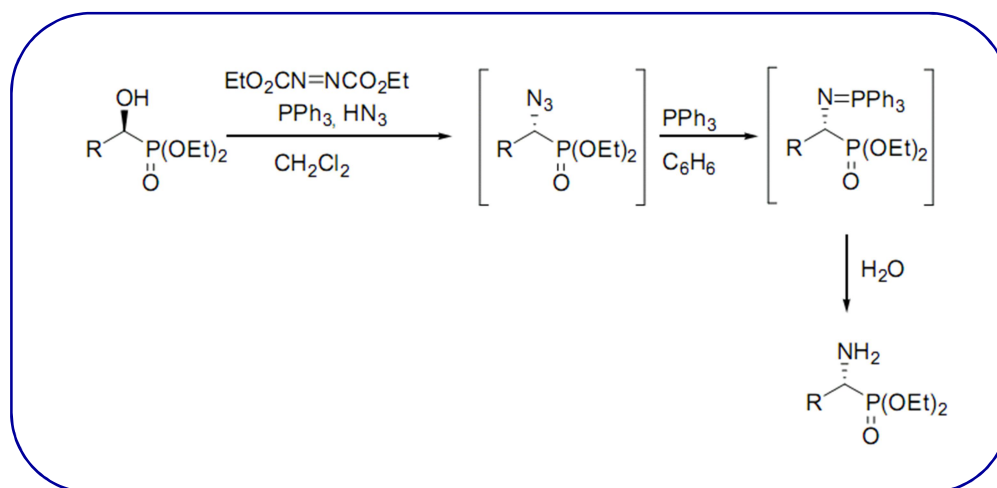


Schéma I.9: Réaction de Mitsunobu [72].

Elle conduit à l'azoture correspondant avec une inversion de configuration. L'azoture est ensuite réduit en amine par traitement avec de la triphénylphosphine et une hydrolyse aqueuse avec un rendement entre 70 et 90% selon les substituants [72].

I.A4.2.4 Autre réactions

De nombreuses méthodes de synthèse des dérivés aminophosphoniques supposent que la combinaison créée préalablement d'un groupement phosphoryle, d'un carbone α et d'une amine soit utilisée comme synthon. La synthèse de l'aminophosphonique ciblé est alors effectuée par l'introduction des groupements fonctionnels désirés sur le carbone α ou/et sur l'atome d'azote ou/et sur l'atome de phosphore.

La génération de carbanions sur les dérivés aminophosphonates et leur fonctionnalisation avec un agent électrophile approprié sont une approche populaire pour la synthèse de dérivés aminophosphonates poly fonctionnalisés divers. Dans ces processus, une imine synthétisée à partir d'un dérivé aminophosphonique et d'un aldéhyde ou d'une cétone est souvent utilisée comme produit de départ. L'alkylation énantiosélective de l'imine d'un dérivé du camphre est effectuée par traitement de l'imine avec du diisopropylamidure de lithium et divers agents alkylants [73].

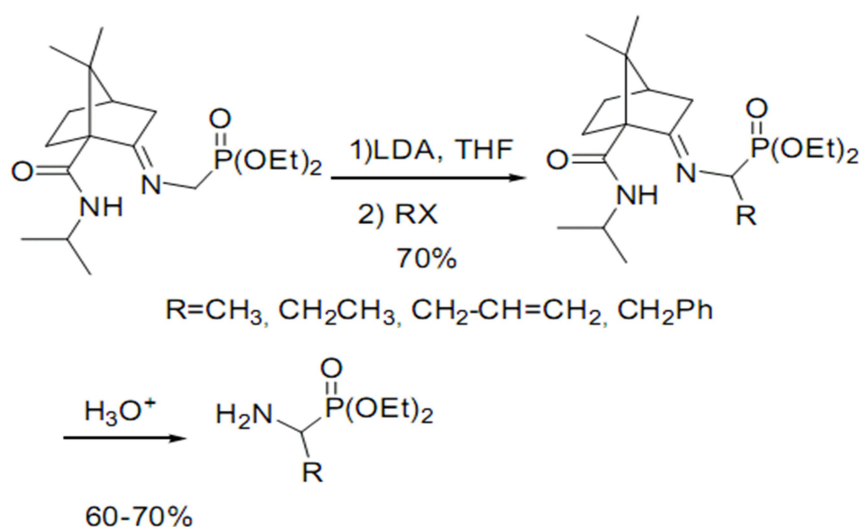


Schéma I.10: Alkylation énantiosélective [73].

Les rendements sont de l'ordre de 70 % pour l'étape d'alkylation et de 60 à 70% pour l'étape d'hydrolyse. L'énantiosélectivité est faible lorsque $\text{R}=\text{Me}$ (22%), moyenne lorsque $\text{R}=\text{Et}$ (56%) et excellente lorsque $\text{R}=\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$ et CH_2Ph (91% et 99% respectivement) [74].

B) Activités biologiques des acides α -aminophosphoniques et leurs esters

I.B1 Introduction

Les acides aminophosphoniques constituent une classe importante de composés de grande activité dans différents domaines biologique. Etant des analogues structuraux des acides aminés, les acides aminophosphoniques peuvent agir en tant que leurs antimétabolites et concurrencer leurs contre-parties carboxyliques pour les sites actifs des enzymes et d'autres récepteurs cellulaires. Les amino polyphosphonates et les poly aminopolyphosphonates, y compris les chaînes ouvertes et les dérivés cycliques, contenant des donneurs fort peuvent chélater les ions métalliques essentiels ou toxiques assez fortement et entre en concurrence avec des métalloenzymes ou d'autres metallo-récepteurs, ou pour enlever les ions métalliques toxiques des systèmes vivants, ou pour assurer leur prise par l'organisme.

Les acides aminophosphoniques peuvent agir comme :

I.B2 Inhibiteurs enzymatiques

Les aminophosphonates sont des inhibiteurs efficaces de beaucoup d'enzymes, souvent ceux sont impliqués dans le métabolisme des acides aminés. Le premier exemple d'acide aminophosphonique comme inhibiteur enzymatique remonte à 1959. L'analogue γ -phosphonique de l'acide glutamique est un inhibiteur de la glutamine synthase de poule [75].

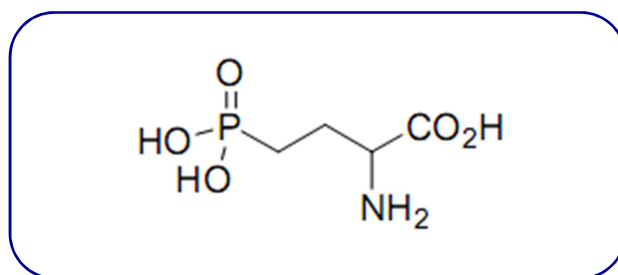


Fig.I.11: Premier inhibiteur enzymatique décrit dans la littérature [75].

Beaucoup de protéases sont impliquées dans des maladies humaines variées. Les substrats peptidiques dans lesquels un groupement phosphonate mime l'état de transition tétraédrique de la réaction de clivage de la liaison peptidique sessile deviennent les meilleurs inhibiteurs de ces enzymes. Il y a peu d'acides aminophosphoniques de structure simple qui sont des inhibiteurs efficaces de ces enzymes [75].

Parmi ces molécules, les inhibiteurs des aminopeptidases à zinc ont des activités intéressantes. L'altération de l'activité de la leucine aminopeptidase a été associée au cancer, à la cataracte et même au SIDA. L'analyse du complexe composé de l'enzyme et de l'analogue phosphonique de la leucine, un des inhibiteurs les plus efficace de l'enzyme, a permis de trouver de nouveaux composés ayant une activité inhibitrice plus importante que le « lead » [75].

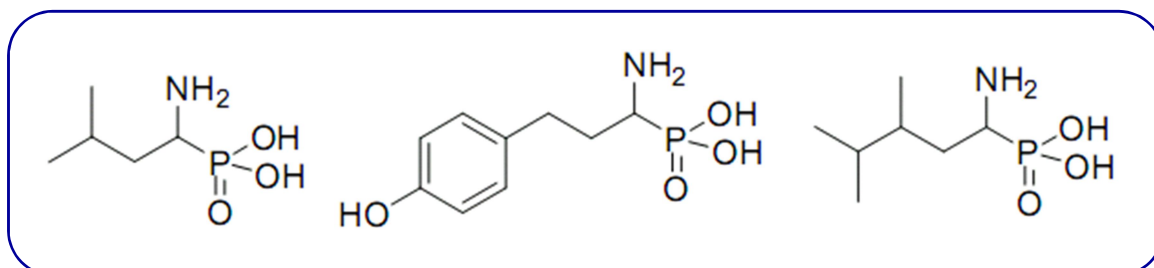


Fig.I.12: Lead et nouveaux inhibiteurs [75].

L'analogue α -phosphonique de l'acide glutamique est un inhibiteur de l'aminopeptidase A et les analogues phosphoniques de la méthionine et de la norleucine sont des inhibiteurs de la methionine aminopeptidase [76,77].

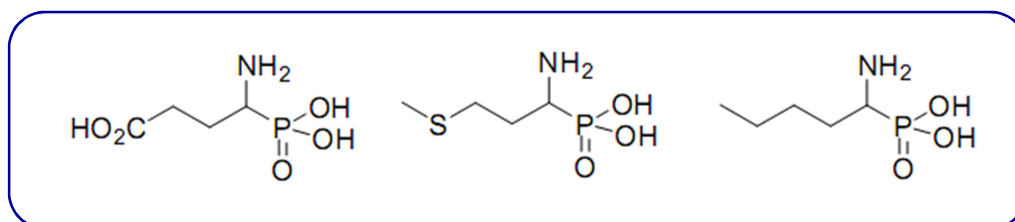


Fig.I.13: Inhibiteurs de deux aminopeptidases à zinc [76,77].

L'analogue phosphonique de la tyrosine est un substrat de la tyrosinase. L'homologue possédant un groupement méthylène supplémentaire est aussi un substrat alors que celui possédant une chaîne alkyle plus courte est un inhibiteur de l'enzyme [78].

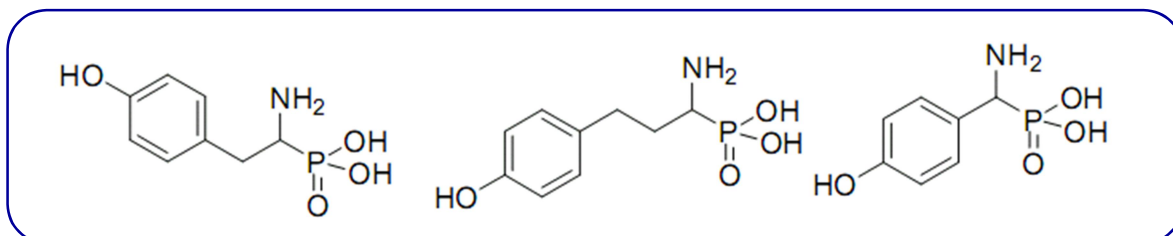


Fig.I.14: Analogues et homologues phosphoniques de la tyrosine [78].

La tyrosinase est impliquée dans les mélanomes (cancer de la peau). Des études préliminaires ont montré que les aminophosphoniques actifs envers la tyrosinase sont aussi cytotoxiques contre les cellules de mélanome de souris B16 [79].

Un autre exemple est l'interaction des analogues phosphoniques de 3,4-dihydroxyphénylalanine (dopa) avec de la tyrosinase, une enzyme contenant quatre ions de cuivre liés dans le site actif. Une étude comparative des propriétés complexantes de la dopa, du DopaP [acide 1-amino-1-(3',4'-dihydroxyphényl) éthyl phosphonique] et des dérivés phosphoniques de DopaP [3,4-dihydroxy phenyl glycin1-amino-1-(3',4'-acide dihydroxyphényl) methyl phosphonique] avec le cuivre (II) a indiqué une similitude significative dans les capacités des former des liaisons de coordination de ces ligands [80].

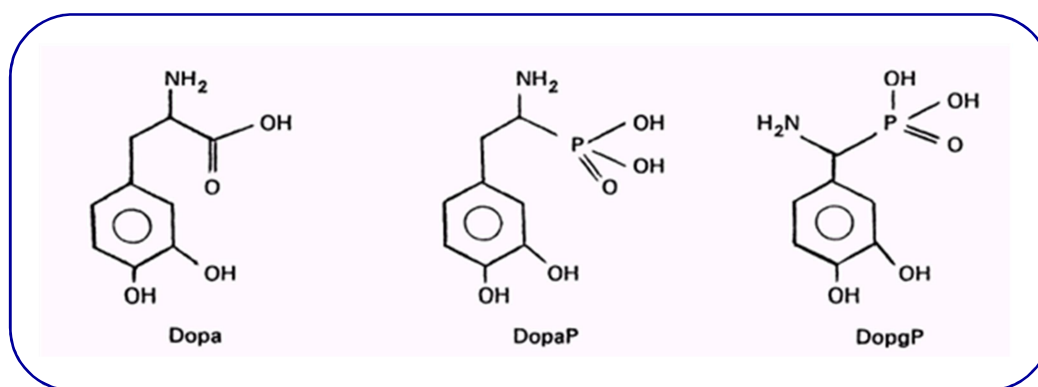


Fig.I.15: Formules structurales de quelques dérivés de catéchol [80].

Comme peut être vu sur la Fig.II.15, tous ces ligands contiennent des sites de chélation donneurs: les donneurs de chaîne latérale d' aminocarboxylate / aminophosphonate et les donneurs de catecholate-O sur la partie aromatique [80].

Le dopa et DopaP avec le cuivre (II), coordonnent par l'intermédiaire des donneurs de la chaîne latérale au pH bas, mais par l'intermédiaire de la fonction de catecholate à un pH plus élevé. Il y a une possibilité de la coordination simultanée de ligand par l'intermédiaire des deux accepteurs dans le cas d'un excès de ligand et de la coordination simultanée d'ion métalliques aux deux accepteurs dans le cas d'un excès en métal [80].

I.B3 Pouvoir agonistes et antagonistes

Les acides α -aminophosphoniques étant des analogues d'aminoacides, beaucoup de recherches ont été effectuées sur leur potentiel d'agonistes et d'antagonistes vis à vis des différents récepteurs du système nerveux central. Tous ces récepteurs fonctionnent grâce à leur ligand endogène, le glutamate, et sont des cibles potentiellement intéressantes pour le

traitement de maladies neurologiques telles que l'épilepsie. Les dérivés aminophosphoniques se retrouvent principalement en tant qu'antagonistes des récepteurs NMDA et AMPA [80].

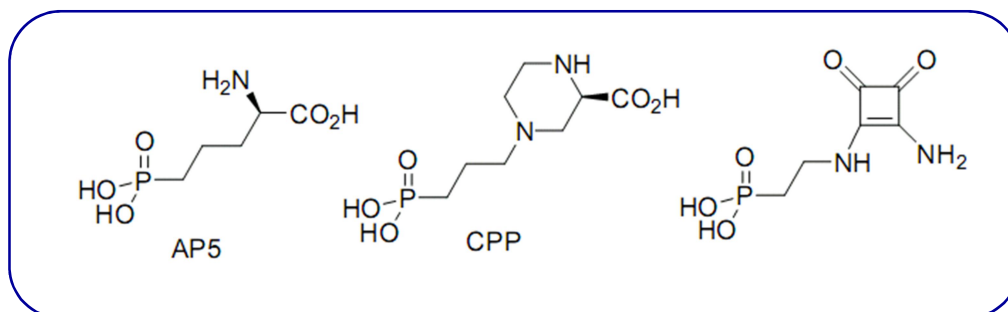


Fig.I.16: Antagonistes du récepteur NMDA [81].

La molécule AP5 a été utilisée comme « lead » et a permis la découverte de beaucoup d'antagonistes puissants, sélectifs et compétitifs. La molécule CCP fait partie des plus puissants antagonistes compétitifs. La dernière molécule représente une classe structurale unique d'antagoniste de NMDA. Les premières études pharmacologiques sur les récepteurs AMPA et KA ont été entravées par le manque de sélectivité d'antagonistes efficaces. L'ATPO a été développé en utilisant l'AMPA comme « lead ». Un dérivé quinoxalinedione est aussi un antagoniste du récepteur AMPA [81].

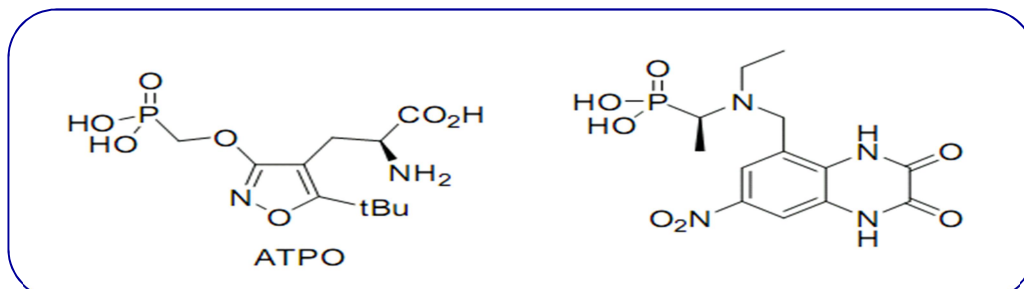


Fig.I.17: Antagonistes du récepteur AMPA [81].

L-AP4 est un agoniste des récepteurs métabotropiques mGlu du groupe III. Une approche classique pour augmenter l'efficacité et la sélectivité est de contraindre la structure des ligands non sélectifs. Les stéréoisomères de l'acide 1-amino-2-phosphonométhyl cyclopropane carboxylique ont été synthétisés et évalués sur les récepteurs mGlu du groupe III [81].

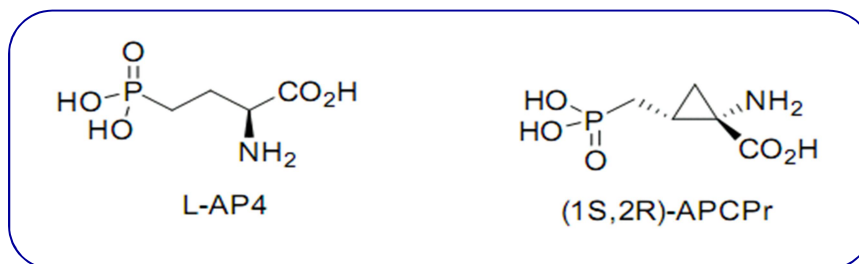


Fig.I.18: L-AP4 et son agoniste le plus efficace décrite par Sibille [81].

L'isomère le plus puissant (1S, 2R)-APCPr montre un profil pharmacologique similaire à celui de L-AP4 avec des IC_{50} de 0,72, 1,95, >500 et 0,34 μM pour les récepteurs m-Glu4, m-Glu6, m-Glu7 et m-Glu8, respectivement [81].

I.B4 L'activité inhibitrice

La Fosmidomycine est le premier représentant d'une nouvelle classe de drogues antimalaria agissant par l'inhibition de la reductoisomerase 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate, une enzyme essentielle dans une des voies de synthèse des isoprenoides [82].

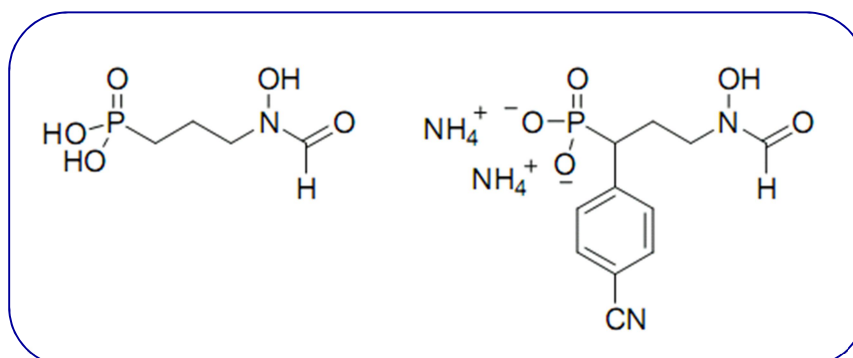


Fig.I.19: Fosmidomycine et un analogue [82].

L'analogue a une activité inhibitrice équivalente à celle de la fosmidomycine avec un IC_{50} de 0,054 μM vis-à-vis de la reductoisomerase 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate [82]. Il a une activité plus importante dans un test in vitro contre la souche D2d P. falciparum avec un IC_{50} de 0,27 μM alors que la fosmidomycine a un IC_{50} de 1,1 μM .

L'enzyme mutase UDP-galactopyranose catalyse l'isomérisation de l'UDP-galactopyranose en UDP-galacofuranose, une étape essentielle de la biosynthèse de la paroi cellulaire des mycobactéries. Vincent et al. ont décrit la synthèse de deux mimes des intermédiaires de haute énergie [82].

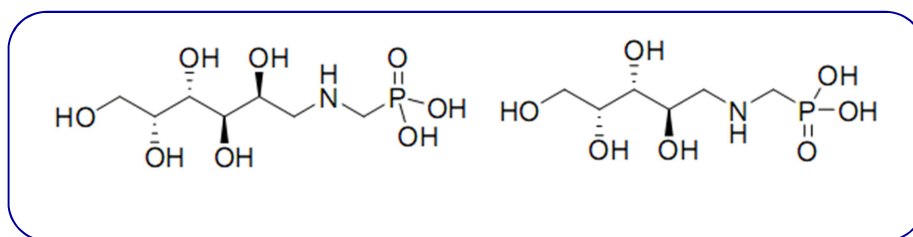


Fig.I.20: Inhibiteurs faibles décrits par Vincent [82].

A une concentration d'inhibiteurs de 2M, la première molécule n'a aucune activité et la seconde molécule inhibe la réaction de 11%. Les propriétés magnétiques uniques de l'ion gadolinium (III) le placent au milieu d'un développement révolutionnaire en médecine et plus précisément en imagerie médicale [83]. De nombreuses molécules ont été synthétisées afin de complexer cet ion métallique et de trouver de nouveaux agents de contraste ayant des meilleures propriétés physico-chimiques que les précédents. De nombreux analogues du DOTA, qui est maintenant approuvé comme agent de contraste en clinique, ont été synthétisés. Cette molécule, analogue phosphonique du DOTA, est le DOTP [84].

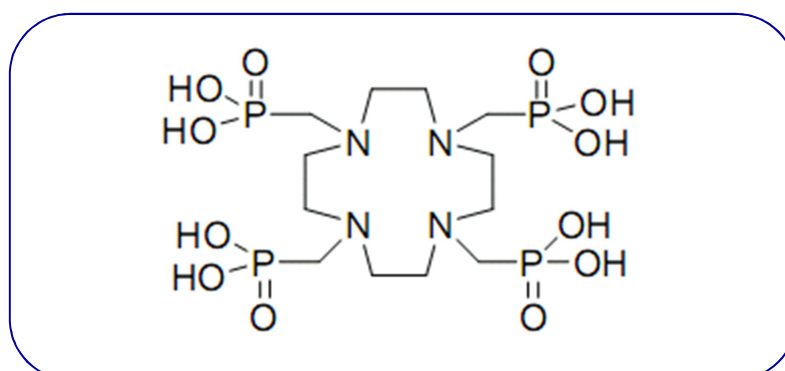


Fig.I.21: DOTP [84].

Les complexes de Gd^{3+} avec des dérivés tétra azaphosphiniques, bien que moins stables que le DOTA, sont capables de lier fortement l'ion gadolinium afin d'assurer l'excrétion rapide et complète de cet ion métallique toxique dans un temps raisonnable après l'administration [84].

I.B5 Autres activités biologiques

Ils sont des cibles importantes dans le développement des antibiotiques, des antiviraux, des espèces et des antihypertenseurs, des agents anti-tumoraux basée sur leur effet comme inhibiteurs de la GABA-récepteurs, les inhibiteurs d'enzymes et des anti-métabolites

Les Dérivés diaryle α -aminophosphonates sont des inhibiteurs sélectifs et très puissants de serine proteases, et peut donc arbitré les processus patho-physique de la croissance du cancer, les métastases, l'arthrose [93]. Le décarboxylase Dialkylglycine [92] et la leucine aminopeptidase [94] sont également inhibées par α -amino-phosphonates. Cyanoacrylate [95] et les dérivés amidés [96] de α -aminophosphonates sont des composés antiviraux actifs. Certains α -aminophosphonates ont été révélés être appropriés pour la conception de systèmes de libération de médicament en continu en raison de leur capacité à augmenter la perméabilité de la membrane d'une molécule par son partie hydrophile [97].

References bibliographiques

- [1] L.D. Quin, *A Guide to Organophosphorus Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., New York, (a) Chapter 2, (b) Chapter 10, (c) Chapter 11(2000).
- [2] K. Tsujii, T. Yakamoto, T. Onda, S. Shibuichi Angrew. *Chem. Int.*, 36, 1011-1012, Ed. (1997).
- [3] T. Largman, S. Sifniades. *U.S Patent*, 4402917. 198.
- [4] F. Matsumura, Degradation of pesticides in the environment by micriorganisms and sunlight. *Biodegradation of Pesticides*, pp. 67-90. Plenum Press, New York (1982).
- [5] F.J. Hurst, W.D. Arnold, D. Allen Ryan, Recovering Uranium from Wet-Process Phosphoric Acid. *Chemical Engineering*, 56-57 (1977).
- [6] M. Christopher Timperley, *Best Synthetic Methods: Organophosphorus (v) chemistry*, Scriven: Pyridines: From Lab to Production (2013).
- [7] J.J. Defrank and T.C. Cheng, *Bacteriol*, 173, 1938-1943 (1991).
- [8] J.C. Judd, D.D. Harbuck, *Separation Science and Technology*, 1641-1653 (1991).
- [9] W.D. Arnold, D.R. Mc Kamey and C.F. Base. *Ind.Ing. Chem. Process*, 21, 301-308 (1982).
- [10] D.A. Luke, A. Magdics, S.L. Paris, R.E. Worthington, U.S. Patent, 4325918 (1982).
- [11] J.M. Lehn, *La chimie supramoléculaire, concepts et perspectives*, De Boeck Université, Ed. (1997).
- [12] H. Peter, H. Alastair, D. Nigel. *Pesticide Handbook*. Ed. (1991)
- [13] R. Engel, *Synthesis of Carbon-Phosphorus Bonds*, CRC Press, Fla. (1987).
- [14] R. Engel., *Chem. Rev.*, 77, 349-367(1977).
- [15] D.F. Wiemer, *Tetrahedron*, 53, 16609-16644(1997).
- [16] T.R.J. Burke, Z.-H. Li, J.B. Bolen, V.E. Marquez, *J. Med. Chem.*, 34, 1577-1581(1991).
- [17] T. R. J.Burke, J.J.J. Barchi, C. George, G.Wolf, S. E. Shoelson, X. Yan, *J. Med. Chem.*, 38, 1386-1396(1995).
- [18] R.A. Lerner, S.J. Benkovic, S P.G. chultz, *Science*, 252, 659-667(1991).
- [19] K.M. Shokat, M.K. Ko, T.S. Scanlan, L. Kochersperger, S. Yonkovich, S. Thaisrivongs, P.G. Schultz. *Chem. Int. Ed. Engl.*, 29, 1296-1303(1990).
- [20] G.R. Nakayama, P.G. Schulz, *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 780-781(1992).
- [21] S.C. Fields, *Tetrahedron*, 55, 12237-12273(1999).
- [22] S. Freeman, H.M. Seidel, C.H. Schwalbe, J.R. Knowles, *J. Am. Chem. Soc.*, 772,8149-8155(1990).
- [23] E. Roberts, J.S. Kittredge, *Science*, 164, 37-42(1969).
- [24] H. Moraes-Rojas, R.A. Moss, *Chem. Rev.*, 102, 2497(2002).
- [25] P. Kovacie, *Curr. Med. Chem.*, 10, 2705(2003).
- [26] (a) X.-Y Lu, C.-M. Zhang, Z.-R. Xu, *Acc. Chem. Rev.*, 34, 535(2001); (b) Y.S. Du; J.-Q. Feng; Y.-H.Yu, *J. Org. Chem.*, 67, 8901(2002). (c) C. Lu; X.Y. Lu, *Org. Lett* (2002), 4, 4677; (d) Y.-S. Du; X.-Y. Lu; C.-M. Zhang, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 42, 1035(2003); (e) Y.S. Du; X.-Y. Lu, *J. Org.Chem.*, 68, 6463(2003); (f) Lu, C.; Lu, X.-Y. *Tetrahedron*, 60, 6575(2004); (g) Y.S. Du; J.-Q. Feng; X.-Y. Lu, *Org. Lett.*, 7, 1987(2005); (h) M. Koehn; R. Breinbauer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43, 3106(2004); (i) Vedejs, E. *J. Org.Chem.*, 69, 5159(2004); (j) J.L. Methot; W. R. Roush, *Adv. Synth.Catal.*, 346, 1035(2004).

- [27] (a) W. Tang, X. Zhang, *Chem. Rev.*, **103**, 3029(2003); (b) V.V. Grushin, *Chem. Rev.*, **104**, 1629(2004).
- [28] R. Engel, *Synthesis of Carbon-Phosphorus Bonds*, CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, (1988).
- [29] D.M. Mazzacurati, Advanced Studies on the Synthesis of Organophosphorus Compounds, Dottorato di ricerca in scienze chimiche (xix° ciclo), Area 03 Scienze Chimiche-CHIM/06 *Chimica Organica*, (2005).
- [30] D. Hendlin, *Science*, **166**, 122(1969).
- [31] L.D. Quin, *A Guide to Organophosphorus Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., New York, Chapter 2 (2000).
- [32] H. Arnold, F. Bourseaux, *Angew. Chem.*, **70**, 539(1958).
- [33] (a) H. Fleisch, *Breast. Cancer. Res.*, **4**, 30(2002). (b) Krise, J. P., Stella, V. J. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **19**, 287(1996).
- [34] (a) H. Fleisch, *Breast. Cancer. Res.*, **2002**, **4**, 30. (b) J. P. Krise, V. Stella, J. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **19**, 287(1996).
- [35] F. Helgstrand, *Science*, **201**, 819(1978).
- [36] R.L. Hilderbrand et T.O. Henderson, in *The Role of Phosphonates in Living Systems*, ed. Hilderbrand R. L., *CRC Press Inc.*, Boca Raton, Florida, pp. 5-29 (1983).
- [37] T. Kuzuyama, T. Shimizu, S. Takahashi, H. Seto, *Tetrahedron Lett.*, **39**, 7913-7916 (1998).
- [38] J. Zeidler, J. Schwender, C. Müller, J. Wiesner, C. Weidemeyer, E. Beck, H. Jomaa, H. K. Lichtenthaler, *Z. Naturforsch.*, **53c**, 980-986(1998).
- [39] G. M. Blackburn, D.E. Kent, F. Kolkman, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*, 1149, (1984).
- [40] D. O'Hagan, H.S. Rzepa, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 645-652 (1997).
- [41] M. Kent D.E., Kolkman F., *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1* (1980).
- [42] J.A. K. Howard, V.J. Hoy, D. O'Hagan, G.T. Smith, *Tetrahedron*, **52**, 12613-12622(1996).
- [43] E.N. Rizkalla, *Rev. Inorg. chem.*, **5**, 233(1983).
- [44] B. Josephine, these de doctorat, université Montpellier(2009).
- [45] R.B. Lauffer, *Chem. Rev.*, **87**, 90(1987).
- [46] T.G. Appleton, J.R. Hall, A.D. Harris, H.A. Kimlinand I.J. McMahon, *Aust. J. Chem.*, **37**, 1833(1984).
- [47] T.G. Appleton, J.R. Hall and I.J. McMahon, *Inorg. Chem.*, **25**, 720(1986).
- [48] M. Horiguchi, M. Kandatsu, *Nature*, **184**, 901(1959).
- [49] M. V. Miceli, T. O. Henderson, T. C. Myers, *Science*, **209**, 1245(1980).
- [50] E.N. Rizkalla, *Rev. Inorg. chem.*, **5**, 233(1983).
- [51] M. Horiguchi, and M. Kandatsu. Isolation of 2-Aminoethane Phosphonic Acid from Rumen Protozoa, *Nature*, **184**, 901(1959).
- [52] J.D. Smith; M.A. O'Malley, Control of phosphonic acid and phosphonolipid synthesis in Tetrahymena. *Biochem. Biophys. Acta.*, **528**, 394-398(1978).
- [53] A.M. Cook, C.G. Daughton and M. Alexander Phosphonate utilization by bacteria. *J. Bacteriol.*, **133**, 85-90(1978).

- [54] M. Kabachnik, T. Medved, *Dokl. Acad. Nauk SSSR*, 83, 689-692. ; *Chem. Abstr.* 1953, 47, 2724b(1952).
- [55] E. K. Fields, *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 1528-1531(1952).
- [56] (a) K. Moedritzer, R. Irani, *J. Org. Chem.*, 31, 1603-1607(1966). b) M. Fabrice. Simeon, thèse de doctorat de l'université de Caen (1998).
- [57] M.I. Kabachnik, T.Y. Medved, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 83, 689-692(1952).
- [58] E.K. Fields, *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 1528-1531(1952).
- [59] R.A. Cherkasov, V.I. Galkin, *Russ. Chem. Rev.*, 67, 857-882(1998).
- [60] J. Marina, S. Laura, M. Zeljko, V. Marijana, T. Piotro, T.B. Ljerka, *Lett. Org. Chem.*, 6, 11-16(2009).
- [61] X.-J. Mu; M. -Y. Lei; J.-P. Zou; W. Zhang, *Tetrahedron Lett.*, 47, 1125-1127(2006).
- [62] R.A. Cherkasov; V.I. Galkin, The Kabachnik–Fields reaction: synthetic potential and the problem of the mechanism. *Russ. Chem. Rev.*, 67, 857-882(1998).
- [63] E.D. Matveeva, N.S. Zefirov, *Doklady Chem.*, 420, 137-140(2008).
- [64] I.V. Galkina, V.I. Galkin, R.A. Cherkasov, Kinetics and the mechanism of Kabachnik–Fields reaction-V. Effect of the nature of hydrophosphoryl compound on the mechanism of Kabachnik–Fields reaction. *Zhur. Obsch. Khim.*, 68, 1469-1475(1998).
- [65] R. Gancarz, I. Gancarz, Failure of aminophosphonate synthesis due to facile hydroxyphosphonate-phosphate rearrangement. *Tetrahedron Lett.*, 34, 145-148(1993).
- [66] R. Gancarz, Nucleophilic addition to carbonyl compounds. Competition between hard (amine) and soft (phosphite) nucleophile. *Tetrahedron*, 51, 10627-10632(1995).
- [67] R.G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 3533-3534(1963).
- [68] A.N. Pudovik, *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 83, 865-868(1952).
- [69] V.P. Kukhar, *Russ. Chem. Rev.*, 56, 9, 859-874(1987).
- [70] S. Cherenok, A. Vovk, I. Muravyova, A. Shivanyuk, V. Kukhar, J. Lipkowski, V. Kalchenko, *Org. Lett.*, 8, 4, 549-552(2006).
- [71] J. Rahil, R. F. Pratt, *Biochem. J.*, 275, 3, 793-795(1991).
- [72] R.F. Pratt, N. J. Hammar, *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 13, 3004-3006(1998).
- [73] N. Li, R.F. Pratt, *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 18, 4264-4268(1998).
- [74] S.K. Perumal, R.F. Pratt, *J. Org. Chem.*, 71, 13, 4778-4785(2006).
- [75] S. Kumar, A.L. Pearson, R.F. Pratt, *Bioorg. Med. Chem.*, 9, 8, 2035-2044(2001).
- [76] S.A. Adediran, D. Cabaret, R.R. Flavell, J.A. Sammons, M. Wakselman, R.F. Pratt, *Bioorg. Med. Chem.*, 14, 20, 7023-7033(2006).
- [77] P.N. Wyrembak, K. Babaoglu, R.B. Pelto, B.K. Shoichet, R.F. Pratt, *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 31, 9548-9549(2007).
- [78] M.W. Walter, A. Felici, M. Galleni, R.P. Soto, R.M. Adlington, J.E. Baldwin, J.-M. Frere, M. Gololobov, C.J. Schofield, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 6, 20, 2455-2458(1996).
- [79] D.J. Payne et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41, 1, 135-140(1997).
- [80] T. Kiss. Biocoordination chemistry, (ed. K. Burger), Ellis Horwood, chichester, pp.14-107(2010).
- [81] M.L. Greenlee, J.B. Laub, J.M. Balkovec, M.L. Hammond, G.G. Hammond, D.L. Pompliano, J.H. Epstein-Toney, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 9, 17, 2549-2554(1999).

-
- [82] C. Mollard, C. Moali, C. Papamicael, C. Damblon, S. Vessilier, G. Amicosante, C. J. Schofield, M. Galleni, J.-M. Frere, G.C.K. Roberts, *J. Biol. Chem.*, 276, 48, 45015-45023(2001).
- [83] M.W. Walter, M.H. Valladares, R.M. Adlington, G. Amicosante, J.E. Baldwin, J.-M. Frere, M. Galleni, G.M. Rossolini, C.J. Schofield, *Bioorg. Chem.*, 27, 1, 35-40(1999).
- [84] J.H. Toney, K.A. Cleary, G.G. Hammond, X. Yuan, W.J. May, S.M. Hutchins, W. T. Ashton, D.E. Vanderwall, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 9, 18, 2741-2746(1999).
- [85] N.S. Zefirov, E.D. Matveeva, *ARKIVOC*, 1-17(2008).
- [86] V.P. Kukhar, H.R. Hudson; Wiley: Chichester, UK, (2000).
- [87] S.C. Fields, *Tetrahedron*, 55, 12237-12272(1999).
- [88] P. Kafarski, B. Lejczak, *Curr. Med.Chem. Anticancer Agents*, 1, 301-312(2001).
- [89] J. Bird, R.C. De Mello, G.P. Harper, D.J. Hunter, E.H. Karran, R.E. Markwell, A.J. Miles-Williams, S.S. Rahman, R.W. Ward, *J. Med. Chem.*, 37, 158-169(1994).
- [90] W.S. Liu, C.J. Rogers, A.J. Fisher, M.D. Toney, *Biochemistry*, 41, 12320-12328(2002).
- [91] A. Mucha, P. Kafarski, L. Berlicki, *J. Med. Chem.*, 54, 5955-5980(2011).
- [92] M. Sienczyk, J. Oleksyszyn, *Curr. Med. Chem.*, 16, 1673-1687(2009).
- [93] J. Grembecka, A. Mucha, T. Cierpicki, P. Kafarski, *J. Med.Chem.*, 46, 2641-2655(2003).
- [94] N. Long, X.J. Cai, B.A. Song, S. Yang, Z. Chen, P.S. Bhadury, D.Y. Hu, L.H. Jin, W. Xue, *J. Agric. Food Chem.*, 56, 5242-5246(2008).
- [95] D.Y. Hu, Q.Q. Wan, S. Yang, B.A. Song, P.S. Bhadury, L.H. Jin, K. Yan, F. Liu, Z. Chen, W. Xue, *J. Agric. Food Chem.*, 56, 998-1001(2008).
- [96] D.C. Danila, X.Y. Wang, H. Hubble, I.S. Antipin, E. Pinkhassik, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 2320-2323(2008).
- [97] E. De Clercq, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 6, 941-941(2007).

CHAPITRE II:

PARTIE EXPERIMENTALE

Ce chapitre est subdivisé en quatre parties, sa première partie est consacré à la synthèse et à la caractérisation par différentes méthodes physicochimiques de trois isomères acides α -aminophosphoniques à partir d'une série de trois aminophénols. Dans la seconde partie sont présentés des notions et principes de base de calculs théoriques par la méthode de modélisation moléculaire (DFT). La troisième partie est réservée pour la prédiction théorique des propriétés QSAR et « *Drug Likeness* » pour les acides α -aminophosphoniques synthétisés ainsi que les produits de départ correspondants. Enfin la dernière partie est réservée pour les différentes techniques utilisées pour la détermination des activités biologiques y compris l'activité antioxydante, antibactérienne et antifongique.

Partie A

Synthèses et caractérisations d'acides α -aminophosphoniques

II.A.1 Objectif stratégique

Nous avons utilisé une des méthodes de synthèse organique respectueuses de l'environnement. Nous cherchons à minimiser l'utilisation des solvants organiques en utilisant un solvant alternatif éco-compatible, c'est l'eau.

II.A.2 Produits chimiques/Instrumentation

○ Réactifs et solvants

Tous les produits chimiques utilisés dans la présente recherche sont de marques Sigma-Aldrich, Fluka et Fisher Scientific.

○ *Solvants*

Sont des produits commerciaux utilisés sans purification préalable : L'eau bi-distillée. Le DMSO, L'acétate d'éthyle (AcOEt, Téb = 77°C), le dichlorométhane (DCM, Téb = 40°C), l'éther diéthylique (Téb = 35°C), l'éthanol (EtOH, Téb = 78°C), Le *n*-hexane (95%, Fisher Scientific), le méthanol (MeOH, 99,8%, Sigma-Aldrich).

○ *Produits et réactifs*

Les aminophénols:

- Ortho aminophénol (2AP) (Sigma-Aldrich 99%), Méta aminophénol (3AP) (Sigma-Aldrich 98%) et Para aminophénol (4AP) (Sigma-Aldrich 98%).
- Le formaldéhyde (Fluka, 37%, $d=1,038$, $M=30\text{g/mol}$). Acide phosphoreux (Fluka, 50%). Acide chlorhydrique (Fluka, 37%).

II.A.3 Stratégie de synthèse

On a choisi, dans notre travail pour la synthèse, la méthode qui nous apparue plus simple et plus pratique et conduit directement aux acides α -aminophosphoniques, c'est celle décrit par *Irani-Moedritzer* (voir chapitre I). Dans un ballon à trois cols, un mélange de 0.02 moles de H_3PO_3 à 50% ($V=1.986\text{ml}$) et 0.01 moles d'ortho, para et méta aminophénol ($m=0.545\text{g}$) ont été dissous dans 100 ml d'eau et 50 ml d'acide chlorhydrique. Le mélange a été laissé au reflux pendant 3h à 110°C . Ensuite 0.04 moles de solution de paraformaldéhyde à 37% ($V=3\text{ml}$) a été ajoutée goutte à goutte au mélange réactionnel. Après addition, le mélange a été maintenu à cette température pendant deux heures supplémentaires. L'achèvement de la réaction a été suivi par analyse par CCM. Ensuite, on a éliminé le solvant dans un rotaevaporator.

II.A.4 Méthodes d'analyse

II.A.4.1 Chromatographie

Les chromatographies analytiques (CCM) ont été effectuées sur des plaques Merck en aluminium recouvertes de gel de silice 60 F 254 (épaisseur 0,2 mm) et révélées par une lampe UV réglée sur 254 nm.

II.A.4.2 Point de fusion

Les points de fusion des produits préparés ainsi que les produits de départ sont déterminés à l'aide d'un fusiomètre Stuart Scientifique.

II.A.4.3 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR)

Les spectres d'absorption infrarouge ont été enregistrés dans la région $4000\text{--}500\text{ cm}^{-1}$ avec un spectromètre type JASCO FT/IR-4200 en mode réflexion totale atténuée (ATR). Les transmissions reportées sont exprimées en nombre d'onde (cm^{-1}).

II.A.4.4 Spectrophotométrie ultraviolet-visible (UV-vis)

Les spectres UV-vis ont été enregistrés dans la région 400-1200 nm avec un appareil JASCO V-650. Les cellules sont en deux, avec un trajet optique de 1 cm.

II.A.4.5 Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton ^1H (200 MHz), du carbone ^{13}C (50,3 MHz ou 100,62 MHz) et du phosphore ^{31}P (81,01 MHz ou 161,96 MHz) ont été enregistrés sur des appareils Bruker Avance 300, en utilisant le tétraméthylsilane (TMS) et l'acide phosphorique comme références internes pour les RMN ^1H , ^{13}C et ^{31}P , respectivement. Les déplacements chimiques (δ) sont indiqués en partie par million (ppm). Les multiplicités sont désignées par singulet (s), doublet (d), triplet (t), quadruplet (q) et multiplet (m).

II.A.4.6 L'analyse élémentaire

Les pourcentages de carbone, d'hydrogène et de l'azote ont été déterminés en utilisant l'analyseur Perkin Elmer 2400 CHN. Les prises d'essai sont à l'échelle micro-analytique (1 à 3 μg).

Partie B

Etude théorique des molécules synthétisées par la méthode DFT

II.B.1 Introduction

La modélisation moléculaire est largement utilisée comme un appui pour l'interprétation des résultats expérimentaux, et aussi pour la conception de nouveaux produits possédant des propriétés souhaitables. Dans cette partie, la modélisation moléculaire a été faite pour déterminer certaines propriétés moléculaires importantes comme les propriétés électroniques, la stabilité et la réactivité, qui sont liées à la structure moléculaire.

II.B.2 Théorie de la fonctionnelle de la densité "DFT"

La Théorie de la Fonctionnelle de la Densité ou DFT (*Density Functional Theory*) constitue actuellement l'une des méthodes les plus utilisées dans les calculs quantiques de la structure électronique de la matière (atomes, molécules) aussi bien en physique de la matière condensée qu'en chimie quantique [1]. La DFT trouve ses origines dans le modèle développé par Llewellyn Thomas et Enrico Fermi à la fin des années 1920 [2]. Néanmoins il faudra attendre le milieu des années 1960 et les contributions de Pierre Hohenberg, Walter Kohn et Lu Sham pour que soit établi le formalisme théorique sur lequel repose la méthode actuelle [2].

Les méthodes traditionnelles dans les théories de la structure électronique de la matière, en particulier la théorie Hartree-Fock et les méthodes dérivées de ce formalisme, se fondent sur une fonction d'onde multiélectronique. L'objectif principal de la théorie de la fonctionnelle de la densité est de remplacer la fonction d'onde multiélectronique par la densité électronique en tant que quantité de base pour les calculs. Alors que la fonction d'onde multi électronique dépend de $3N$ variables (ou N est le nombre total de particules du système), la densité est seulement fonction de trois variables, il s'agit donc d'une quantité plus facile à traiter tant mathématiquement que conceptuellement [3]. Le principe de la DFT consiste en une reformulation du problème quantique à N corps en un problème monocorps (ou, à la rigueur, bi-corps si l'on considère les problèmes de spin) avec pour paramètre la densité électronique.

L'idée centrale de la DFT est que la seule densité électronique de l'état fondamental du système détermine entièrement les valeurs moyennes des observables comme par exemple l'énergie [4].

La DFT est également utilisée pour la description thermodynamique des fluides classiques [5]. En 1998, Walter Khon (1923) fut récompensé du prix Nobel de Chimie pour « son développement de la Théorie de la Fonctionnelle de la Densité » [6,7].

Dans ce travail, nous avons réalisé une étude théorique concernant les molécules synthétisées. Le but de notre étude est de calculer les caractéristiques structurales et électroniques avec la méthode de calcul DFT avec la base standard 6-31G (d, p) et la fonctionnelle B3LYP [8], nous avons discuté les propriétés structurales (longueur de liaison, les angles formés entre atomes), les propriétés vibrationnelles, la thermodynamique, les orbitales HOMO-LUMO et la réactivité chimique de ces molécules.

Les paramètres géométriques optimisés, les constantes de rotation, les fréquences vibratoires fondamentaux, l'intensité des bandes IR, charges atomiques et autres paramètres thermodynamiques ont été calculées en utilisant le logiciel Gaussian 09 [9] et visualisées par programme de GAUSSVIEW [10]. Les potentiels DFT surestiment symétriquement (2.5%), les nombres d'ondes vibratoires. Ces écarts sont corrigés soit par calcul corrections anharmoniques explicitement ou par l'introduction d'un champ à l'échelle ou en escaladant directement les nombres d'onde calculées avec un facteur approprié.

Nous avons calibré les nombres d'onde de vibration calculée par la méthode B3LYP avec un facteur d'échelle de 0,9679 [11]. Après mise à l'échelle avec un facteur d'échelle, la déviation à partir de l'expérience sera plus fiable. Les calculs de fréquence analytiques des

géométries optimisées ont été effectués pour confirmer les structures optimisées pour être à un minimum d'énergie et d'obtenir les spectres de vibration théorique. Pour les missions de vibration précise, les modes normaux ont également été analysés en utilisant le programme VEDA 4 [12].

Partie C

Evaluation de l'activité antioxydante

II.C.1 Introduction

Dans le cadre de la découverte de nouveaux antioxydants, nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude des composés aminophosphoniques pour l'évaluation de ces propriétés antioxydantes en utilisant ainsi trois techniques : piégeage du radical DPPH[•], inhibition de l'oxydation du β -carotène et le pouvoir chélateur des ions ferreux.

II.C.2 Matériels et réactifs

II.C.2.1 Réactifs

Les réactifs chimiques utilisés dans cette étude sont : 2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl (DPPH) (de formule brute $C_{18}H_{12}N_5O_6$ et de masse molaire 394, 33 g/mol), Ferrosine, β -carotène, Tween 20, Tween 40, DMSO, acide gallique, $CuCl_2$, $FeCl_2$, Acide linoléique, BHT proviennent de Fluka.

II.C.2.2 Solutions de travail

- L'acide gallique (500 μ g/ml): préparé dans le méthanol. La poudre d'acide gallique (0,5 g) a été dissoute dans 10 ml méthanol et diluée avec 100 ml d'eau distillée pour avoir une concentration de 5mg/ml. De même seront obtenues les concentrations suivantes d'acide gallique : 0 ; $2 \cdot 10^{-3}$; $4 \cdot 10^{-3}$; $6 \cdot 10^{-3}$; $8 \cdot 10^{-3}$; 10^{-2} ; $1,2 \cdot 10^{-2}$; $1,4 \cdot 10^{-2}$; $1,6 \cdot 10^{-2}$ mg/1 qui ont été préparées par dilutions successives avec de l'eau distillée.
- Solution de DPPH (0,1mM): préparée dans l'éthanol.
- BHT (2mg/ml) : préparé dans le méthanol.
- Solution de $FeCl_2$ (0,6mM): préparée dans l'eau distillée (test de chélation du fer ferreux).
- Ferrosine (5 mM): préparée dans le méthanol 80%.
- $FeCl_2$: (0,6mM): préparée dans l'eau distillée (test de chélation du fer ferreux).
- EDTA (100 μ g/ml) : préparé dans l'eau distillée.
- β -carotène (0,5 mg/ml) : préparée dans le chloroforme.
- $FeCl_2$ (0,4%) : préparé dans de l'HCl 3,5% (test de peroxydation de l'acide linoléique).

II.C.3 Méthodes

II.C.3.1 Piégeage du radical libre DPPH• (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil)

Le DPPH• (2,2 diphényl-1-picrylhydrazyl) est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité anti-oxydante en raison de sa stabilité en forme radicale libre et la simplicité de l'analyse. Il absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520nm [13]. L'Effet des trois produits synthétisés sur le radical 2,2-diphényl-1-picrylhdrazyl (DPPH•) a été mesuré, on se basant sur la méthode décrit par Sánchez-Moreno [14]. La solution de DPPH• (0.025 g/l) est préparée à l'avance (au moins 1-2 heures) car la solubilisation est difficile, et elle ne se conserve pas plus de 4-5 jours à -5°C et à l'obscurité. Chaque composé a été dissous dans une solution de méthanol pour préparer des solutions de concentrations (en mg/l) bien déterminées. 50 µl de diverses concentrations de chaque produit ont été ajoutés à 1950 µL de DPPH•. Le mélange réactionnel est agité vigoureusement pendant 10 secondes. Le contenu est ensuite transféré dans un micro-tube de 5 ml. Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est lue à 517 nm sur un spectrophotomètre. Le contrôle positif a été préparé en mélangeant 50µL de solution antioxydant standard (l'acide gallique) à différentes concentrations et 1250µL de DPPH•, tandis que le contrôle négatif a été préparé en mélangeant de l'eau distillée avec 2,5µL de DPPH. La capacité des trois acides α-aminophosphoniques à piéger les radicaux libres est calculée selon l'équation suivante [15]:

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = [(A_c - A_t) / A_c] \times 100$$

A_c : absorbance du contrôle. A_t : Absorbance du test.

La concentration effectrice (EC50) définie comme la concentration de l'échantillon qui produit 50% d'effet piègeur du radical DPPH• est déterminée.

II.C.3.2 Test au β-carotène/acide linoléique

La capacité des produits synthétisés de prévenir le blanchissement du β-carotène est déterminée selon la méthode décrite par N. Kartal et al. [15]. L'émulsion de β-carotène /acide linoléique est préparée par solubilisation de 0,5 mg de β-carotène dans 1 ml du chloroforme, 25µl de l'acide linoléique et 200 mg de Tween 40 sont additionnés. Le chloroforme est évaporé sous pression réduite à 45°C au rotavapeur, par la suite 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés, l'émulsion résultante est agitée vigoureusement. Un volume de 100 ou 150 µl de solution d'aminophosphonates et d'antioxydant de référence (BHT) à 1mg/ml

sont additionnés à 2,5 ml de l'émulsion précédente. Les tubes sont chauffés et incubés à 50°C pendant 2 heures dans un bain-marie. Le contrôle négatif contient tous les réactifs à l'exception de l'échantillon à tester qui est remplacé par un volume égal de méthanol. La cinétique de décoloration de l'émulsion (l'oxydation) en présence et en absence d'antioxydant est suivie à 490 nm à des intervalles de 15 minutes pendant 2 heures, jusqu'à ce que la couleur du β -carotène disparaisse. L'activité anti-oxydante des extraits est calculée selon l'équation suivante :

$$AA = 100 \times [1 - (AE_0 - AE_{120}) / (AC_0 - AC_{120})]$$

AE_0 : Absorbance à 490 nm d'échantillons testés à $t = 0$ min. AE_{120} : Absorbance à 490 nm d'échantillons testés à $t = 120$ min. AC_0 : Absorbance à 490 nm du contrôle à $t = 0$ min.

AC_{120} : Absorbance à 490 nm du contrôle à $t = 120$ min.

II.C.3.3 Chélation du fer ferreux

La capacité chélatrice des produits synthétisés est déterminée selon la méthode de Le et al. [16] qui est basée sur l'inhibition de la formation du complexe Fe(II)-Ferrosine après le traitement des échantillons avec les ions Fe^{2+} . Cinq cent microlitres des solutions d'acides aminophosphoniques ou du chélateur standard (EDTA) à différentes concentrations sont additionnées à 100 μ l de $FeCl_2$ (0.6 mM) et 900 μ l de méthanol. Après 5 min d'incubation, cent microlitres de ferrosine (5 mM) sont ajoutés, et le mélange est agité et laissé réagir pendant 10 min pour permettre la complexation du fer résiduel. L'absorbance du complexe Fe^{2+} -ferrosine est mesurée à 562 nm. L'activité chélatrice est exprimée en pourcentage en utilisant l'équation ci-dessous :

$$\text{Activité chélatrice (\%)} = [(Ac - At) / Ac] \times 100$$

Ac : absorbance du contrôle à 562. At : Absorbance du test à 562.

Les composés ont été utilisés à des concentrations finales allant de 5 à 300 μ g/ml. Pour une caractérisation meilleure de l'efficacité des extraits, la concentration effectrice (CI50) définie comme la concentration de l'échantillon qui produit 50% d'effet chélateur.

II.C.3.4 Analyses Statistique

Toutes les mesures ont été effectuées en triplicata, et présentées sous forme de moyenne $\pm$ SD. Les analyses de corrélation et de régression linéaire ont été effectuées à l'aide de logiciel Origin 6.0.

Partie D

Détermination de l'activité antibactérienne et antifongique

II.D.1 Introduction

Une des principales causes de morbidité et de mortalité chez les patients immunodéprimés dans les pays en développement est principalement due à la vie menaçant par les maladies infectieuses proviennent de divers micro-organismes pathogènes. Un grand nombre de médicaments ont été découverts jusqu'ici pour lutter contre cette situation. Mais aucun de ces médicaments ne pourrait détruire complètement ces micro-organismes dans certains cas, parce que ces organismes ont développé une résistance à ces médicaments. Par conséquent, les médicaments déjà utilisés perdent progressivement leur efficacité. La découverte de nouveaux antibiotiques qui sont beaucoup plus efficaces contre ces micro-organismes est essentielle.

Les α -aminophosphonates sont une classe importante de composés, ils sont considérés comme des analogues structuraux des acides α -aminés correspondants, ils utilisés comme inhibiteurs d'enzymes, des antibiotiques et des agents pharmacologiques [17]. Ces composés ont déjà été trouvés à agir comme des agents antibactériens et antifongique avec certains d'entre eux déjà commercialisée [18].

Dans ce contexte, ces données biologiques ont amené à étudier l'activité biologique de molécules synthétisées : (**oAPac**), (**mAPac**) et (**pAPac**).

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de nos produits, consiste à estimer l'inhibition de la croissance des microorganismes (bactéries et levures) en contact de différents produits, et ceci par la méthode de diffusion sur disque en utilisant des disques de 6 mm de diamètre.

II.D.2 Matériels et réactifs

- Milieux et bouillons de culture : Mueller Hinton (MH)
- Réactifs tests (oAPac, mAPac, pAPac, 2AP, 3AP et 4AP) et les Standards (Chloramphenicol, La nystatine).

II.D.3 Les germes à tester

L'activité antibactérienne, les concentrations minimales inhibitrices (CMI), les concentrations minimales bactericides (MBC) et l'activité antifongique ont été déterminé

contre quatre bactéries Gram-positives (*Bacillus subtilis* (ATCC6633), *Bacillus megaterium* (ATCC 14581), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), et *Enterobacter aerogenes* (ATCC13048), quatre gram négative (*Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC23564) et *Klebsiella pneumoniae* (ATCC700603) et contre trois champignons (*Candida albicans* (ATCC90028) *Aspergillus fumigatus* (ATCC 204305) et *Aspergillus flavus* (ATCC 204304).

- Le choix des souches est basé sur leurs différences pariétales (Gram+ et Gram-), les problèmes qu'elles causent en clinique ainsi que le défi qu'elles posent à l'antibiothérapie moderne.
- Tous les organismes ont été recueillis à partir du laboratoire de recherche de microbiologie de l'Université de Khemis Miliana.

II.D.4 Technique de disque:

La méthode des disques est couramment utilisée au laboratoire, elle permet de tester, *in vitro*, la sensibilité d'une souche bactérienne aux différents produits tests. Une suspension de la souche à tester est déposée à la surface. L'essai antibiotique a été réalisé par la méthode de diffusion sur gélose. La gélose Muller-Hinton a été utilisée pour l'essai de la sensibilité des différentes souches [19].

Les composés synthétisés et les produits de départ ont été criblés *in vitro* pour leur activité antibactérienne contre quatre souches bactériennes Gram-négatifs et quatre Gram-positives en utilisant la méthode de diffusion sur disque [20,21]. En bref, des quantités des composés à tester (oAPac, mAPac, pAPac, 2AP, 3AP et 4 AP) ont été dissous dans du DMSO dans trois flacons différents pour obtenir des solutions ayant des concentrations de 50 µg/ml, 75 µg/ml et 100 µg/ml respectivement. Ils ont ensuite été appliquées sur le disque de papier filtre. Le Chloramphénicol (Standard) (100 µg/ml) a été utilisé comme contrôle positif et du DMSO comme contrôle négatif. Les disques contenant les produits à tester et le témoin ont été placés dans des boîtes de Pétri ensemencées avec organisme dans un milieu de gélose nutritive (MH). Les boîtes de Pétri ont été conservées dans un réfrigérateur à 4 °C pendant 24 heures pour assurer une diffusion des matériaux d'essai. Enfin, elles ont été incubées à 37±1°C pendant 24 heures et toutes les expériences ont été réalisées en triplicata. L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition en mm.

II.D.5 Détermination de la CMI, la CMB et CMF (paramètres d'activité)

L'analyse de l'activité d'un produit donné sur une bactérie a conduit à définir un certain nombre de paramètres qualitatifs et quantitatifs, pour chaque antibiotique on mesure le diamètre d'inhibition en (mm) et en déduit la sensibilité ou la résistance. On définit les concentrations critiques suivantes:

CMI: La Concentration Minimale Inhibitrice ou CMI (en anglais MIC, pour Minimal Inhibitory Concentration). Dans la pratique, on définit la CMI comme la concentration minimale d'antibiotique permettant d'inhiber (bactériostase) totalement la multiplication bactérienne, après 18 à 24 heures de contact à 37 °C. Sa détermination a été faite par observation du trouble induit par la croissance des germes étudiés dans chaque tube. La CMI a été la plus petite concentration pour laquelle il n'y a pas eu de trouble observé à l'œil nu.

CMB: La Concentration Minimale Bactéricide, qui est la plus faible concentration permettant de détruire ou de tuer (bactéricide) 99,99 % des bactéries après 18 à 24 heures de contact avec l'antibiotique, c'est-à-dire qui laisse au plus 0,01% de germes survivants.

CMF: La Concentration Minimale Fongicide, qui est définie comme étant la plus faible concentration du produit pour laquelle il y a absence totale de colonie après 5-7 jours de culture à 26°C.

La concentration minimale inhibitrice (CMI), la concentration minimale bactéricide (MBC) et concentration minimale fongicide (CMF) de oAPac, mAPac, pAPac, 2AP, 4AP et 3AP, ont été déterminées par la technique de dilution en milieu liquide en série contre les bactéries pathogènes mentionnés ci-dessus [22,23]. Cette technique est basée sur la préparation, dans une série de tubes, d'une gamme de concentrations d'antibiotique à tester, puis l'addition d'une même quantité de germes. Après incubation à 37 °C pendant 18 heures on détermine la plus faible concentration d'antibiotique inhibant la croissance bactérienne visible à l'œil nu. Les réactifs (oAPac, mAPac, pAPac, 2AP, 4AP et 3AP) ont été testé pour une gamme de concentration de 0,25 µg / ml à 256 µg/ml. Un tube à essai témoin contenant seulement le milieu de bouillon nutritif a été utilisé pour confirmer la stérilité du milieu. La suspension bactérienne (10 µl) contenant 10^6 cells / ml a été inoculé dans tous les tubes. Tous les tubes à essai ont été incubées à 37 ± 1 °C, pour observés la croissance bactérienne pendant 24 heures pour la CMI et 96 heures (4 jours) pour les déterminations CMB après l'inoculation pendant 24 heures, le tube à essai avec aucune croissance visible du micro-organisme est pris pour représenter la valeur CMI de l'échantillon en µg/ml. CMB, dans lequel aucun organisme

viable est produite a été déterminée en maintenant les tubes à essai qui a été utilisé pour la détermination de CMI pendant quatre jours. Après quatre jours, la croissance bactérienne n'a été observée et CMB est déterminée à plus faibles ou aucun croissance bactérienne a été composés (oAPac, mAPac, pAPac) et les composés de départ (2AP, 3AP et 4 AP). L'analyse de la concentration minimale bactéricide et de la concentration minimale inhibitrice (CMB/CMI) permet de caractériser l'effet de l'antibiotique étudié sur une souche bactérienne donnée.

II.D.6 Evaluation du pouvoir bactéricide et bactériostatique

L'action d'un antibactérien sur les souches bactériennes peut être caractérisé par deux paramètres tels que la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration bactéricide minimale (MBC). Selon le rapport CMB/CMI, nous avons apprécié l'activité antibactérienne.

- Lorsque le rapport $CMB / CMI = 1$, l'antibiotique est dit « bactéricide absolu ».
- Si le rapport $MBC/MIC \leq 4$, l'effet était considéré comme bactéricide.
- Si le rapport $MBC/MIC > 4$, l'effet a été définie comme bactériostatique [24,25].

II.D.7 Activité antifongique

Pour le criblage antifongique, chaque échantillon a été testé à des concentrations de 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$. Le protocole expérimental était presque identique de criblage antibactérien à l'exception les plaques ont été incubées à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 48 h. La Nystatine est utilisée comme témoin positif. **La nystatine** est un antifongique du groupe des antibiotiques polyènes, produit par la croissance de *Streptomycesnoursei* [25].

II.D.8 Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués *in vitro* sont exprimés en moyenne $\pm$ SD. Les valeurs EC_{50} (concentration effective à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition=f (concentrations)] par logiciel Origin 6.0

Références bibliographiques

- [1] W.A. Harissan., S. Ciraci, *Phys. Rev. B* 10, p 1516(1974).
- [2] M.L. Cohen., J.R. Chelikosky, Springer series in solid state sciences ed Springer new York(1988).
- [3] K. Kassali, Thèse de Doctorat, Université de Sétif, Algérie(2005).
- [4] H. Aourag, «Pseudopotential method theory and practice», Winter College on Computational condensed matter physics, University of Sidi Bel-Abbes (1995).
- [5] I.V. Abarenkov, V. Heine, *P. Mag.* 12, 529 (1965).
- [6] H. Nara and T. Kobayasi. , *J. Phys. Soc. Japan* 41, 1429 (1976).
- [7] J.R. Celikowsky. and M. L. Cohen., *Phys. Rev. B*14, 556 (1976).
- [8] W. Kohn and Sham. L. G, «Self-consistent equations including exchange and correlation effects», *Phys. Rev.*, (140) 1133–1138, (1965).
- [9] M.J. Frisch. Gaussian 09, Revision A.1, Gaussian, Inc., Wallingford CT (2009).
- [10] A. Frisch, A.B. Nielson., A. G. Holder., GAUSSVIEW User Manual, Gaussian Inc., Pittsburgh, PA (2000).
- [11] A.P. Scott., Radom. L, «Harmonic Vibrational Frequencies: An Evaluation of Hartree-Fock, Moller–Plesset, Quadratic Configuration Interaction, Density Functional Theory, and Semiempirical Scale Factors», *J. Phys. Chem.*, 100, p 16503–16513 (1996).
- [12] M.H. Jamroz, «Vibrational Energy Distribution Analysis: VEDA 4 program», Warsaw (2004).
- [13] B. Bozin, N. Mimica-Dukic, I. Samojlik, A. Goran and R. Igic, Phenolics as antioxydants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae), *Food Chemistry*, 111,, P. 925-929 (2008).
- [14] C. Sánchez-Moreno, J.A. Larrauri, F. Saura-Calixto, 79: 1301–1304(1999).
- [15] N. Kartal, M.Sokmen, B. Tepe, D. Daferera, M. Polissiou and A. Sokmen, Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*, 100, 584–589 (2007).
- [16] K. Le, F. Chiu, K. Ng, Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*.105: 353-363 (2007).
- [17] M.R. Saidi, N. Azizi, *Syn. Let.*, 1347 (2002).
- [18] F.R. Atherton; C. H. Hassal, R. W. Lambert, *J. Med. Chem.*, 30, 1603 (1987).
- [19] R. Rummel, M. van Gelderen, R. Koop, E. Schrama, F. Sansò, M. Brovelli, F. Migliaccio, F. Sacerdote, Spherical Harmonic analysis of satellite gradiometry. *PublGeodesy, New Series, Netherlands Geodetic. Commission, Delft* (1993).
- [20] K.R. Cruickshank, Medical Microbiology, A Guide to Diagnosis and Control of Infection, 2nd Ed. E.S. Livingston Ltd., Edinburgh and London (1968).
- [21] A. W. Beuer, M. M. Kirby , J. C. Sherries and A.Truck, *Am J ClinPathol.*, , 45, 493 (1969).
- [22] J.R. Starke Chapter 32: Infective Endocarditis. In: Feigin RD, Cherry JD (eds). *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*, 4th edition., Philadelphia: W.B. Saunders, pp. 315-338 (1998).

- [23] K.I. waki, S. Koya-Miyata, K. Kohno, S. Ushio. *Nat. Med.*, 53: 72-79.
- [24] P. Berche, J.L. Gaillard, M. Simonet: In Nosocomial Infections Caused by Bacteria and Their Prevention in Bacteriology. Edited by Flammarion Medicine Sciences, 64-71 (**1988**).
- [25] D. Gatsing, V. Tchakoute, D. Ngamga, J.R. Kuate, J.D.D Tamokou. *Iran. J. Med. Sci.* 34: 126-136 (**2009**).

CHAPITRE III

SYNTHESES ET CARACTERISATION

III.1 Introduction

La voie principale d'accès direct aux acides α -aminophosphoniques est une réaction *one-pot* de trois composants dont deux réactifs sont de caractère nucléophile et le troisième est de caractère électrophile, cette réaction est connue sous le nom de réaction *d'Irani-Moedritzer*. Elle met en jeu un composé carbonylé, une amine et un acide phosphoreux dans un milieu acide, selon la séquence suivante :

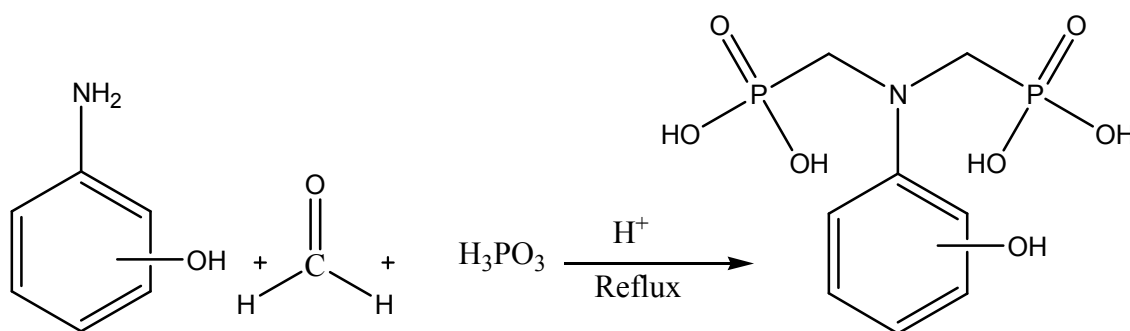


Schéma III.1: Séquences réactionnelles de synthèse des acides α -aminophosphoniques.

NB. Pour faciliter le travail, on a donné des abréviations aux produits synthétisés de la manière suivante :

- **pAPac:** pour le produit obtenu à partir de Para aminophénol.
- **oAPac:** pour le produit obtenu à partir d'Ortho aminophénol.
- **mAPac:** pour le produit obtenu à partir de Méta aminophénol.

III.2 Détermination des propriétés physiques des produits synthétisés

Nous avons suivi le déroulement des réactions chimiques par des tests de CCM. On a préparé de petites plaques CCM (10x7cm) sur lesquelles on a déposés des taches des produits obtenus et celle des aminophénols (produits de départ). Dans ce travail on a fait une étude pour le choix du bon système d'élution. Le choix est basé sur la bonne migration des échantillons analysés. Le meilleur système trouvé est L'AcOEt (moyennement polaire) et le n-Hexane (apolaire) avec un rapport (2/8, V/V).

L'analyse des plaques sous une lampe UV permet d'estimer la fin des réactions et de dire que les produits obtenus sont purs ou non. Dans notre cas, l'apparition d'une seule

tache, pour chaque produit synthétisé et qui est différente de celle du produit de départ, constituée un critère de confirmation de la fin de la réaction et l'obtention de nouveaux produits. Il suffit donc de déterminer le rapport frontal de chaque produit (voir les résultats regroupés ci-dessous). Le rapport frontal (R_f) est une valeur importante à connaître et facile à déterminer, il est défini comme le rapport entre la distance (d) parcourue par l'origine de la substance ayant migré et la distance (D) parcourue par l'origine et le front du solvant:

$$R_f = d/D$$

Tableau III.1: Valeurs des rapports frontaux des produits synthétisés.

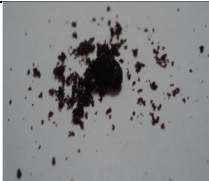
Eluant : Acétate d'éthyle / n-Hexane	
Produits	Rapport frontal
pAPac	0.39
4AP	0.63
oAPac	0.62
2AP	0.88
mAPac	0.55
3AP	0.91

D'après les résultats mentionnés sur le tableau ci-dessus, on note que les molécules polaires migrent moins. Ceci est dû à la silice (polaire) qui retient les produits polaires. Alors que les molécules peu polaires (molécule de départ) migreront le mieux, car elles seront entraînées par l'éluant plutôt apolaire. Les rendements des réactions sont calculés juste après la fin des réactions par l'équation suivante :

$$R(\%) = \frac{\text{Masse expérimentale}}{\text{Masse théorique}} \times 100$$

Les résultats ont montré que les acides α -aminophosphoniques sont synthétisés avec des rendements allant de 83 à 88% (Tableau III.4). La couleur des produits obtenus varie entre le marron foncé et le rouge brique. En ce qui concerne l'aspect, tous les produits sont à l'état solide.

Tableau III.2: Aspects et couleurs des produits obtenus.

Produits	pAPac	oAPac	mAPac
Aspect			
	Solide marron	Solide marron	Solide marron

La solubilité est la capacité d'une substance, appelée soluté, à se dissoudre dans une autre substance, appelée solvant, pour former un mélange homogène appelé solution. Les tests qualitatifs effectués permettent l'obtention des résultats mentionnés sur le tableau ci-dessous:

Tableau III.3: solubilité des produits synthétisés dans des solvants usuels.

Solvants	pAPac	oAPac	mAPac
<i>Eau</i>	++++	++++	++++
<i>Ethanol</i>	+++	+++	+++
<i>Méthanol</i>	+++	+++	+++
<i>DMSO</i>	+++	+++	+++
<i>Acetate d'éthyle</i>	++	++	++
<i>n-hexane</i>	+	+	+
++++: Très soluble		+++ : Soluble	
++: Peu soluble		+: Très peu soluble	

Les acides synthétisés sont parfaitement soluble dans l'eau et les solvants polaires. Le point de fusion est la température à laquelle un corps passe de l'état solide à l'état liquide. Il s'agit d'une propriété physique caractéristique de la matière. Cette mesure est un critère de pureté très répandu au laboratoire. La prise du point de fusion des produits obtenus s'est faite par un fusiomètre Stuart-Scientifique. Les résultats de la mesure des points de fusion (Tableau III.4) montrent que les produits synthétisés ont des valeurs nettement différentes à celle des produits de départ. La dénomination des produits obtenus a été faite selon IUPAC. L'ensemble des résultats sont mentionnés dans le tableau ci-dessous :

Tableau III.4: Propriétés générales des produits synthétisés.

Composé	Pf °C	Rdt %	Dénomination (IUPAC)
pAPac	134/(186-188 pour 4AP)	88	Acide p-methyl-phenyl-amino-di(methyl phosphonique)
oAPac	161/(172-174 pour 2AP)	83	Acide o-methyl-phenyl-amino-di(methyl phosphonique)
mAPac	145/(121-124 pour 3AP)	87	Acide m-methyl-phenyl-amino-di(methyl phosphonique)

III.3. Caractérisation des produits synthétisés

III.3.1. Analyse par spectroscopie infrarouge

L'analyse des spectres IR s'est effectuée par comparaison des spectres des produits obtenus avec ceux des produits de départ correspondants. En effet, s'il y a formation d'un

nouveau produit, on observe un déplacement de certaines bandes et apparition ou la dispersion de certaines bandes.

Dans notre étude, on basé sur deux techniques pour interpréter les spectres IR :

- La comparaison des spectres des produits synthétisés avec ceux des produits de départ.
- Le repérage et l'identification des bandes grâce à des tables de valeur que l'on trouve dans des ouvrages spécialisés.

L'obtention des acides α -aminophosphoniques a été confirmée par mesure FTIR. Les spectres d'absorption IR des produits synthétisés et ces produits de départ correspondants sont donnés dans les Fig.III.1-III.3. Ces figures illustrent les spectres d'absorption infrarouge des produits préparés et les produits de départ, sur lesquels nous décelons aisément la disparition des bandes de la fonction amine primaire et l'apparition des bandes d'absorption attribuables aux groupements POH, P-C, P=O et OH phosphonique, dans les produits synthétisés.

Tous les composés synthétisés présentent des bandes d'absorption du carbone (sp^3) à $2930-2290\text{cm}^{-1}$. Les acides α -aminophosphoniques présentent des bandes caractéristiques pour la fonction -O-H phosphonique à $3300-3400\text{cm}^{-1}$. Le pic à 1645cm^{-1} est dû au stretching de la fonction -P(O)-OH et les bandes d'absorption à 1256cm^{-1} et 957cm^{-1} sont affectées aux modes stretching de P=O et P-O, respectivement. Le fort pic à 1378cm^{-1} est attribué à la bending de la liaison P-CH₂ qui pourrait être mis à profit pour confirmer la formation d'une liaison entre l'acide phosphoreux et le méthanal. Les pics à 1510 et 1604cm^{-1} sont des vibrations de cycle aromatique. La large bande d'absorption de $3500-3600\text{cm}^{-1}$ provient de l'étirage de -OH phénolique du groupe phénol.

Les groupements amines primaires (aminophénols) sont responsables de l'apparition de deux bandes d'inégale importance (voir les figures ci-dessous) vers $2935-3369\text{cm}^{-1}$ dues aux vibrations d'élongations ν (NH₂). Alors que les amines secondaires et tertiaires (les acides α -aminophosphoniques formés) ne donnent qu'une seule et faible bande.

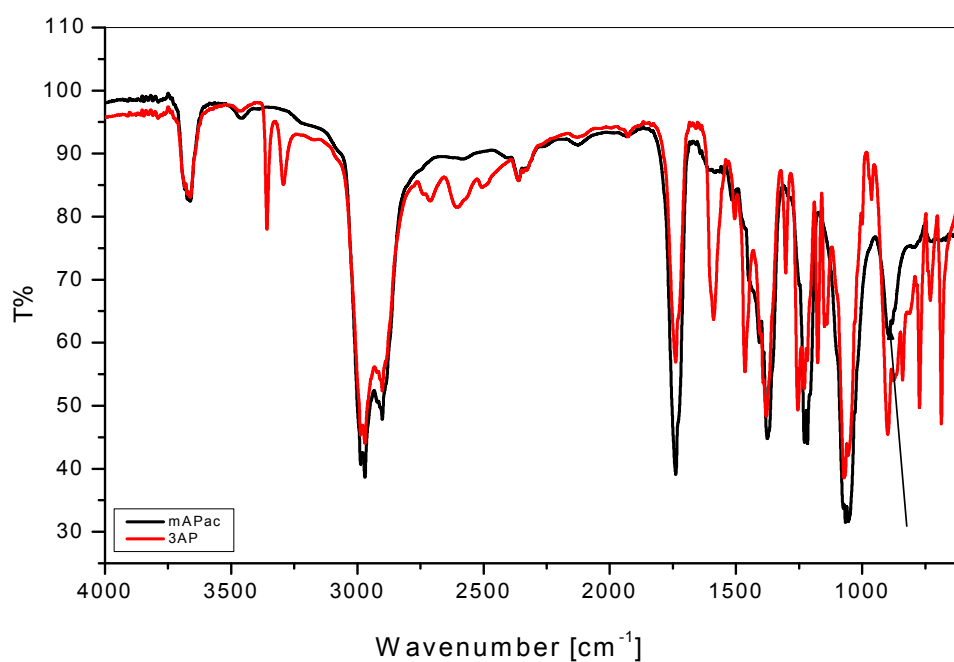


Fig. III.1: Spectres infra rouge de mAPac (noir)/3AP (rouge).

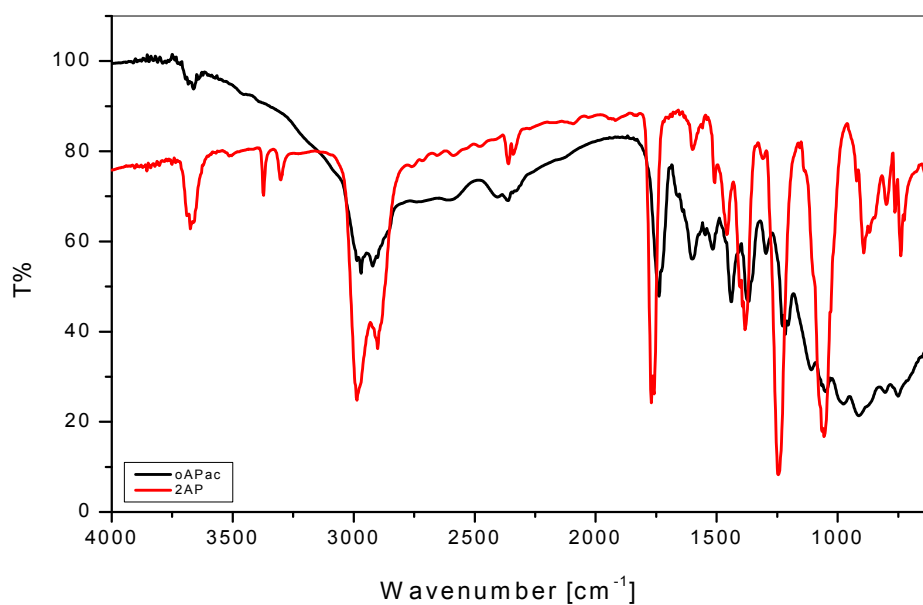


Fig. III.2: Spectres infra rouge de oAPac (noir)/2AP (rouge).

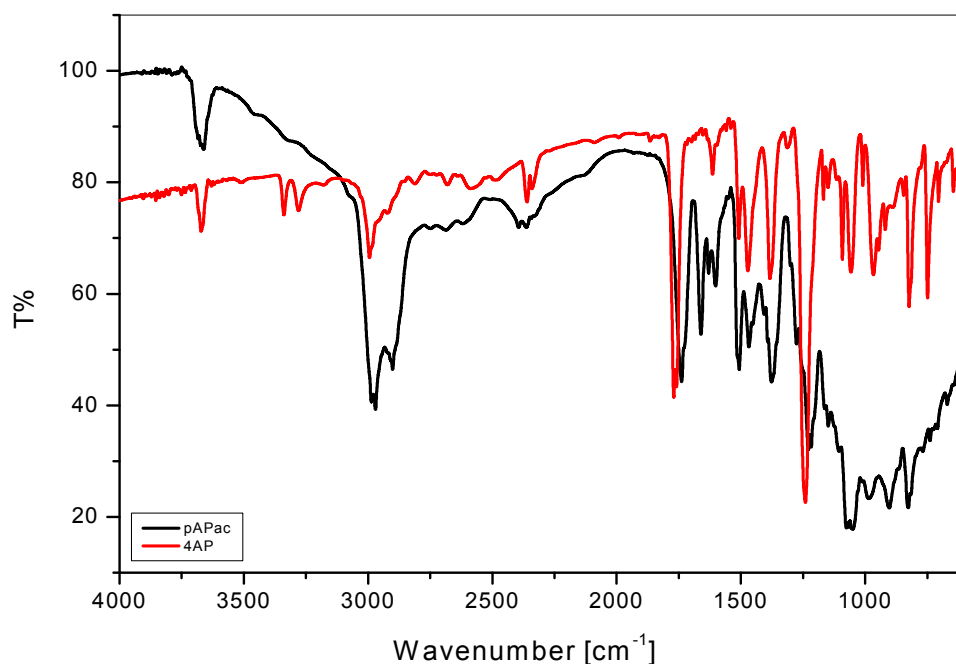


Fig. III.3: Spectres infra rouge de pAPac (noir)/4AP (rouge).

Le tableau suivant illustre les principales bandes d'absorption des produits synthétisés comparés avec celles des produits de départ.

Tableau III.5: Principales bandes d'absorption infrarouge des produits synthétisés et leurs produits de départ correspondants.

composés	FT-IR cm^{-1}							
	OH _{phos.}	OH _{phenol.}	P=O	P-O	P(O)-OH	P-C	N-C	N(III)
pAPac	3460-3060	3500~3750	1250	957	1457	1378	1645	-
4AP	-	3500~3750	-	-	-	-	-	3100-3250
mAPac	3400-3058	3500~3750	1249	942	1460	1377	1640	-
3AP	-	3500~3750	-	-	-	-	-	3100-3250
oAPac	3300-3060	3500~3750	1258	960	1455	1370	1630	-
2AP	-	3500~3750	-	-	-	-	-	3100-3250

III.3.2. Analyse par Spectrophotométrie UV-Visible :

Les spectres UV-Vis sont utilisés, d'une part, en analyse quantitative par application de la loi de Beer Lambert, ce qui permet de calculer le coefficient d'absorption molaire ϵ . Et d'autre part, en analyse qualitative par comparaison des spectres des produits synthétisés

avec ceux des produits de départ dont l'objectif est de prouver qu'il existe des différences significatives (λ_{max} différents) entre les produits de départ et les produits synthétisés.

Les spectres électroniques d'absorption des produits analysés ont été enregistrés dans l'éthanol à la température ambiante sur des solutions de même concentration dans des cuves en quartz de trajet optique de 1 mm dans le domaine allant de 200 nm à 900nm,

Dans les spectres d'absorption, les ordonnées représentent l'absorption de la lumière transmise en fonction des longueurs d'onde représentées en abscisse. Les figures III.4-III.6 représentent les spectres d'absorption des différents acides synthétisés et leurs produits de départ dans le domaine de l'ultraviolet entre 200-400 nm et dans le domaine du visible entre 400-900 nm.

Dans le domaine de l'ultraviolet, tous les spectres des produits de départ présentent une bande d'absorption intense située aux alentours de **220-230nm**. Mais, aucune propriété absorbante dans le domaine du visible (400- 800nm) n'est observée. Alors que les produits synthétisés sont caractérisés par des absorbances totalement différentes par rapport au produit de départ (voir les figures III.4, III.5, III.6).

- L'acide α -aminophosphonique **mAPac** est caractérisé par quatre bandes d'absorption, une bande très intense située à $\lambda_{\text{max}} = 218\text{nm}$, une bande d'intensité moyenne à $\lambda_{\text{max}} = 278 \text{ nm}$ et une bande de faible intensité située à $\lambda_{\text{max}} = 393 \text{ nm}$ et une autre très faible à $\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$.
- L'acide α -aminophosphonique **oAPac** est caractérisé par quatre bandes d'absorption, une bande très intense située à $\lambda_{\text{max}} = 219\text{nm}$, une bande d'intensité moyenne à $\lambda_{\text{max}} = 280 \text{ nm}$ et une bande de faible intensité située à $\lambda_{\text{max}} = 327 \text{ nm}$ et une autre très faible à $\lambda_{\text{max}} = 467 \text{ nm}$.
- L'acide α -aminophosphonique **pAPac** est caractérisé par quatre bandes d'absorption, une bande très intense située à $\lambda_{\text{max}} = 218\text{nm}$, une bande d'intensité moyenne à $\lambda_{\text{max}} = 245 \text{ nm}$ et une bande de faible intensité située à $\lambda_{\text{max}} = 285 \text{ nm}$ et une autre très faible à $\lambda_{\text{max}} = 343 \text{ nm}$.

Les spectres des produits synthétisés sont bien différents de ceux des produits de départ, dont on a constaté, notamment des déplacements significatifs de λ_{max} des bandes et l'apparition de des épaulements caractéristiques des acides α -aminophosphoniques.

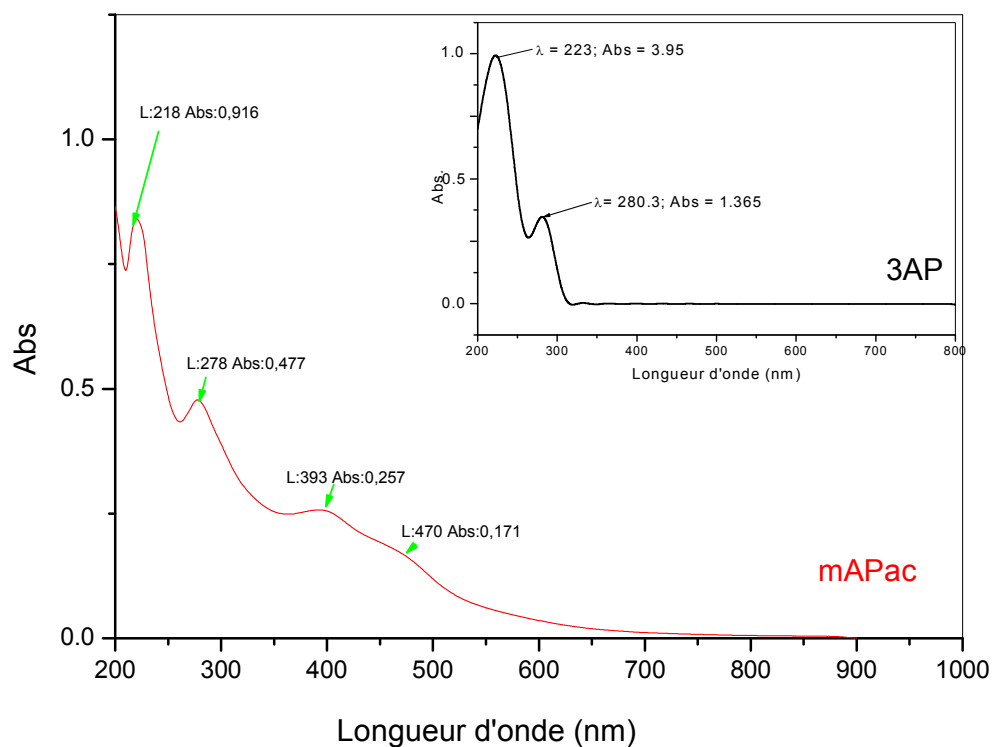


Fig. III.4: Spectres d'absorption UV-vis du mAPac / 3AP.

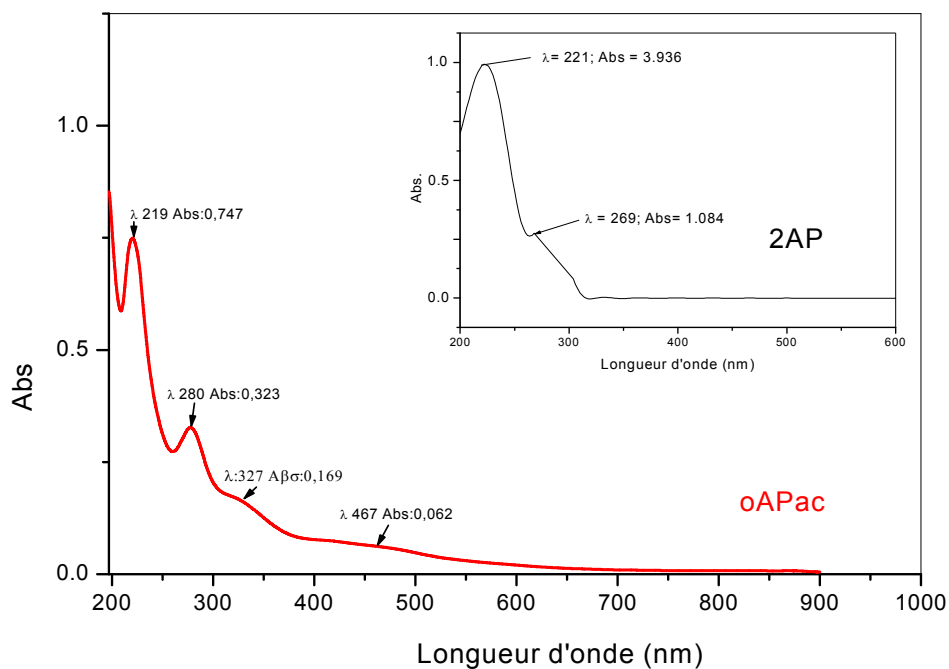


Fig. III.5 : Spectres d'absorption UV-vis du oAPac / 2AP.

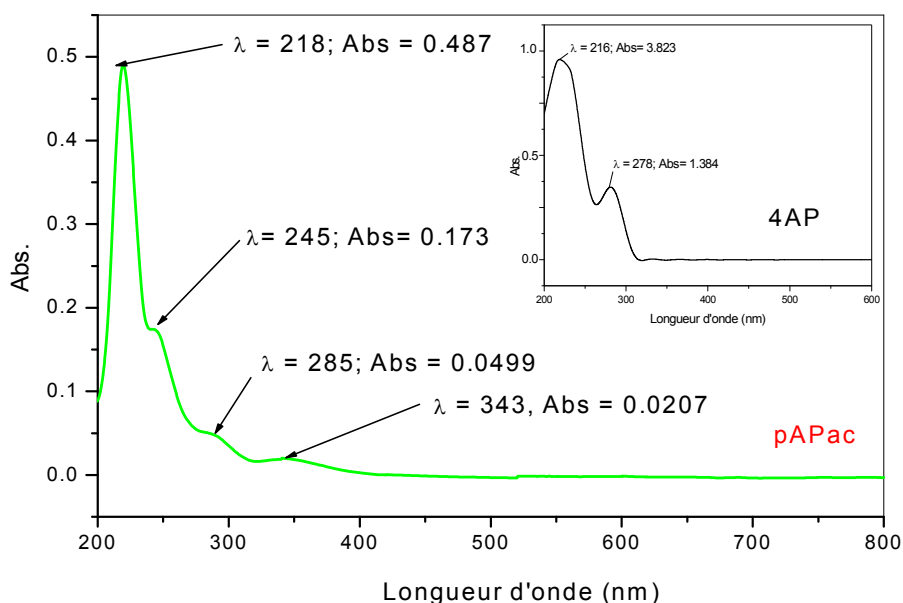


Fig. III.6 : Spectres d'absorption UV-vis du pAPac / 4AP.

L'absorption des radiations UV par une molécule, entraîne des transitions électroniques, c'est-à-dire le passage d'une orbitale de basse énergie à une orbitale de niveau énergétique plus élevé. Les diverses transitions possibles dans nos molécules peuvent être :

- **Transition $\sigma\text{-}\sigma^*$** : Un électron d'orbitale liante σ peut être promu par absorption d'une énergie ΔE dans l'orbitale anti-liante σ^* .
- **Transition $n\text{-}\sigma^*$** : elle se produit habituellement à des longueurs d'ondes voisines de 200nm et sont observables dans de nombreux composés présentant des hétéroatomes simplement liés, comme dans notre cas : Liaison O-H, N-H, P-O, ...etc. ces transitions nécessitent des énergies plus faibles que les transitions $\sigma\text{-}\sigma^*$.
- **Transition $n\text{-}\pi^*$** : lorsqu'un hétéroatome porteur d'électrons libres, n, une transition de faible énergie peut se produire. Celle-ci a pour effet de faire passer un électron n, non liant, dans une orbitale anti-liante π^* .

Les spectres UV-Vis sont le plus souvent utilisés en analyse quantitative par application de la loi de Beer Lambert, ce qui permet de déterminer un paramètre important qui caractérise chaque substance, c'est le coefficient d'absorption molaire ϵ . On a tracé les spectres des produits synthétisés pour une concentration $C=10^{-4}\text{M}$. La loi de Beer Lambert permet de calculer ϵ : **Abs = $\epsilon \cdot l \cdot C$**

Les valeurs des longueurs d'ondes et des coefficients d'absorption molaire sont représentées dans le [Tableau III.6](#).

Tableau III.6: Résultats des spectres d'absorption électroniques des produits synthétisés.

Composés	λ_{max} (nm)	Abs.	C (mol.L)	ϵ (mol ⁻¹ .L.cm ⁻¹)
oAPac	218	0.747	10 ⁻⁴	7470
mAPac	218	0.916	10 ⁻⁴	9160
pAPac	219	0.487	10 ⁻⁴	4870

λ : Longueur d'onde exprimé en nm

ϵ : Coefficient d'absorption molaire exprimé en mol⁻¹.L.cm⁻¹

III.3.3. Analyse par la RMN

La spectroscopie RMN ¹H des produits obtenus a permis de confirmer les structures attendues. Par intégration du signal de résonance des extrémités on note :

- Dans le spectre RMN ¹H de pAPac, les quatre protons méthylène résonnent comme singulet à 2 ppm. Les autres signaux consécutifs correspondent aux protons des groupes phosphoniques résonnent comme singulet à 3.38 ppm. Les protons aromatiques résonnent comme singulet à 6.42 à 7.65 ppm. Le proton phénolique résonne comme singulet à 5 ppm ([Fig.III.7](#)).
- D'autre part l'atome de carbone de méthylène était à 57.7 ppm dans la RMN ¹³C, les atomes de carbones en composés aromatiques ont montré une résonance à 114.7 et 116.6 ppm ([Fig.III.8](#)).
- Le spectre RMN ¹H de oAPac montre un multiplet dans la région 6.00-7.00 ppm pour les protons aromatiques. Les protons N-CH₂ du groupe méthylène sont apparus comme un singulet à 3.37 à 3.54 ppm tandis que le proton OH du groupe phosphonique apparaît comme un singulet à 1.99 ppm. Les protons phénoliques sont apparus dans la région de 4.89 ppm ([Fig.III.10](#)).
- La RMN ¹³C montre des signaux à 100.2, 105.19, 130 et 158.3 et 146 pour les aromatiques CH, C-OH et CN, respectivement. Le carbone de méthylène était à 57.7 ppm ce qui confirme la structure des produits ([Fig.III.11](#)).
- Le Spectre RMN ¹H du composé **mAPac** démontré un singulet à 2.16 ppm dû aux protons phosphoniques, le singulet à 3.54 ppm a été attribué aux protons de méthylène.

Les protons aromatiques sont apparus comme un multiplet à 6.47 à 6.64 ppm. Le proton OH apparu comme singulet à 4.98 ppm (Fig.III.13).

- Le spectre RMN ^{13}C présentait les signaux suivants: carbone méthylène à 57.9 ppm, les carbones aromatiques de 116.4 à 132, le carbone C-N à 131.5 et 142.7 ppm pour (= C-N).

La spectroscopie RMN ^{31}P est la méthode la plus précise pour la détermination de la structure des composés contenant du phosphore.

- Les déplacements chimiques pour RMN ^{31}P des trois acides α -aminophosphoniques synthétisés dépendent de déséquilibre des liaisons σ provoquées par la différence d'électronégativité des atomes et par l'effet des paires d'électrons libres, le degré d'occupation des orbitales d de phosphore et la déviation de la symétrie géométrique. Les atomes de phosphore de trois acides α -aminophosphoniques dans le spectre RMN ^{31}P apparaît à 17-22 ppm (Fig. III.9, Fig. III.12, Fig. III.15).

De ces résultats, nous confirmons la synthèse avec succès des acides α -aminophosphoniques avec une grande pureté.

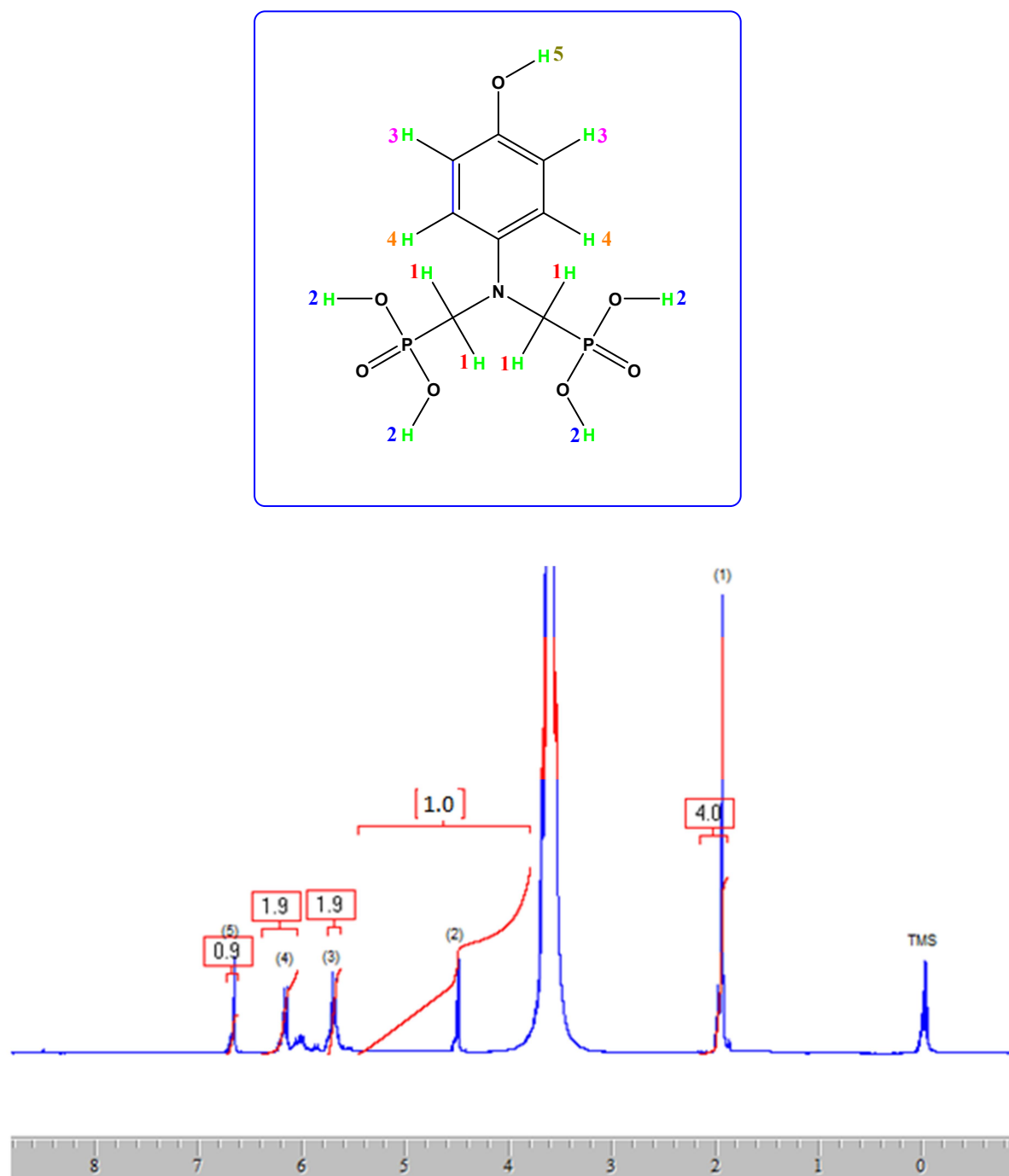


Fig.III.7: Spectre RMN ^1H du produit **pAPac**.

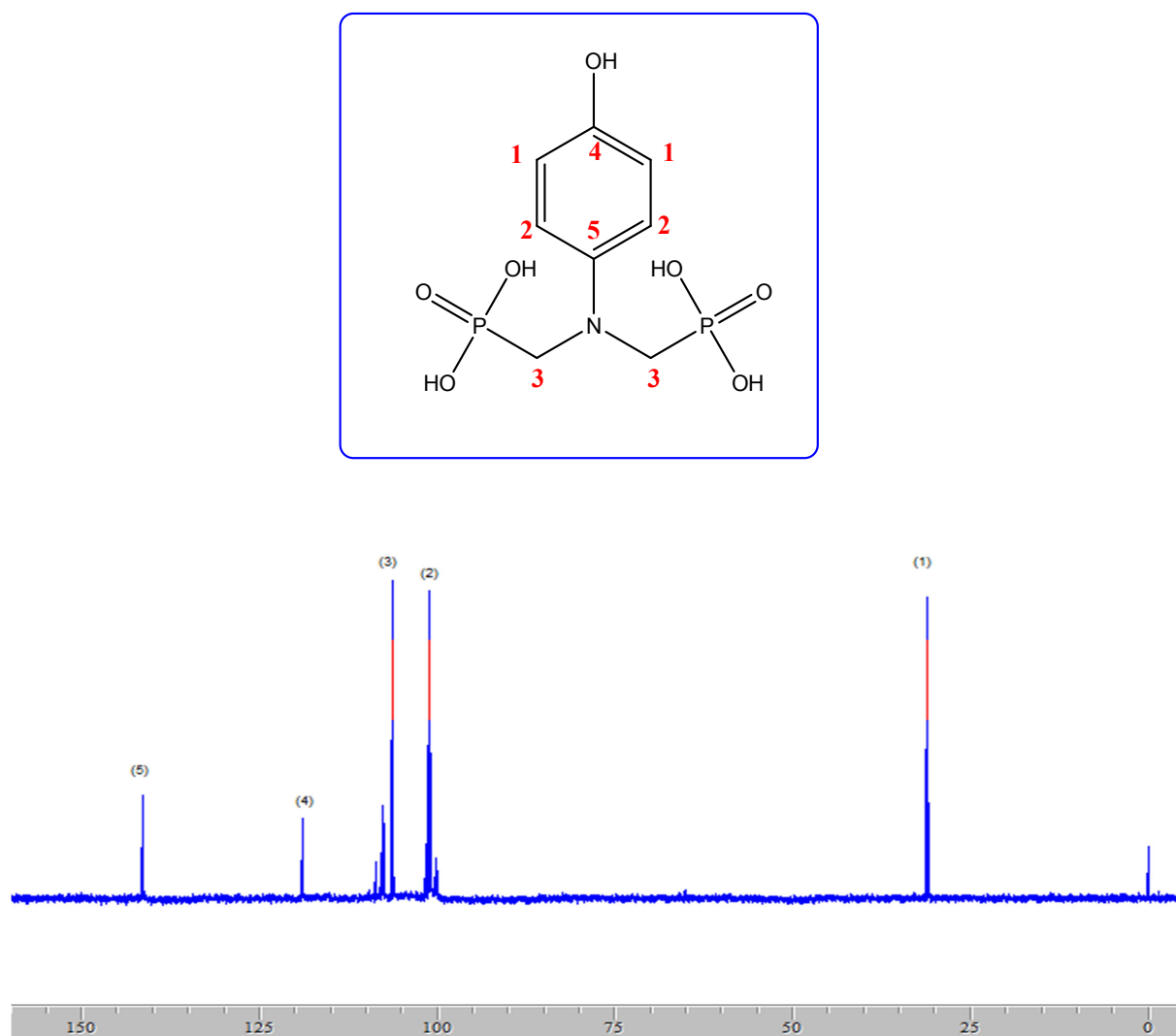


Fig.III.8: Spectre RMN ^{13}C du produit pAPac.

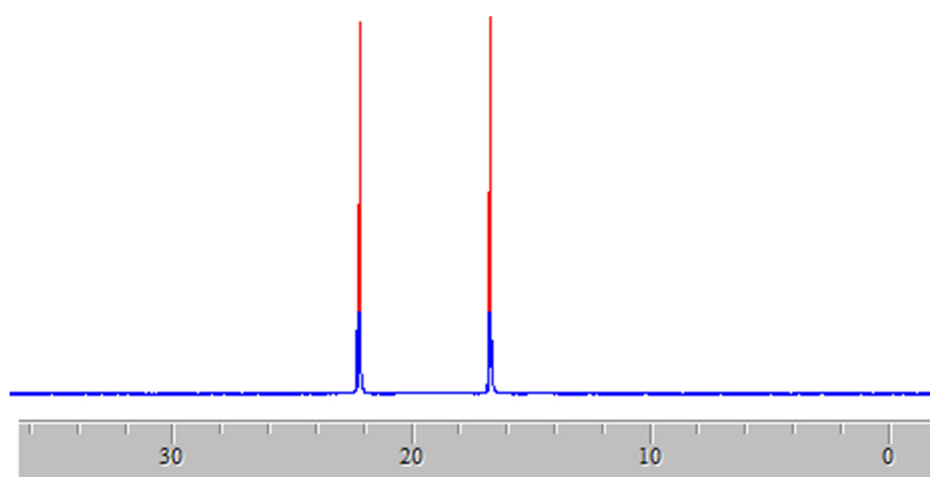


Fig.III.9: Spectre RMN ^{31}P du produit pAPac.

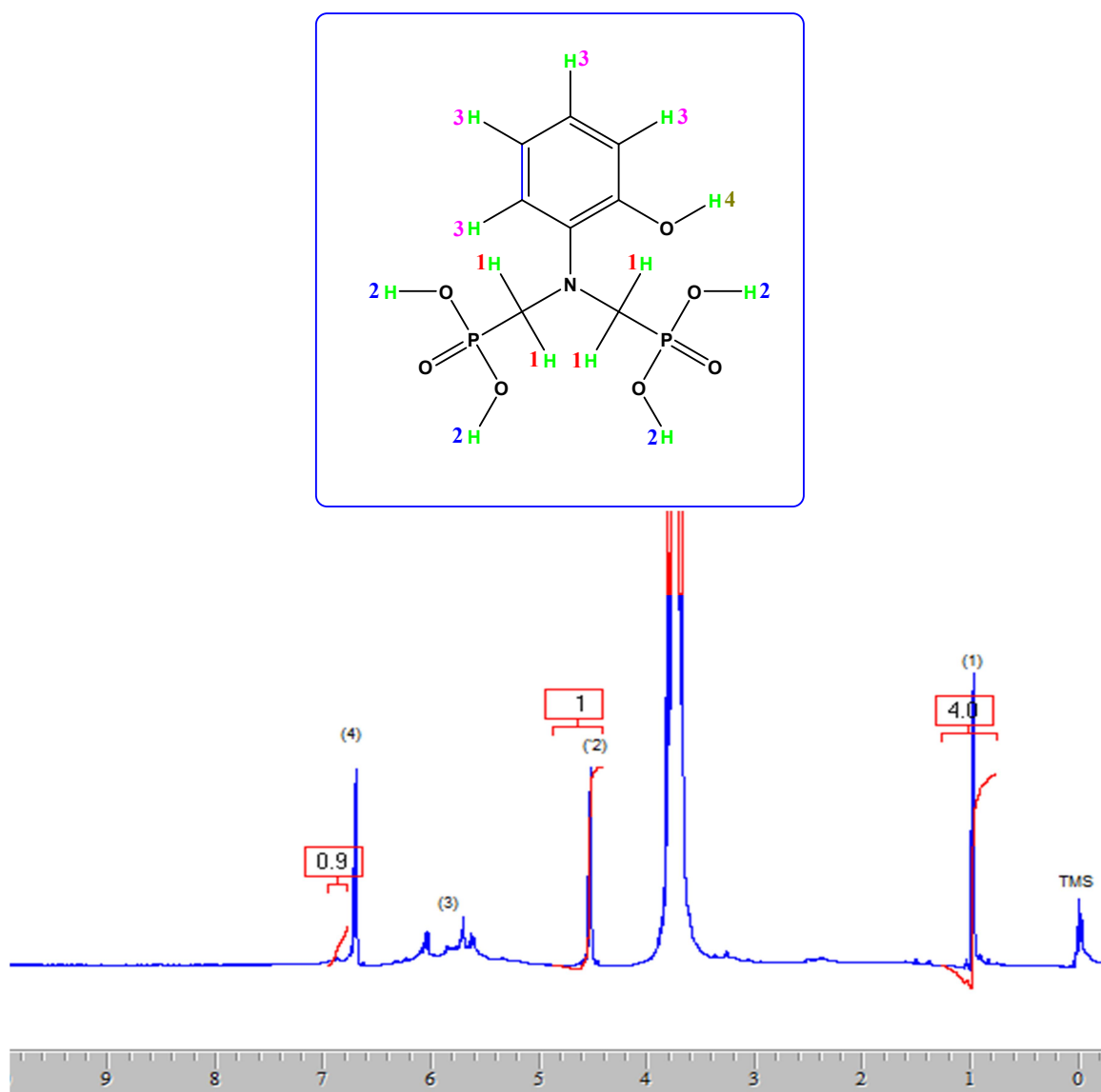


Fig.III.10: Spectre RMN ^1H du produit oAPac.

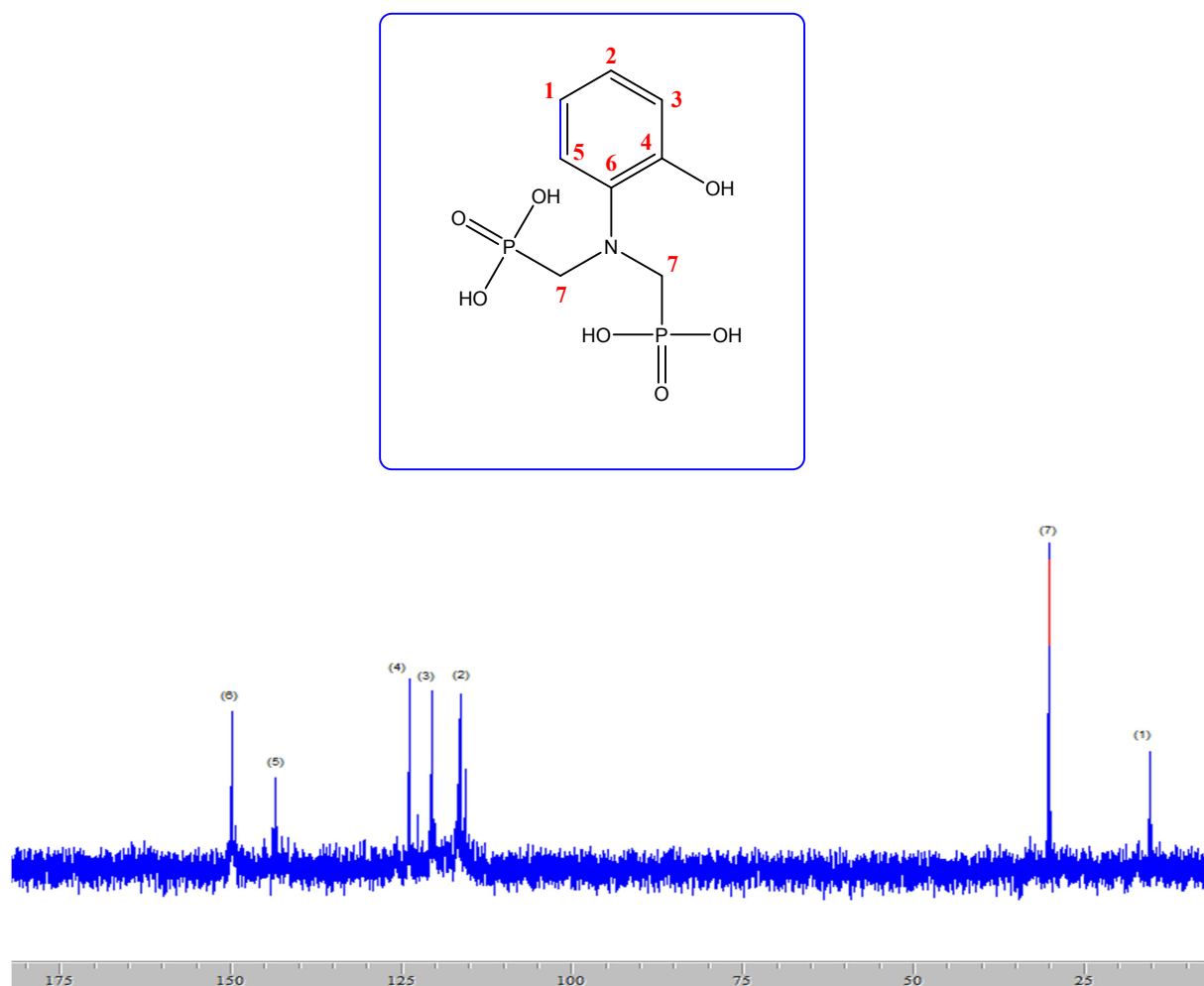


Fig.III.11: Spectre RMN ^{13}C du produit oAPac.

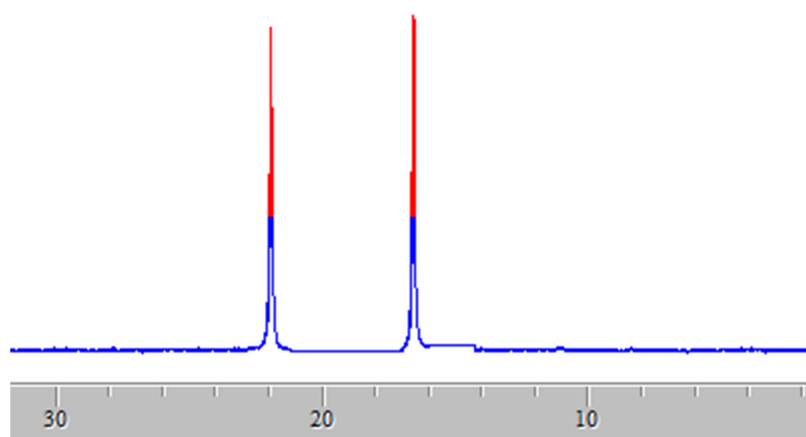


Fig.III.12: Spectre RMN ^{31}P du produit oAPac.

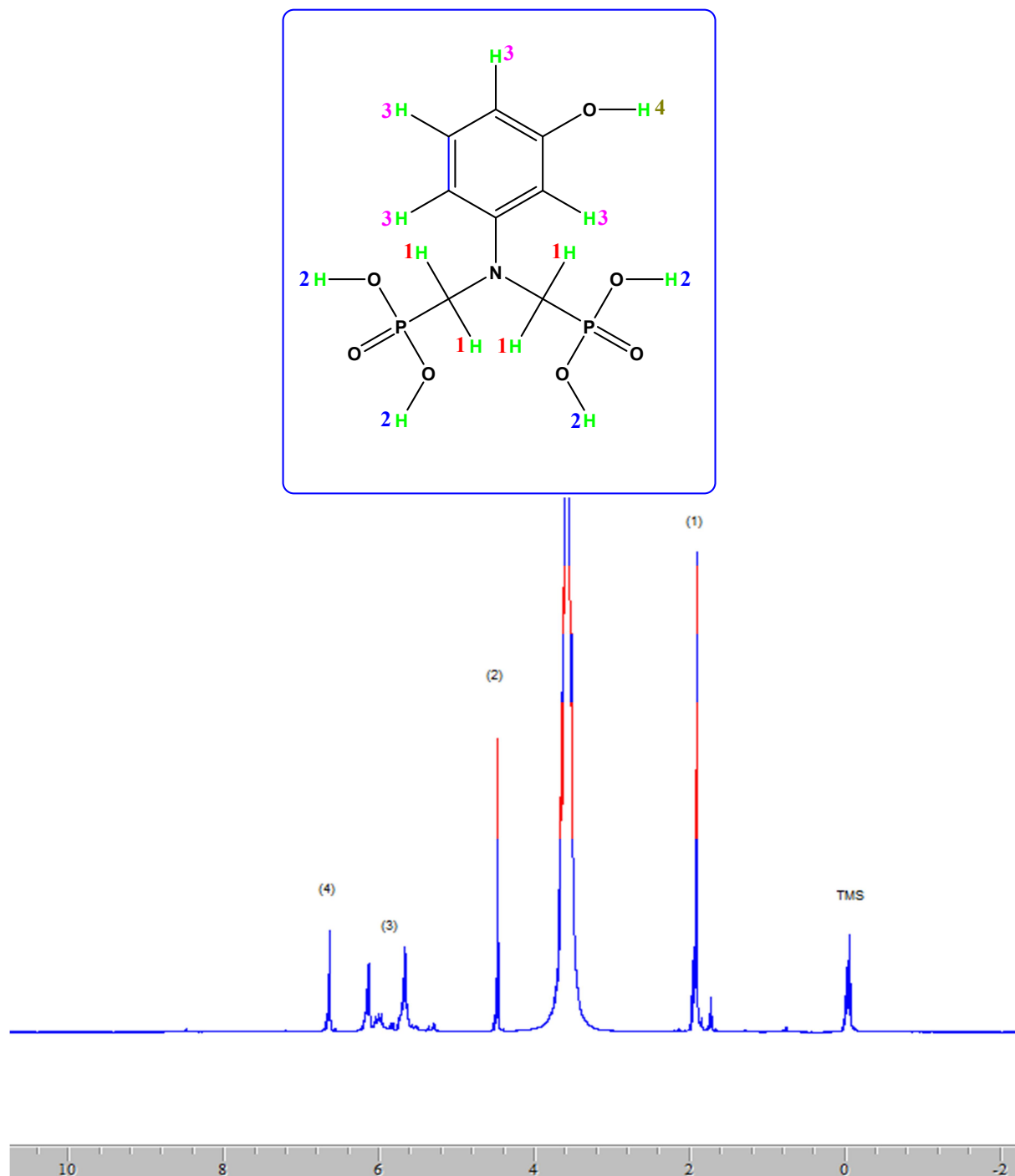


Fig.III.13: Spectre RMN ^1H du produit mAPac.

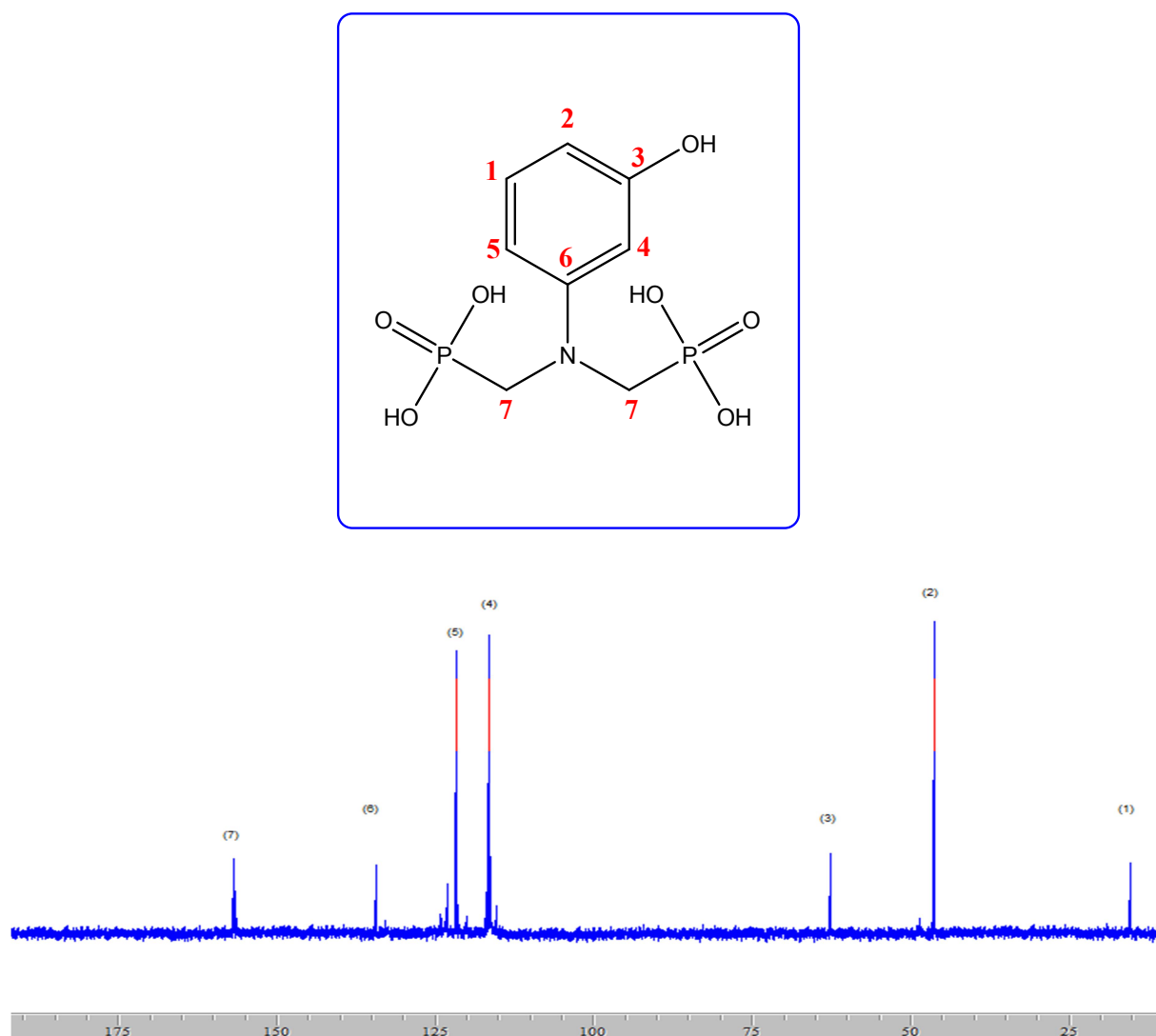


Fig.III.14: Spectre RMN ^{13}C du produit mAPac.

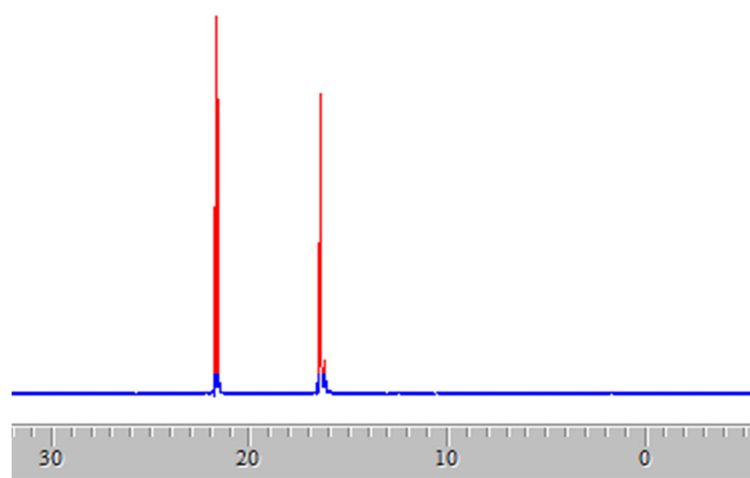


Fig.III.15: Spectre RMN ^{31}P du produit mAPac.

III.3.3. Analyse élémentaire

Les pourcentages de carbone, hydrogène et l'azote sont déterminés l'analyse élémentaire. Les éléments dosés sont C, H, et N. Les résultats sont fournis avec une précision absolue de $\pm 0,3\%$ et sont validés pour deux essais minimum. La masse minimale des échantillons est de 10 mg pour réaliser deux mesures cohérentes. Cette analyse a été effectuée au niveau du Laboratoire de Mesures Physiques de l'université Montpellier 2. Comme il peut être constaté sur le tableau ci-dessous, les résultats expérimentaux confirment l'analyse théorique. Les résultats de l'analyse élémentaire des différents acides ont conduit à la formule chimique suivante : $C_8H_{13}NO_7P_2$.

Tableau III.7 : Résultats de l'analyse élémentaire.

Analyse Elémentaire				
Composés	formulaire	%C	%H	%N
pAPac	$C_8H_{13}NO_7P_2$	Théo. 32.31	Théo. 4.39	Théo. 4.72
		Ex. 32.34 ± 0.1	Ex. 4.41 ± 0.1	Ex. 4.67 ± 0.3
mAPac	$C_8H_{13}NO_7P_2$	Théo. 32.31	Théo. 4.39	Théo. 4.72
		Ex. 32.30 ± 0.3	Ex. 4.43 ± 0.1	Ex. 4.68 ± 0.0
oAPac	$C_8H_{13}NO_7P_2$	Théo. 32.31	Théo. 4.39	Théo. 4.72
		Ex. 32.29 ± 0.2	Ex. 4.38 ± 0.2	Ex. 4.74 ± 0.2

III.6. Mécanisme réactionnel

Pour les réactions de type Mannich, deux mécanismes généraux ont été proposés qui se distinguent par l'ordre dans lequel se font les deux étapes.

- **Voie 1:** Un imine est formé à partir du composé carbonyle et l'amine (primaire), et puis l'acide phosphoreux est ajouté à la liaison C-N de l'intermédiaire.
- L'autre chemin (**voie 2**) assume la formation d'une α -hydroxyphosphonique par l'addition de l'acide phosphoreux au groupe carbonyle de la composante oxo, alors le hydroxyphosphonique subit une substitution par l'amine pour fournir un acide α -aminophosphonique.

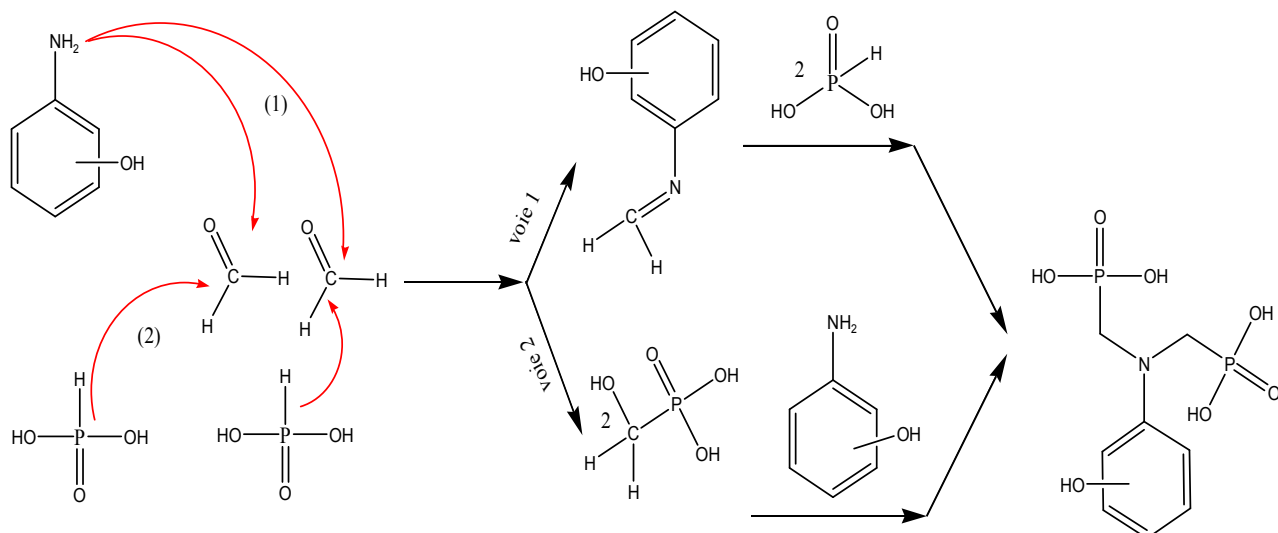


Schéma III.2: Voies principales de la réaction de «Irani-Moedritzer ».

Pour prédire le chemin de nos réactions, on a utilisé l'outil informatique, la modélisation moléculaire grâce au logiciel Gaussian 09 qui permet la détermination des indices réactivité chimiques de chaque réactif (la dureté et la douceur) via les énergies HOMO-LUMO (voir le tableau ci-dessous).

Tableau III.8: Paramètres de prédiction du mécanisme réactionnel.

Réactifs	E_{LUMO}	E_{HOMO}	$\Delta E(\text{u.a}) = E_{(\text{LUMO})} - E_{(\text{HOMO})}$	La dureté $\eta = 1/2 (E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}})$	R%
Acide phosphoreux	-0.00582	-0.28214	0.27632	0.13816	
p-aminophenol	-0,0048	-0,23576	0,23096	0,11548	88
o-aminophenol	-0,00072	-0,22638	0,22566	0,11283	73
m-aminophenol	-0,00375	-0,22785	0,22410	0,11205	78
Formaldéhyde	-0,05551	-0,26771	0.21223	0.1061	
Imine/para	-0.10012	-0.18062	0.08056	0.04025	
Imine/ortho	-0.09489	-0.17725	0.08236	0.04118	
Imine/meta	-0.10094	-0.18332	0.08238	0.04119	
Ac. hydroxyphosphonique	0.00598	-0.26721	0.27319	0.136595	

Sachant que plus une molécule est dure (**η important**), plus la stabilité est importante et donc elle est moins réactive ; par contre une molécule douce (**η faible**), elle moins stable et plus réactive (voir le chapitre IV).

D'après ce tableau, on remarque que:

- Le formaldéhyde est la molécule la plus douce et plus réactive ; c'est le réactif électrophile. C'est celui qui doit subir une attaque nucléophile.
- **L'acide phosphoreux** est plus dur que les autres réactifs nucléophiles (amines), il est donc plus stable et moins réactif. C'est le réactif nucléophile le plus faible par rapport aux aminophénols.
- **Les aminophénols** sont des réactifs plus nucléophiles que l'acide phosphoreux. Ils vont vont attaquer les sites électrophiles (formaldéhyde) mieux que l'acide phosphoreux.

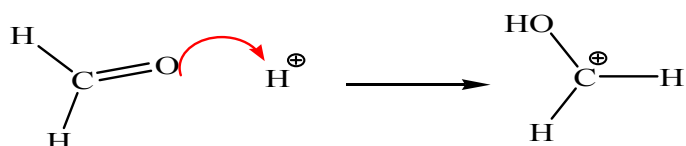
On peut, donc, confirmer que la voie de la réaction Irani-Moedritzer est selon la voie formation d'un imine in situ.

D'après cette étude, il est clair que :

- ✓ La **voie 1** représente le chemin essentiel de notre réaction : Dans la première étape, l'aminophénol (réactif le plus nucléophile) attaque le carbone de la fonction carbonyle de l'aldéhyde (réactif électrophile). Le résultat est un zwitterion, qui réagit par réarrangement d'un atome d'hydrogène (tautomérie dans l'acide phosphoreux) et l'élimination ultérieure d'eau ce qui conduit à la formation d'une hydroxylamine. Dans l'étape suivante, l'acide phosphoreux est ajouté à l'hydroxylamine. Ce qui conduit en fin de compte la forme de l'acide α -aminophosphonique.

Le mécanisme de formation des acides α -aminophosphoniques détaillé se décompose en succession d'étapes suivantes:

1. Protonation, en milieu acide, du formaldéhyde
2. Attaque nucléophile par les doublets libre de l'azote de la fonction amine et la formation d'un imine.
3. Attaque nucléophile par les doublets libre du phosphore de l'acide phosphoreux.



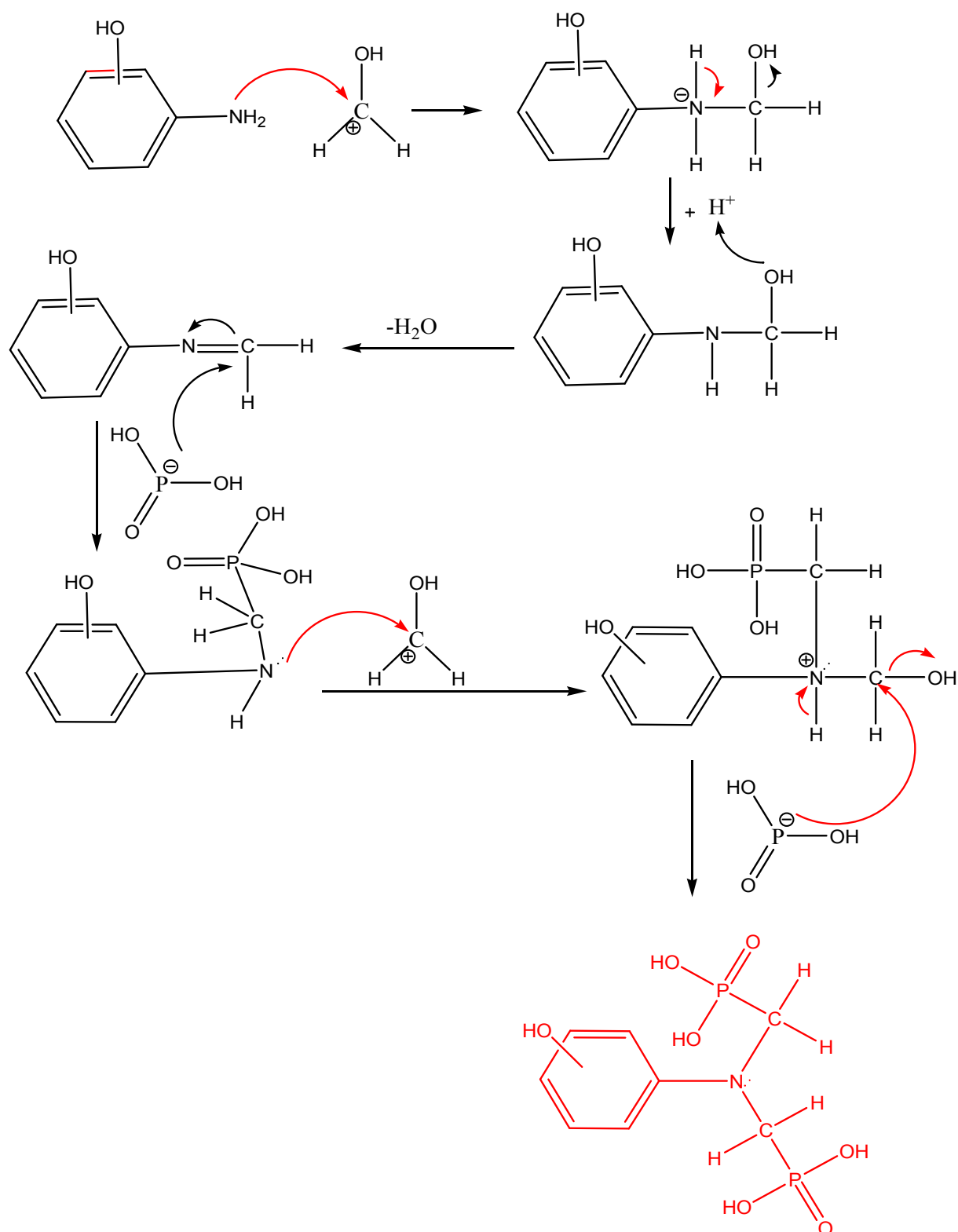


Schéma III.3 : Mécanisme réactionnel proposé pour la formation des acides α -aminophosphoniques.

III.4. Conclusion :

Au cours de la caractérisation physico-chimique des produits synthétisés on a trouvé que :

- Les spectres FT-IR des produits synthétisés et des produits de départ sont nettement différents, en plus, la disparition de deux bandes qui caractérisent la fonction amine primaire et l'apparition des bandes qui caractérisent les groupements, notamment C-N, P=O, P-C, P-O-H,...etc. confirme l'obtention de ces produits.
- On ajoutant aux résultats de la spectroscopie IR ceux de spectrophotométrie, UV-Vis qu'ont montrés des différences nettes entre les longueurs d'ondes des produits de départ et ceux des produits synthétisés.
- Les résultats de l'analyse par la spectroscopie RMN du phosphore peut être exploité pour confirmer l'existence d'un environnement phosphorique, dont l'intégration explique l'existence d'un phosphore symétrique. De la même manière, la spectroscopie RMN du proton peut confirmer la réussite de notre synthèse, par la vérification de l'existence de nouveaux environnement protonique dans la molécule représentés par le groupement méthylène.

On peut conclure sans ambiguë l'obtention des produits cibles dans ce travail.

CHAPITRE IV

IV.A) ETUDE THEORIQUES D'ACIDES α -AMINOPHOSPHONIQUES

PAR LA METHODE DFT

IV.A1 Introduction

De nos connaissances, ni les applications de chimie quantique ni les spectres de vibration des composés étudiés ont été rapportés. Le présent travail vise à comparer les propriétés structurales, vibratoires et énergétiques des acides α -aminophosphoniques (pAPac, mAPac et oAPac).

Les molécules visées par ce travail ont été analysées avec la théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) [1], en utilisant la fonctionnelle hybride B3LYP (corrélation fonctionnelle des trois paramètres hybride de Becke [2] avec Lee-Yang-Parr [3, 4]) avec la base 6-31G (d, p) couramment utilisée dans la littérature. Les paramètres des géométries optimisées, les fréquences vibratoires fondamentaux, l'intensité IR, les charges atomiques et d'autres paramètres thermodynamiques ont été calculées en utilisant le logiciel Gaussian 09 [5]. Les géométries optimisées ont été visualisées à l'aide du programme GaussView [6]. Les potentiels DFT surestiment symétriquement (2,5%) les nombres d'ondes vibratoires. Ces écarts sont corrigés soit par des calculs de corrections anharmoniques explicitement ou par l'introduction d'un facteur d'échelle ou en escaladant directement les nombres d'onde calculées avec un facteur approprié. Nous avons calibré les nombres d'onde de vibration calculée par méthode B3LYP avec un facteur d'échelle de 0,9679 [7]. Les calculs de fréquence analytiques de la géométrie optimisée ont été effectués pour confirmer les structures optimisées pour être à un minimum d'énergie et d'obtenir les spectres de vibration théorique. Les types et les modes de vibration ont également été analysés en utilisant le programme VEDA 4 [8].

IV.A2 Optimisation des structures

Les paramètres des géométries optimisées (longueurs des liaisons et angles) et les fréquences vibratoires fondamentaux ont été calculés, en utilisant la méthode DFT au niveau B3LYP avec la base 6-31G (d, p). L'optimisation de la géométrie pour les trois

isomères a été réalisée par la minimisation de l'énergie (Les structures les plus stables). Les structures moléculaires optimisées des trois molécules sont présentés dans la Fig.IV.A1.

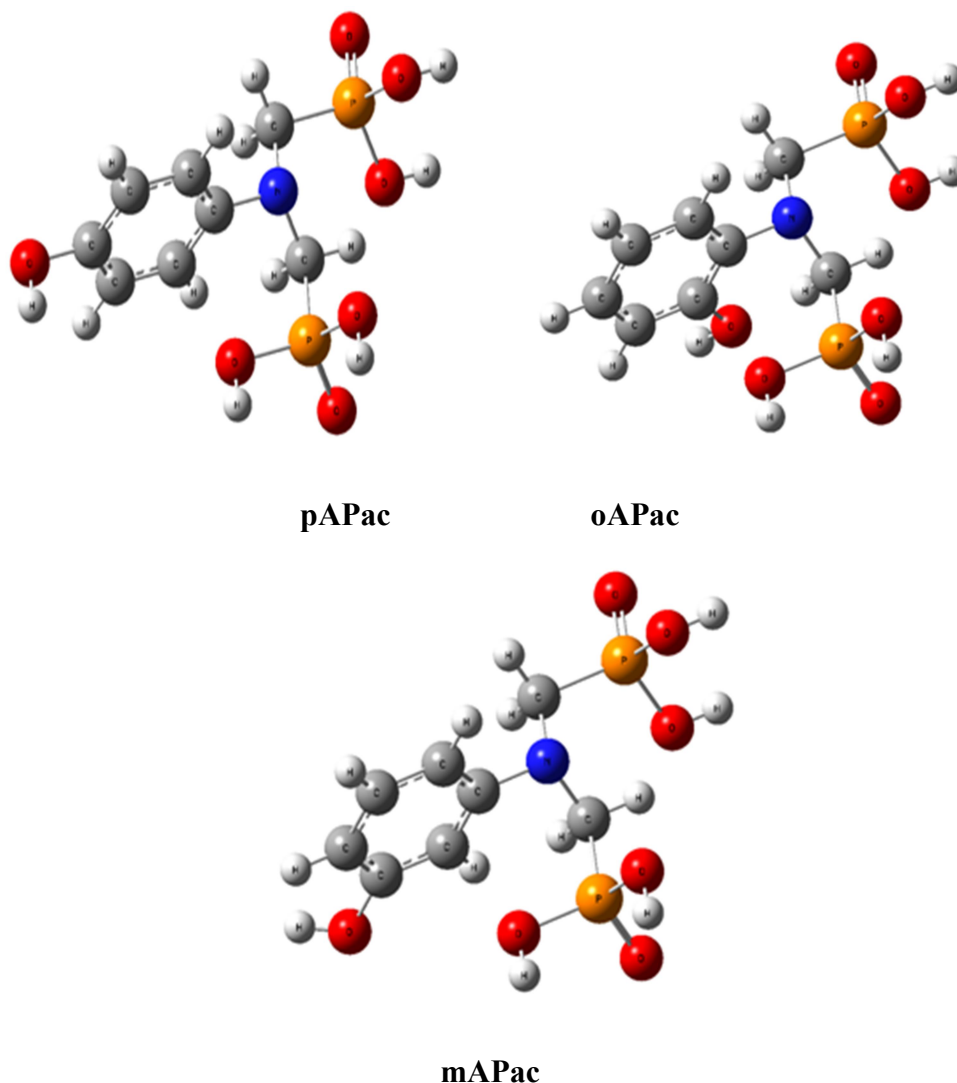


Fig.IV.A1: Structures optimisées de oAPac, pAPac et mAPac.

L'optimisation des structures de pAPac, mAPac et oAPac nous a permis, d'une part, de voir et comparer l'effet de la substitution du groupe hydroxyle (OH) aux positions *ortho*, *para* et *méta* sur les propriétés structurales et d'autre part, on a déterminé les 87 modes fondamentaux de vibrations de chaque composé qui sont calculés selon la règle ($3N - 6_{\text{vib}} = 87$). Toutes les vibrations sont actives dans IR. Toutes les fréquences sont assignées en termes de fondamentales, harmoniques et des bandes de combinaison. Les paramètres géométriques optimisés (longueur de liaison et angles de liaison) par DFT / B3LYP/6-31G (d, p) ainsi que les modes de vibrations fondamentaux sont présentés dans les Tableaux IV.A1, IV.A2 et IV.A3 (distances en Å et angles en degrés).

Tableau IV.A1. Données de la structure géométrique optimisée de **oAPac** par B3LYP/6-31G (d, p).

liaison	longueur	vib.	liaison	angle	Vib.	liaison	Angle dihedral	Vib.
C3-H 29	1.068007	STRE	H24-O23-P19	89.5 8	BEND	H29-C3-H8-C4	-180.00	TORS
C3-C4	0.792628	STRE	H22-O21-P19	112.31	BEND	O23-P19-O30-C 6	0.00	TORS
P19-O23	0.507867	STRE	H7-C2-C3	69.18	BEND	H22-O21-P19-O30	-180.00	TORS
O21-H22	0.898837	STRE	H8-C4-C3	69.18	BEND	H12-C11-N10 -O30	0.00	TORS
C11-H12	0.317788	STRE	H9-C5-C4	142.80	BEND	O21-P19-H24-O23	-180.00	TORS
C14-H16	0.317788	STRE	H13-C11-N10	131.77	BEND	C5-C6-H31-O30	-180.00	TORS
C1-C6	0.792629	STRE	H16-C14-N10	42.20	BEND	H13-C11-N10-O30	0.00	TORS
P19-O21	1.706815	STRE	H12-C 11-N10	89.58	BEND	O25-P17-C11-N10	0.00	TORS
C5-C6	0.904748	STRE	H12-C11-H13	42.20	BEND	C14-P19-H24-O23	0.00	TORS
C1-O30	0.923213	STRE	H15-C14-H16	158.11	BEND	C11-N10-H16 -C14	0.00	TORS
O30-H31	0.493328	STRE	C3-C4-C5	142.80	BEND	H26-O25-O27-P17	-180.00	TORS
C5-H9	0.605189	STRE	C5-C6-C1	69.18	BEND	P19-O30-H31-C6	-180.00	TORS
C11-H13	0.898765	STRE	C4-C5-C6	148.02	BEND	H24-O23-P19-O30	-180.00	TORS
C2-H 7	0.60519	STRE	C2-C3-C4	69.18	BEND	H28-O27-O25-P17	-180.00	TORS
C4-H 8	0.690795	STRE	C27-P17-O11	115.92	BEND	H15-C14-H16-N10	0.00	TORS
C2-C3	0.904748	STRE	C25-P17-O11	158.11	BEND	O27-O25-P17-C 11	0.00	TORS
P17-O 25	0.507867	STRE	O30-H31-C1	150.81	BEND	O18-P17-H-26O25	-180.00	TORS
N10-C14	1.234752	STRE	N10-C14-P19	131.77	BEND	P17-C11-N10-O30	-180.00	TORS
P19-C14	1.704045	STRE	C14-P19-O20	131.77	BEND	C14-P19-O30-H16	0.00	OUT
N10-C11	1.376344	STRE	H26-O25-P17	158.11	BEND	C2-C5-C1-H7	0.00	OUT
O25-H 26	0.958212	STRE	O18-P17-O27	131.77	BEND	C5-C6-O30-H9	0.00	OUT
P17-C14	1.704045	STRE	O21-P19-O20	115.92	BEND	C4-C5-C1-H8	0.00	OUT
O23-H 24	0.898837	STRE	C11-N10-C14	131.77	BEND	C3-C1-C2-C4	0.00	OUT
O27-H 28	0.958211	STRE	C6-N10-C14	115.92	BEND	C2-C1-C5-C4	0.00	OUT
C2-C1	1.398789	STRE	H13-C11-P17	115.92	BEND	C4-O30-C1-C5	0.00	OUT
C14-H15	1.068007	STRE	C1-O30-H31	14.08	BEND	N10-O30-O23-C14	0.00	OUT
C4-C5	1.398789	STRE	P17-C11- N10	112.31	BEND	O20-P19-O23-H24	0.00	OUT
C6-N10	1.467262	STRE				O30-C6-C1-H31	0.00	OUT
P17-O18	1.408926	STRE						
P19-O20	1.263983	STRE						
P17-O27	1.436344	STRE						

Tableau IV.A2. Données de la structure géométrique optimisée de **mAPac** par B3LYP/6-31G(d, p).

liaison	longueur	vib.	liaison	angle	Vib.	liaison	Angle dihedral	Vib.
C11-H13	0.972915	STRE	H28-O27-P17	117.78	BEND	H13-C11-N10-C6	0.00	TORS
P19-O23	0.244282	STRE	H26-O25-P17	170.53	BEND	H12-C11-N10-C6	0.00	TORS
C11-H12	0.152855	STRE	H22-O21-P19	116.66	BEND	H16-C14-N10- C6	0.00	TORS
C14-H16	0.152855	STRE	H7-C1-C6	83.5	BEND	O25-P17-C11-N10	0.00	TORS
P17-O25	0.244282	STRE	C2-C1-H7	147.10	BEND	H22-O21-P19 -C 14	-180.00	TORS
C14- P19	1.686215	STRE	H9-C5-C4	129.4	BEND	C-N-C-P19	0.00	TORS
C5-H9	0.573501	STRE	H8-C2-C1	129.4	BEND	H31-O30-C4-C5	-180.00	TORS
O21-H22	0.889433	STRE	H13-C11-N10	125.56	BEND	O21-P19-H16-C14	-180.00	TORS
N10-C11	1.361943	STRE	H12-C11-N10	72.81	BEND	H7-C1-C6-N10	0.00	TORS
N10-C14	1.336621	STRE	H15-C14-N10	117.78	BEND	H26-O25-17P-C11	-180.00	TORS
N10-C6	1.441129	STRE	H16-C14-N10	52.76	BEND	C5-C6-H7-C1	0.00	TORS
C3-C4	0.751126	STRE	H12-C11-H13	52.76	BEND	H28-O27-O25-P17	-180.00	TORS
C2-H8	0.573502	STRE	H15-C14-H16	170.53	BEND	H29-C3-H8-C2	-180.00	TORS
O30-H31	0.833427	STRE	C2-C1-C6	129.4	BEND	H15-C14-H16-P19	-180.00	TORS
O30-C4	1.090341	STRE	C3-C4-C5	129.4	BEND	O18-O25-H26-P17	0.00	TORS
P19-O21	1.676416	STRE	C2-C3-C4	83.50	BEND	O27-O25-H26-P17	-180.00	TORS
C1-H7	0.815851	STRE	C4-C5-C6	147.1	BEND	C1-C6-N10-C14	0.00	TORS
P19-O20	1.368264	STRE	C3-C2-C1	147.10	BEND	C14-O23-H24-P19	0.00	TORS
O25-H26	0.941147	STRE	O18-P17-C11	116.66	BEND	C2-C1-H7-C6	-180.00	TORS
C5-C6	1.068536	STRE	O27-P17-C11	117.78	BEND	P17-C11-N10-C6	-180.00	TORS
O27-H28	0.941146	STRE	O25-P17-C11	170.53	BEND	O30-C5-C3-C4	0.00	OUT
C3-H29	1.048986	STRE	N10-C14-P19	125.56	BEND	C11-C6-C14-N10	0.00	OUT
C14-H15	1.048986	STRE	C6-N10-C11	116.66	BEND	C5-C2-C6-H9	0.00	OUT
P17-O27	1.554846	STRE	C6-N10-C14	117.78	BEND	C2-C3-C5-H8	0.00	OUT
O23-H24	0.889433	STRE	H13-C11-P17	117.78	BEND	C3-C5-C2-C4	0.00	OUT
P17-O18	1.394185	STRE	H31-O30-C4	171.37	BEND	C4-C5-C1-C2	0.00	OUT
C1-C6	0.751125	STRE	P17-C11-N10	116.66	BEND	N10-P19-O23-C14	0.00	OUT
P19-O23	0.244282	STRE	O30-C4-C3	83.5	BEND	O20-P19-O23-H24	0.00	OUT
C2-C1	1.373877	STRE	C5-C6-N10	147.1	BEND			
P17-C11	1.784255	STRE	C1-C6-N10	129.4	BEND			
C4-C5	1.373878	STRE						

Tableau IV.A3. Données de la structure géométrique Optimisée de **pAPac** par B3LYP/6-31G(d, p).

liaison	longueur	vib	liaison	Angle	vib	liaison	Angle dihedral	vib
P 22-O26	0.492083	STRE	H29-O28-P20	153.80	BEND	P22-O26-H27-O23	-180.00	TORS
C1-C6	0.763333	STRE	H25-O24-P22	112.45	BEND	H12-O11-C3-C 4	-180.00	TORS
O11-H12	0.906383	STRE	H31-O30-P20	116.89	BEND	C5-C6-N13-C 17	-180.00	TORS
C5-C6	0.911886	STRE	H10-C5-C6	67.29	BEND	H15-C14-N13-C 6	0.00	TORS
C14-H15	0.307912	STRE	H7-C1-C6	67.29	BEND	H19-C17-N13-C 6	0.00	TORS
C17-H19	0.307913	STRE	H9-C4-C5	149.73	BEND	C17-P22-H27-O 26	0.00	TORS
P22-C17	1.718352	STRE	H7-C1-C2	149.73	BEND	O24-P22-H27-O 26	-180.00	TORS
P22-O24	1.704615	STRE	H8-C2-C1	142.98	BEND	C6-N13-C17-P 22	0.00	TORS
N13-C6	1.465371	STRE	H15-C14-N13	93.75	BEND	H25-O24-P22-C 17	-180.00	TORS
O24-H 25	0.906384	STRE	H19-C17-N13	36.91	BEND	H16-C14-N13-C 6	0.00	TORS
C5-H 10	0.582822	STRE	H16-C14-N13	130.66	BEND	O28-P20-C14-N 13	0.00	TORS
C14-H 16	0.894411	STRE	H18-C17-N13	116.89	BEND	C14-N13-H19-C 17	0.00	TORS
C2-H8	0.58282	STRE	H16-C14-H15	36.91	BEND	H29-O28-P20-C 14	-180.00	TORS
C4-H9	0.696247	STRE	H18-C17-H19	153.8	BEND	H31-O30-O28-P 20	-180.00	TORS
N13-C 17	1.228771	STRE	C1-C6-C5	67.29	BEND	H18-C17-H19-N 13	0.00	TORS
P20-O 28	0.492083	STRE	C3-C2-C1	149.73	BEND	O30-O28-H29-P 20	-180.00	TORS
P22-O23	1.25786	STRE	C2-C1-C6	142.97	BEND	O11-C3-H9-C 4	-180.00	TORS
C1-H 7	0.696245	STRE	C2-C3-C4	67.29	BEND	O21-20P-H29-O 28	-180.00	TORS
N13-C14	1.387899	STRE	C4-C5-C6	149.73	BEND	P20-C14-N13-C 6	-180.00	TORS
C3-C4	0.763332	STRE	O28-P20-C14	153.80	BEND	C5-C6-C4-H 10	0.00	OUT
O28-H29	0.956977	STRE	C17-P22-O23	130.66	BEND	C2-C4-C3-H8	0.00	OUT
O26-H 27	0.906384	STRE	H12-O11-C3	112.45	BEND	C4-C5-C3-H9	0.00	OUT
C3-C2	0.911886	STRE	N13-C17-P22	130.66	BEND	C3-C5-C2-C4	0.00	OUT
O30-H 31	0.956977	STRE	P22-O26-H27	93.75	BEND	C1-C5-C4-H7	0.00	OUT
C17-H 18	1.06663	STRE	C14-N13-C17	130.66	BEND	C4-C5-C1-C 2	0.00	OUT
C4-C5	1.396987	STRE	O24-P22-O23	116.89	BEND	C2-C5-C6-C1	0.00	OUT
C2-C 1	1.396986	STRE	O21-P20-O30	130.66	BEND	C1-C5-N13-C6	0.00	OUT
O11-C 3	1.425496	STRE	O23-P22-O26	36.91	BEND	N13-P22-O26-C17	0.00	OUT
P20-O 21	1.420756	STRE	C5-C6-N13	149.73	BEND			
P20-C 14	1.814269	STRE	C1-C6-N13	142.97				
P20-O30	1.429387	STRE	O30-P20-C14	116.89				

Après optimisation de la géométrie moléculaire, nous avons fait une étude comparative des quelques longueurs des liaisons et quelques angles.

Il est à noter que :

- La liaison (C3-C4) = (C1-C6), (C5-C6) = (C2-C3) et (C2-C1) = (C4-C5) pour les trois isomères.
- Le (oAPac) a des variations négligeables par rapport à celles de (pAPac).
- Le (mAPac) présente des longueurs de liaison inférieure par rapport au (oAPac) et (pAPac).
 - Donc, Il n'y a pas beaucoup de variations dans toutes les longueurs des liaisons C-C des cycles aromatiques dans les trois positions.
- Les longueurs des liaisons C-H pour (mAPac) sont estimées à 0.152Å - 0.9729Å. Les longueurs des liaisons C-H de (oAPac) sont estimées à 1.068Å-0.317Å. Les mêmes longueurs de liaison dans (pAPac) sont observées (1.066Å-0.307Å).
- Les longueurs de liaison N10-C6, C6-N10, N13-C6 pour les isomères (oAPac, mAPac et pAPac) sont jugées 1.46Å, 1.44Å et 1.46Å, respectivement. La longueur de la liaison N-C pour toutes les trois substitutions a plus ou moins la même valeur.
- La longueur de la liaison phénolique O-H présente plus ou moins la même valeur pour tous les isomères avec (pAPac) ayant relativement plus élevé.
- A partir des valeurs des angles H-O-C, on observe que lorsque le groupe amine est substitué en position méta elle se plie davantage vers la position substituée (H31-O30-C4 = 171,37°) et cette flexion est moins prononcée lorsque la substitution est dans la para (H12-O11-C3 = 112.45 °) et en positions ortho (C1-O30-H31=14,08°).
- L'angle H-C-N se plie vers le groupe OH en position ortho (H16-C14-N10=42,20 °) que dans le méta (H16-C14-N10=52,76 °) et para (H16-C14-N13=130,66°) en raison de la proximité du groupe OH (de liaison hydrogène).
- L'angle (H24-O23-P19=89,58°) en position ortho à proximité de OH penche beaucoup moins que dans le méta (H22-O21-P19=116.66°) et para (H31-O30-P20=116.89°), probablement en raison de la liaison hydrogène.

IV.A3 Analyse vibratoire

Les fréquences de vibration sont calculées avec cette méthode, puis mise à l'échelle par le facteur 0,9679. Les spectres infrarouges théoriques et expérimentaux de pAPac, mAPac et oAPac sont présentés dans la Fig.IV.A2. Les fréquences observées et calculées à

l'aide de DFT/B3LYP avec la base 6-31G (d, p) avec leurs attributions probables de pAPac, mAPac et oAPac sont résumées dans le [Tableau IV.A4](#). Quelques écarts ont été observés entre les données des fréquences de vibration expérimentales et calculées et leurs attributions ont également été discutées. L'objectif de l'analyse vibratoire est de trouver des modes de vibration liés à des structures moléculaires spécifiques de composés calculés. Le [Tableau IV.A4](#) représente les fréquences vibratoires calculées et expérimentales et leurs affectations de pAPac, mAPac et oAPac.

Les composés étudiés ont 31 atomes et donnent ($3N-6_{\text{vib}}$) soit 87 niveaux de vibration dans la gamme $600-4000\text{ cm}^{-1}$. Les attributions de ces 87 niveaux vibratoires ont été proposées et montrées une certaine corrélation des spectres de structure. Sur ces 87 modes de vibration on a 30 modes de stretching, 29 modes de bending et 28 modes de torsion. Ces modes sont proposés comme un outil à appliquer dans la caractérisation structurale des acides α -aminophosphoniques. D'une manière générale, nous devons souligner que le vaste chevauchement des bandes d'absorption complique grandement la tâche des spectres IR. Par conséquent, nous présentons ici la tentative de fournir une description plus détaillée des principales bandes de vibration en utilisant l'analyse vibratoire DFT avec les données expérimentales.

Bon accord entre les fréquences expérimentales et calculées est accompli pour les composés mAPac, oAPac et pAPac ([Tableau IV.A4](#) et [Fig.IVA.2](#)), dans la région $1650-400\text{ cm}^{-1}$. L'analyse des modes de vibration calculés autorise l'affectation provisoire et la description des bandes observées dans les spectres IR. En raison de la complexité des structures étudiées, toutes les fréquences rapportées correspondent à des mouvements vibratoires complexes de plusieurs parties de la molécule. Les basses fréquences (inférieures à 700 cm^{-1}) ne sont pas incluses dans ces tableaux en raison de leurs compositions de mode très complexes.

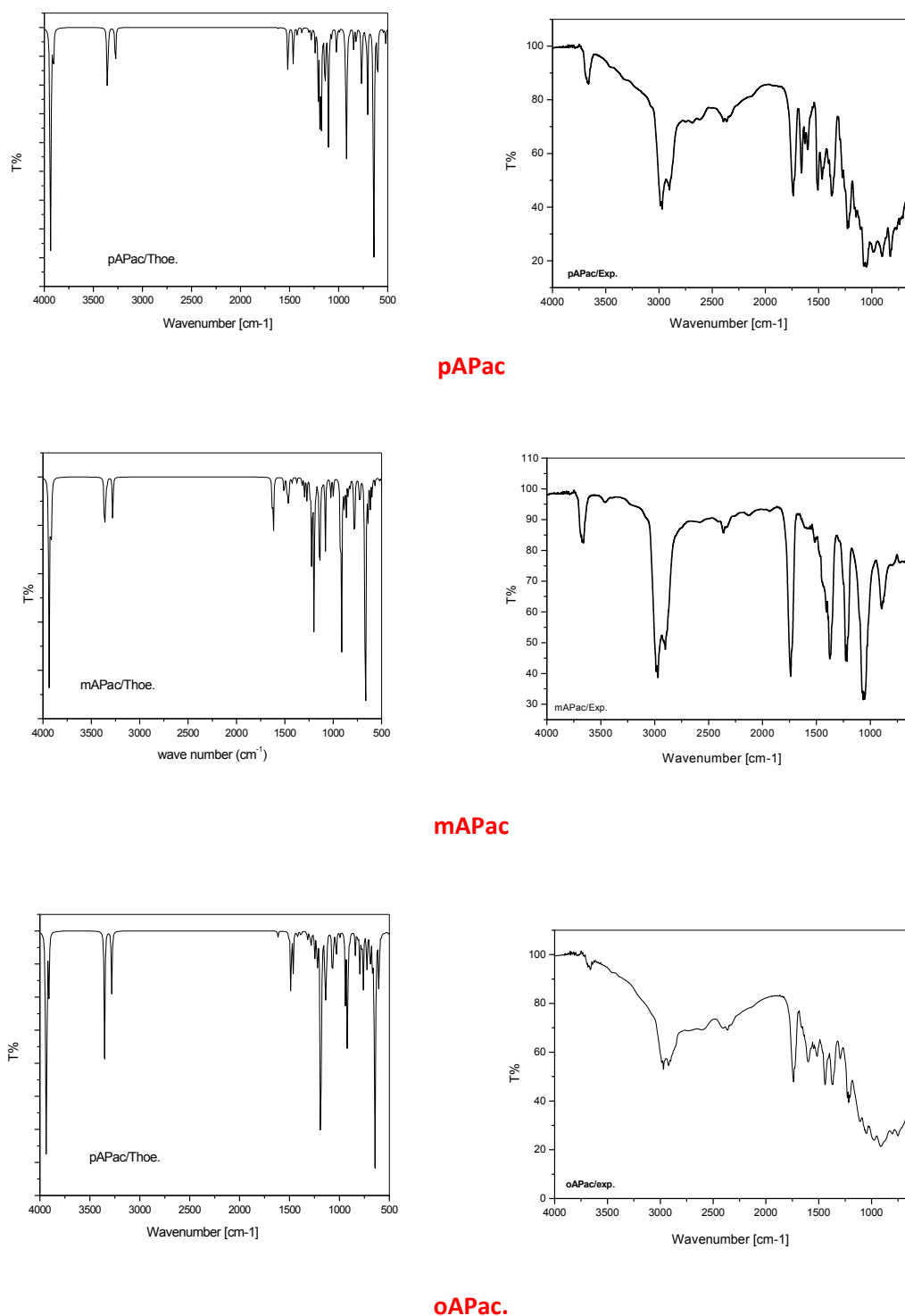


Fig.IV.A2. Spectres FT-IR Théorétiques et expérimentaux de pAPac, mAPac et oAPac.

- **C-H vibrations**

Les vibrations d'élongation de C-H aromatiques apparues généralement entre 3100 et 2800 cm^{-1} [9]. En conséquence, dans nos composés, des vibrations stretching asymétriques et symétriques ont été observées à 2980 cm^{-1} et 2901 cm^{-1} dans les spectres

FT-IR. Les vibrations bending dans le plan et hors du plan du groupe C-H aromatique ont également été identifiées pour les composés étudiés et elles sont présentées dans le [Tableau IV.A4](#).

- **C-C vibrations**

Les bandes entre $1650\text{-}1400\text{cm}^{-1}$ dans les dérivés du benzène ont été affectées au stretching de C-C [10]. En conséquence, dans la présente étude, les vibrations carbone-carbone des composés étudiés ont été observées à 1584 et 1714cm^{-1} . Dans le noyau aromatique le stretching C-C et C=C se produisent dans les régions $1380\text{-}1280\text{cm}^{-1}$ et $1625\text{-}1430\text{cm}^{-1}$, respectivement [10]. Les vibrations d'élongation de C-C des mAPac, oAPac et pAPac sont observées à 1301 et 1155cm^{-1} dans les spectres FT-IR. Conformément aux données calculées ci-dessous dans notre étude actuelle, les bandes C=C pour les vibrations stretching sont observées à 1622 , 1501 et 1488cm^{-1} dans le spectre FT-IR. Les comparaisons des valeurs expérimentales sont jugées en bon accord avec les valeurs théoriques obtenues par la méthode B3LYP / 6-31G (d, p).

- **Vibrations P=O, P-C, P-OH**

Les composés contenant du $\text{R-PO}_3\text{H}_2$, peuvent être caractérisés en fonction de leur stretching des liaisons P=O, P-O-H, P-O et P-C. Toutefois, dans le cas de composés à longues chaînes alkyles ou des fortes vibrations de déformation annulaires, les bandes de ces liaisons peuvent facilement être masquées. En outre, en présence de liaisons hydrogène fortes que l'on rencontre souvent dans ces composés, $\nu(\text{P}=\text{O})$ et $\nu(\text{P-O})$ peuvent être élargi vers le bas et décalée au-dessous des régions attendus. Les modes associés à ces groupes sont observés dans les spectres IR en tant que moyen d'absorptions fortes, mais il est nécessaire de souligner que leurs fréquences exactes sont souvent incertaines en raison de la complexité des modes de vibration, qui apparaissent dans ces régions. Cependant, avec l'aide de calculs DFT et la comparaison avec les spectres FT-IR, l'assignation des bandes FT-IR observées est possible. Cette procédure permet d'extraire des modes caractéristiques des spectres FT-IR associés aux groupements $\text{-PO}_3\text{H}_2$. Le groupement $\text{-PO}_3\text{H}_2$ donne lieu à plusieurs bandes de vibration. Le mode stretching (P=O) à 1227 cm^{-1} , les modes stretching symétriques et asymétriques de la liaison (P-O) à 1078 et 1004 cm^{-1} , et le mode déformation de la liaison (P-O-H) présentera clairement présent à 956 cm^{-1} . Ainsi, les stretchings de P=O et P-O sont observés à 1257 cm^{-1} et dans la plage de 941 à 760 cm^{-1} , respectivement. D'autre part, $\nu(\text{P-O})$ est observée à 810 cm^{-1} .

- **Vibrations de C-N**

Identifier la fréquence stretching de la liaison C-N est une tâche assez difficile par rapport aux autres vibrations. Silverstein et al. [11] ont assigné l'absorption de C-N dans la région 1382-1266 cm^{-1} . Dans mAPac, oAPac et pAPac, le stretching des bandes C-N se trouvent à présent à 1307 et 1382 cm^{-1} . Le bending C-N dans le plan se trouve d'être à 432 et 431 cm^{-1} lors du calcul par B3LYP / 6-31G (d, p), tandis que la valeur expérimentalement attribuée est de 430 cm^{-1} .

- **Vibrations de O-H et C-O**

La liaison hydrogène modifie les fréquences de la vibration stretching et bending. Les bandes de stretching de la liaison O-H se déplacent vers les basses fréquences habituellement avec une intensité accrue et l'élargissement de bande dans les espèces d'hydrogène liés. La liaison hydrogène se présente dans le système de cycle à cinq ou six membres permettrait de réduire l'étirement OH bande 3200-3550 cm^{-1} . Dans la présente étude, pour mAPac, oAPac et pAPac, la vibration de valence du groupement hydroxyle est observée à 3900 cm^{-1} et 3800 cm^{-1} dans les spectres FT-IR. Les vibrations de bending du groupement OH sont également identifiées et répertoriées dans le [Tableau IV.A4](#). La forte bande observée dans la région 1350-1270 cm^{-1} peut être due aux vibrations de l'étirement C-O pour mAPac, oAPac et pAPac.

La comparaison des valeurs expérimentales calculées sont jugées en bon accord avec les valeurs théoriques obtenues par B3LYP / 6-31G (d, p).

Tableau IV.A4. Comparaison des valeurs expérimentales et théoriques de fréquences (cm^{-1}) et intensités des pics, A^{IR} (km/mol) de **mAPac**, **oAPac** et **pAPac**.

Assignements	mAPac				oAPac				pAPac			
	fréquences Calculées (cm^{-1})			Exp. (cm^{-1})	fréquences Calculées (cm^{-1})			Exp. (cm^{-1})	fréquences Calculées(cm^{-1})			Exp. (cm^{-1})
	Unscaled	Scaled	A^{IR}		Unscaled	Scaled	A^{IR}		Unscaled	Scaled	A^{IR}	
vsO-H _{phos}	3938.38	3811.96	177.2	3681	3941.1	3814.61	162.33	3691	3941.44	3814.91	195.09	3692
vsO-H _{phos}	3936.99	3810.61	105.2	3673	3939	3812.57	282.93	3680	3937.43	3811.03	205.97	3676
vasO-H _{phos}	3932.2	3805.98	33.93	3664	3935.4	3809.04	74.7	3660	3936.39	3810.03	181.02	3660
vasO-H _{phos}	3920.96	3795.1	47.82	3658	3928.4	3802.28	113.72	3645	3927.9	3801.81	84.04	3641
vsO-H _{phenyl}	3910.79	3785.25	64.53	3642	3908.8	3783.36	112.43	3630	3907.56	3782.12	113.82	3629
vsC-H, β (H-C-H),	3364.31	3256.32	59.85	2970	3363	3255	5.2	2981	3363.45	3255.48	7.52	2984
vsC-H, β (H-C-N), ρ (H-C-N-C)	3363.07	3255.12	21.6	2965	3361.7	3253.79	11.58	2970	3361	3253.111	85.81	2963
vas C-H, β (H-C-C), ρ (C-C-H-C), ρ_{out} (C-C-C-H)	3354.96	3247.27	25.78	2898	3353.7	3246.04	20.07	2918	3357.89	3250.101	18.71	2907
vasC-H, ρ (H-C-H-C)	3342.97	3235.66	6.92	2892	3351.5	3243.88	204.48	2898	3353.52	3245.87	57.34	2769
ν C=C, ν P(O)OH, β (C-C-H), ρ (C-C-H-C)	1629.37	1577.07	46.29	1603	1628.1	1575.85	1.43	1597	1618.37	1566.42	0.55	1648
γ C-H, β (H-C-N), ρ (O-P-H-C)	1460.83	1413.94	45.4	1402	1462.4	1415.43	71.65	1433	1461.89	1414.96	92.21	1471
α C-H, β (H-C-N), β (H-C-H)	1426.62	1380.83	9.45	1357	1420.5	1374.87	15.25	1362	1422.47	1376.8	14.82	1392
ω C-H, β (H-C-H), ρ (H-C-H-P)	1375.07	1330.93	7.18	1353	1385.7	1341.25	12.09	1314	1374.15	1330.03	12.15	1374
ν C-O, β (H-C-H), ρ (H-C-N-C), ρ (H-O-C-C)	1321.9	1279.47	10.7	1294	1320.3	1277.88	17.92	1280	1305.42	1263.52	8.9	1272
α C-H, ν C-N, β (H-O-C), β (C-C-N), β (C-C-H), β (C-C-H-C), ρ_{out} (C-C-C-H)	1297.12	1255.48	23.61	1251	1294.7	1253.09	17.7	1286	1296.27	1254.65	2.08	1249
α C-H , β (H-C-N), ρ (H-C-N-C)	1272.15	1231.31	26.18	1227	1280.5	1239.43	23.72	1233	1278.11	1237.08	28.22	1228
γ C-H, ν P=O, γ P-C-H	1222.00	1182.77	123.7	1202	1222.1	1182.82	83.26	1198	1224.71	1185.39	4.29	1197
α C-H, β (H-C-H), ρ (H-C-N-C)	1198.82	1160.34	80.83	-	1191.3	1153.01	236.31	1118	1190.39	1152.17	204.42	1168
ω C-H, β (H10-C1 -C2), β (H-C-H), β (H-O-C)	1140.84	1104.22	138	1101	1145.5	1108.7	59.05	1093	1143.88	1107.16	68.14	1100
γ C-H, δ C-H, β (C-N-C), ρ (H-C-N-C), ρ (O-P-C-N)	1133.37	1096.99	59.07	1074	1139.6	1103.01	7.09	1046	1134.79	1098.36	92.14	1077
ν N-C _{aliph} , ρ (C-O-H-P), δ (=CH) ip/Ph,	1035.53	1002.29	0.96	1026	1036.9	1003.64	15.02	1039	1070.95	1036.57	16.8	1049
ν (N-C _{aliph}), β (H-C-C), β (C-O-H), β (C-C-C) ρ (O-P-C-N), ρ (H-O-P-C), ρ (C-C-H-C)	1011.52	979.05	0.88	968	1030.3	997.19	33.93	986	1023.13	990.28	47.81	985
ω C-H, β (H-C-C), ρ (C-C-H-C), ρ (C-C-H-C)	826.88	800.337	15.69	799	817.28	791.04	16.43	889	821.6	795.22	31.98	830
δ C-H, γ (C-P), β (H-C-C), β (O-P-C), β (H-O-P), ρ (O-P-C-N)	786.78	761.524	34.44	768	794.61	769.1	79.43	741	817.46	791.219	6.91	814
δ C-H, ν (C-P), β (H-O-P), β (H-C-H), ρ (O-P-C-N), ρ (H-C-N-C)	672.12	650.545	143.9	667	667.07	645.65	83.68	696	705.3	682.65	188.5	737

ν , stretching; γ , rocking; α , scissoring; δ , twisting; ω , wagging; β : in plane bending; ρ : torsion, ρ_{out} outplane

IV.A4 Analyse des Charges Mulliken

Les charges Mulliken proviennent de l' *analyse de population de Mulliken* et fournissent des moyens d'estimation des charges atomiques partielles à partir des calculs menés au moyen des méthodes de chimie numérique, et en particulier celles basées sur la combinaison linéaire d'orbitales atomiques. Les charges de Mulliken des atomes ont été calculées et sont regroupées dans le [tableau IV.A5](#) :

Tableau IV.A5. Charges atomiques de Mulliken calculées par B3LYP/6-31G (d,p) pour mAPac, oAPac et pAPac.

Atom	mAPac	Atom	oAPac	Atom	pAPac
C1	-0.065899	C1	0.377481	C1	-0.073228
C2	-0.090678	C2	-0.130153	C2	-0.109289
C3	-0.121001	C3	-0.099828	C3	0.292834
C4	0.310492	C4	-0.111706	C4	-0.116952
C5	-0.100285	C5	-0.112394	C5	-0.106983
C6	0.184095	C6	0.165884	C6	0.192699
H7	0.086645	H7	0.112195	H7	0.11000
H8	0.093656	H8	0.104121	H8	0.106044
H9	0.106178	H9	0.109841	H9	0.107736
N10	-0.499343	N10	-0.520714	H10	0.109053
C11	-0.231965	C11	-0.239528	O11	-0.623819
H12	0.155222	H12	0.175333	H12	0.342532
H13	0.185715	H13	0.194650	N13	-0.519696
C14	-0.282459	C14	-0.312739	C14	-0.240616
H15	0.211108	H15	0.194945	H15	0.175311
H16	0.153503	H16	0.228101	16H	0.199128
P17	1.073409	P17	1.092504	C17	-0.290936
O18	-0.546949	O18	-0.60326	H18	0.214269
P19	1.076757	P19	1.093500	H19	0.173388
O20	-0.553940	O20	-0.616407	P20	1.093179
O21	-0.579129	O21	-0.607241	O21	-0.601221
H22	0.330274	H22	0.355569	P22	1.087211
O23	-0.573631	O23	-0.599629	O23	-0.607068
H24	0.337737	H24	0.363640	O24	-0.590124
O25	-0.568923	O25	-0.594116	H25	0.357731
H26	0.340583	H26	0.3687490	O26	-0.596502
O27	-0.590785	O27	-0.6000793	H27	0.366984
H28	0.345508	H28	0.3708720	O28	-0.592762
H29	0.079193	H29	0.1078850	H29	0.369525
O30	-0.582864	O30	-0.6104822	O30	-0.601557
H31	0.317778	H31	0.3430063	H 31	0.373128

Les charges Mulliken ont un rôle important dans l'application de calcul de chimie quantique au système moléculaire parce que les charges atomiques affectent le moment dipolaire, la polarisabilité moléculaire, la structure électronique et beaucoup de propriétés des systèmes moléculaires [12]. La répartition de charge dans les atomes suggère la formation de donneur et d'accepteur impliquant le transfert de charge dans la molécule. La charge atomique a été utilisée pour décrire l'électronégativité et le transfert de charge dans des réactions chimiques [13].

Les charges atomiques Mulliken calculées par la méthode B3LYP/(d, p) sont rassemblés dans le [Tableau IV.A5](#). Il est digne de mentionner que les atomes C4/C6, C1/C6 et C3/C6 des molécules mAPac, oAPac et pAPac, respectivement, présentent une charge positive tandis que les autres atomes de carbone présentent des charges négatives.

L'oxygène a une valeur négative maximale de charge entre (-0.546949) et (-0.616407) dans le groupe OH phénolique et pour les groupes phosphoniques. La charge atomique maximale positive est obtenue pour le phosphore présent dans le groupement phosphonique. La charge sur H18 dans le groupement fonctionnel phosphonique a l'ampleur maximale de (+0.214269) parmi les atomes d'hydrogène présents dans la molécule pAPac. Cependant, tous les atomes d'hydrogène présentent une charge nette positive. La présence d'une charge négative importante sur l'atome O et N et une charge nette positive sur atome H peut suggérer la formation d'interactions intermoléculaires dans des formes solides [14]. La Distribution des charges atomiques Mulliken pour chaque molécule est représentée dans la [Fig. IV.A3](#).

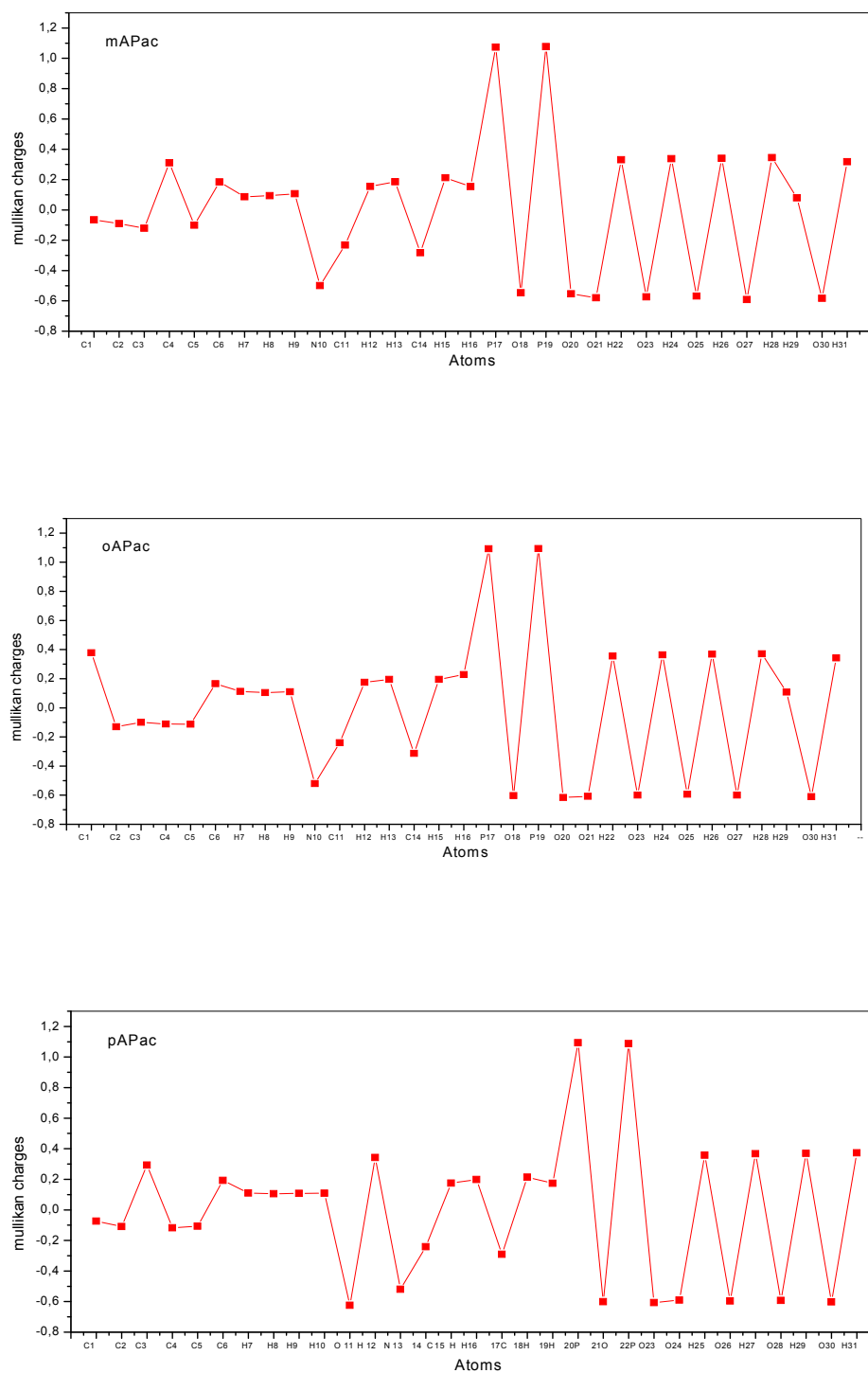
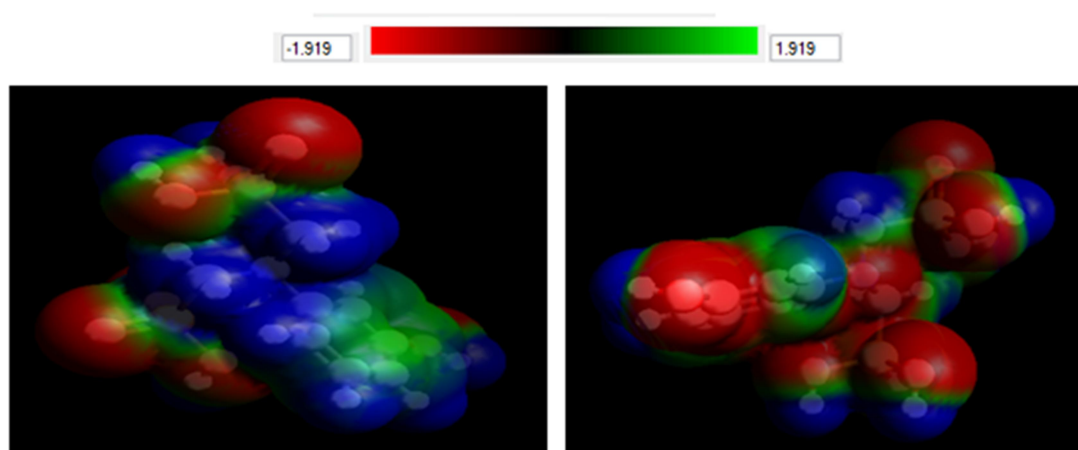


Fig.IV.A3. Distribution des charges atomiques de Mulliken calculées par B3LYP/6-31G (d,p) pour mAPac, oAPac et pAPac.

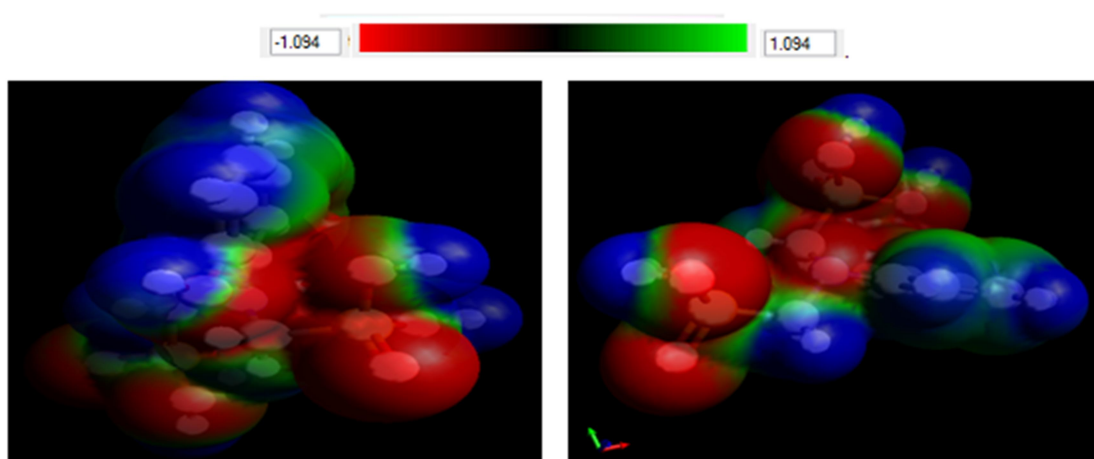
IV.A5 Le Potentiel Electrostatique Moléculaire (PEM)

Les surfaces de **Potentiel Electrostatique Moléculaire** illustrent les distributions de charge des molécules en trois dimensions. Le PEM fournit une méthode visuelle pour comprendre la polarité relative d'une molécule. Cette carte nous permet de visualiser les régions variables chargées d'une molécule. La connaissance de la répartition de charge peut être utilisée pour déterminer comment les molécules interagissent les uns avec les autres et il est également utilisé pour déterminer la nature des liaisons chimiques. Bien que le potentiel électrostatique négatif corresponde à une attraction du proton par la densité d'électrons concentré dans la molécule (coloré de rouge sur la surface PEM), le potentiel électrostatique positif correspond à une répulsion du proton par les noyaux atomiques dans les régions où la densité d'électrons de faible existe et la charge nucléaire est incomplètement blindée (colorée de bleu). Les régions non rouges ou bleues indiquent que la différence de l'électronégativité n'est pas très grande. Dans une molécule avec une grande différence de l'électronégativité, la charge est très polarisée, et il y a des différences significatives dans la densité d'électrons dans les différentes régions de la molécule. Cette grande différence de l'électronégativité conduit à des régions qui sont presque entièrement rouge et presque entièrement bleue [15]. Les régions de potentiel intermédiaire, jaune et verte, et les plus petites régions ou pas de potentiel extrême, rouge et bleu, sont des indicateurs clés d'une électronégativité plus petite.

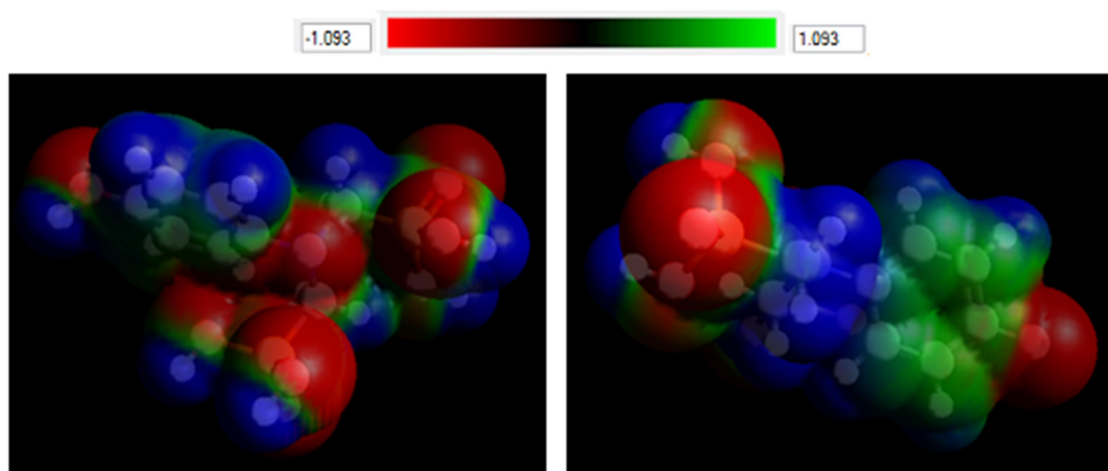
Les PEM des molécules étudiées sont calculés par la méthode B3LYP / 6-31G (d,p) comme le montre la Fig. IV.A4. Le code couleur de ces cartes est dans la gamme entre -1.919a.u (rouge) à 1.919a.u. (Bleu), -1.094 a.u. (Rouge) à 1.094a.u. (Bleu) et -1.093a.u. (Rouge) à 1.093a.u. (Bleu) pour mAPac (a), oAPac (b) et pAPac (c), respectivement. Les régions positives (bleu) de MEP sont liés à des régions de réactivité électrophile et les régions négatives (vert) à la réactivité nucléophile comme il est montré dans Fig. IV.A4. Les résultats de la MEP montrent que les potentiels négatifs sont présentés aux atomes électro-négatifs d'oxygène (le potentiel électrostatique négatif maximal est observé sur les atomes O2 et O3), alors que les potentiels positifs sont présents à des atomes d'hydrogène.



(a)



(b)



(c)

Fig.IV.A4. Potentiel Electrostatique Moléculaire de **mAPac** (a), **oAPac**(b) et **pAPac** (c).

IV.A6 Les orbitales moléculaires

L'analyse de la fonction d'onde indique que l'absorption d'électrons correspond à la transition entre l'état fondamental et l'état excité et est décrite principalement par une excitation électronique de l'orbitale moléculaire occupée la plus élevée (HOMO) à l'orbitale plus basse inoccupée (LUMO).

Les Orbitales moléculaires (HOMO et LUMO) sont des termes très importants dans la chimie quantique et leurs énergies sont très utiles pour les physiciens et les chimistes [16]. L'HOMO représente une capacité à perdre un électron, alors LUMO représente la capacité de gagner un électron. L'énergie de l'HOMO est directement proportionnelle au potentiel d'ionisation et l'énergie de l' LUMO est directement proportionnelle à l'affinité électronique [17]. La différence d'énergie d'orbital entre la HOMO et LUMO est appelé *écart HOMO-LUMO* qui explique le transfert de charge et éventuelle interaction au sein de la molécule. La différence d'énergie entre HOMO et LUMO a été utilisée pour prouver la bioactivité de transfert de charge intramoléculaire [18,19]. HOMO et LUMO jouent un rôle prédominant dans les réactions chimiques. Petit écart HOMO-LUMO implique une faible stabilité cinétique, car il est énergétiquement favorable pour ajouter des électrons à une LUMO et / ou pour extraire des électrons d'un HOMO [20,21]. L'énergie de l'HOMO élevée correspond à une molécule plus réactive dans les réactions avec les électrophiles, basse énergie de l'LUMO est essentiellement pour les réactions moléculaires avec des nucléophiles [22,23]. Selon la théorie des orbitales moléculaires, une énergie HOMO élevée d'une molécule de réactif et une énergie basse de LUMO d'un autre réactif sont avantageux pour la réaction entre les deux molécules, parce que les transferts d'électrons sont plus facile de la HOMO d'un réactif à la LUMO de l'autre dans l'interaction orbitale [24]. Les HOMO, LUMO et l'écart d'énergie (HOMO-LUMO) du mAPac, oAPac et pAPac dans la DFT avec la base 6-31G (d, p) ont été calculés. L'écart d'énergie HOMO-LUMO révèle que l'écart de l'énergie reflète l'activité chimique de la molécule.

Les représentations des orbitales moléculaires frontières pour les structures optimisées de mAPac, pAPac et oAPac sont illustrées dans la Fig. IV.A5. Les isomères avec une plus grande Energie HOMO étaient oAPac et pAPac avec -0,22451 et -0.23225eV, respectivement. D'autre part, la plus petite l'énergie LUMO, indique la plus grande affinité pour les électrons, représentée par mAPac. HOMO et LUMO ont montré les mêmes centres

d'activités dans tous les isomères. L'HOMO est principalement délocalisée sur le OH substitué sur le noyau aromatique, le noyau phényl et la liaison N-C.

Les plus grandes contributions à HOMO étaient parmi les atomes en C1-C6 dans le noyau aromatique contenant le groupe OH, C11 et C14 de groupes méthylène, N10 du groupe amino, et O30 du groupe hydroxyle, en fonction de leurs coefficients ([Tableau IV.A6](#)). Il est clair que la plus grande contribution à HOMO est l'atome d'oxygène des groupes phosphoniques dans tous les isomères. D'autre part, LUMO est principalement délocalisée sur les atomes de cycle aromatique. Les grandes contributions à LUMO étaient ceux de la C1-C6 pour mAPac et pAPac et N10 du groupe amino, C11 et C14 dans les groupes méthylène a également contribué à LUMO pour oAPac ([Tableau IV.A6](#)).

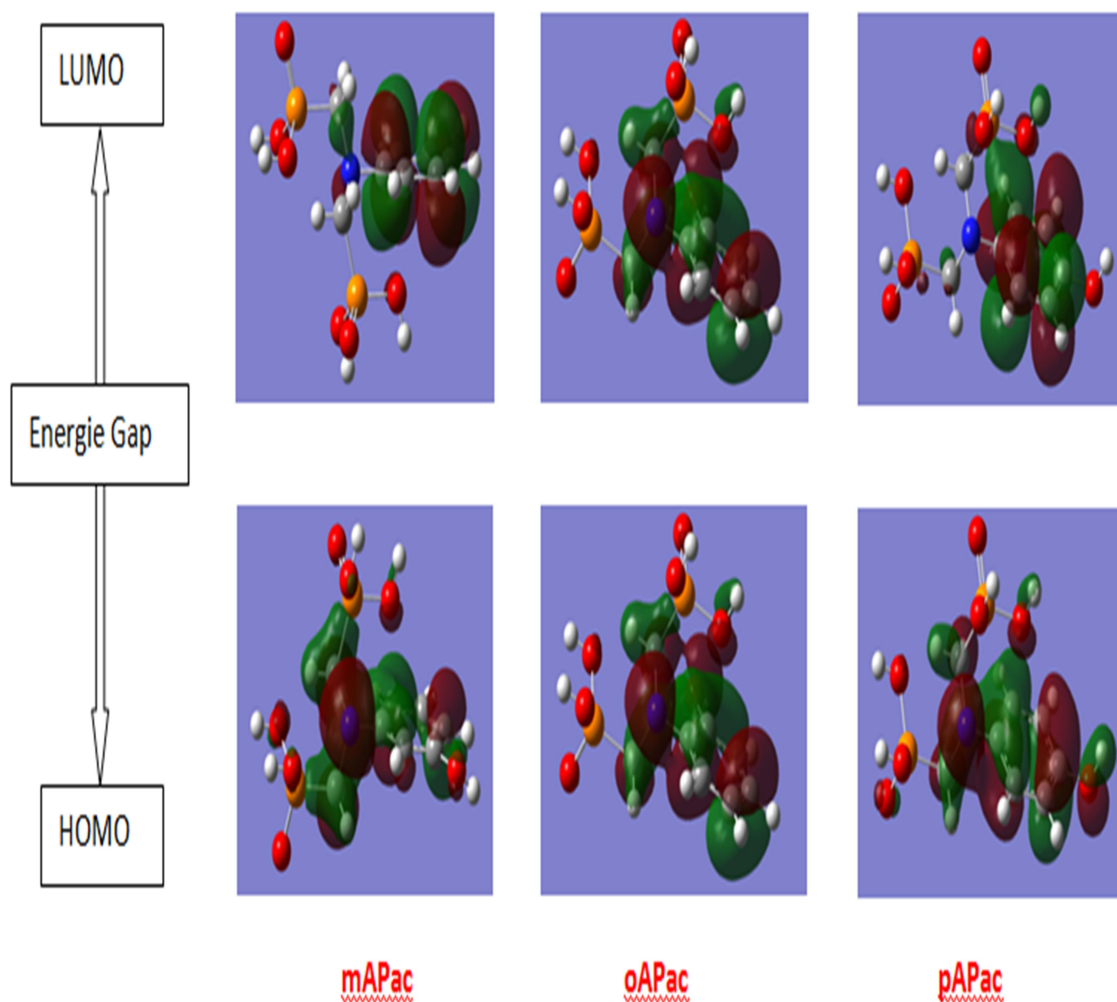


Fig.IV.A5. Orbitales moléculaire de mAPac, oAPac et pAPac.

IV.A7 Indices de réactivité

Indices de réactivité globale des composés, à savoir, l'énergie d'ionisation (I), l'affinité électronique (A), la dureté globale (η), le potentiel chimique électronique (μ), l'indice de douceur globale (σ), l'indice d'électronégativité absolue (χ), et l'indice de électrophilie (π), ont été évalués par la DFT méthode en termes des énergies de l'orbitale moléculaire (E_{HOMO}) et (E_{LUMO}) [25-29]. La Dureté chimique est associée à la stabilité et la réactivité d'un système chimique. Dans une molécule, elle mesure la résistance au changement dans le transfert de la distribution ou de la charge électronique. Sur la base des orbitales moléculaires frontières, la dureté chimique correspond à l'écart entre les énergies des orbitales HOMO et LUMO. Plus l'écart de l'énergie HOMO-LUMO est important, plus la molécule est dure et plus stable et donc moins réactive [30-32].

La dureté globale (η), est:

$$\eta = 1/2 (E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}) \quad (1)$$

L'inverse de la dureté globale est désigné comme la douceur, σ comme suit:

$$\sigma = 1 / 2\eta \quad (2)$$

L'indice σ porte une relation inverse avec l'indice de dureté globale ($\sigma = 1/2\eta$), est une fonction de l'écart d'énergie LUMO / HOMO. Il peut servir de critère rude pour la stabilité thermodynamique des composés et peut être utilisé pour leur prédiction de la réactivité, à savoir, la molécule plus douce, qui a un écart LUMO/ HOMO plus petit, peut subir un réarrangement plus facile de la densité de charge, et donc il pourrait être prédit à être plus réactifs que les plus durs [27,29]. En outre, l'indice de douceur globale (ou dureté) peut être utilisé en sondant le caractère aromatique des composés organiques, à savoir des composés qui ont un écart LUMO / HOMO plus petit pourrait être considérée comme présentant un caractère moins aromatique par rapport à ceux avec une LUMO plus grande / écart de HOMO [33].

Le Tableau IV.A6 présente les valeurs de dureté chimique calculées pour tous les composés. Les résultats indiquent que les composés pAPac et oAPac sont plus stables et plus durs que le mAPac et l'ordre de stabilité est:

$$\eta: \text{pAPac (0.10967eV)} \approx \text{oAPac (0.10568eV)} > \text{mAPac (0.071025eV)} .$$

En outre, les résultats (Tableau IV.A6) indiquent que le composé mAPac, avec un plus petit LUMO/HOMO gap, est le plus doux, moins stable et plus réactif que oAPac et pAPac.

IV.A7.1 Potentiel d'ionisation Vertical (VIP) et l'Affinité Electronique Verticale (VEA)

Conformément à l'approximation de Janak [25], il existe un lien entre le potentiel d'ionisations verticales (VIP) et E_{HOMO} ($\text{VIP} \approx -E_{\text{HOMO}}$) ainsi qu'entre l'affinité électronique verticale et E_{LUMO} ($\text{VEA} \approx -E_{\text{LUMO}}$). Dans la présente étude, le potentiel d'ionisation de mAPac, oAPac et pAPac sont 0,31999eV, 0,22451eV et 0,23225eV, respectivement, comme indiqué dans le Tableau IV.A6, qui indique clairement que le pAPac et oAPac sont très stable par rapport le mAPac.

IV.A7.2 Potentiel chimique électronique

Le Potentiel chimique électronique est défini comme le négatif de l'électronégativité d'une molécule [34] et déterminée en utilisant l'équation 3.

$$\mu = 1/2 (E_{\text{LUMO}} + E_{\text{HOMO}}) \quad (3)$$

Physiquement, μ décrit la tendance de fuite des électrons à partir d'un système à l'équilibre [30]. Les valeurs de μ pour tous les composés sont présentées dans le Tableau IV.A6. Plus le potentiel chimique électronique de la molécule est important, moins elle est stable et plus elle est réactive. La tendance dans le potentiel chimique électronique est :

$$\mu : \text{mAPac} (-1.00415\text{eV}) > \text{oAPac} (-2.10384\text{eV}) \approx \text{pAPac} (-2.03948\text{eV}).$$

Ceci est en bon accord avec les résultats de calculs de la dureté.

IV.A7.3 Électronégativité / électrophilie

L'indice d'électronégativité absolue (χ) et l'indice d'électrophilie globale (ω) sont calculées comme suit:

$$\chi = -(E_{\text{LUMO}} + E_{\text{HOMO}})/2 \quad (4)$$

Indice global d'électrophilie (ω), introduit par Parr [34], est calculé en utilisant le potentiel chimique électronique et la dureté chimique comme indiqué dans l'équation 3.

$$\omega = \mu^2/2\eta \quad (5)$$

L'indice d'électrophilie mesure la capacité d'une espèce, d'accepter les électrons [35]. Il est une mesure de la stabilisation de l'énergie après qu'un système accepte une quantité supplémentaire de charge électronique de l'environnement [28].

Les valeurs d'électrophilie pour les composés mAPac, oAPac et pAPac sont présentées dans le [Tableau IV.A6](#). Les composés oAPac et pAPac sont jugée plus nucléophile que mAPac qui est un électrophile plus fort.

Tableau IV.A6: Energies de HOMO, LUMO, écarts énergétiques (HOMO/LUMO) et propriétés moléculaires de **mAPac**, **oAPac** et **pAPac** (eV).

Energie Moléculaire	B3LYP/6-31G(d, p)		
	mAPac	oAPac	pAPac
E_{LUMO} (eV)	-0.17794	-0.01315	-0.01291
E_{HOMO} (eV)	-0.31999	-0.22451	-0.23225
Ecart Énergétique (Δ)	0.14205	0.21136	0.21934
Potentiel d'Ionisation (I)	0.31999	0.22451	0.23225
Affinité Electronique (A)	0.17794	0.01315	0.01291
Dureté globale (η)	0.07102	0.10568	0.10967
Douceur global (σ)	7.03977	4.73126	4.55913
Potentiel Chimique (μ)	-1.00415	-2.1038	-2.03948
Electronégativité (χ)	0.24896	0.11883	0.12258
Electrophilicité (ω)	0.43635	0.06680	0.06850

$$A = -E_{\text{LUMO}}, I = -E_{\text{HOMO}}, \eta = 1/2(E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}), \mu = 1/2(E_{\text{HOMO}} + E_{\text{LUMO}}), \omega = \mu^2/2\eta, \sigma = 1/2\eta$$

IV.A7.4 Moment dipolaire, polarisabilité et l'hyperpolarisabilité Première

La DFT a également été utilisé pour calculer le moment dipolaire, la polarisabilité $\langle\alpha\rangle$ et l'hyperpolarisabilité première statique totale (β) [36,37]. Le moment dipolaire dans une molécule est une autre propriété électronique importante qui résulte de la répartition non uniforme des charges sur les différents atomes dans une molécule. Il est principalement utilisé pour étudier les interactions intermoléculaires impliquant des forces dipôle-dipôle de type Van der Waals, etc., parce que plus le moment dipolaire est important, plus les interactions intermoléculaires seront fortes. Le moment total de dipôle dans un repère cartésien est défini par [38]:

$$\mu = (\mu_x^2 + \mu_y^2 + \mu_z^2)^{1/2} \quad (6)$$

Le moment dipolaire calculé pour les trois molécules est donnée dans le [Tableau IV.A7](#). Le [Tableau IV.A7](#) montre que la valeur calculée de moment dipolaire en cas de pAPac et oAPac sont presque égaux et bien supérieure à mAPac. Dans une molécule, plus la valeur du moment dipolaire est grande, plus la molécule est polaire. Donc le oAPac et pAPac sont plus polaires que le mAPac.

La Polarisabilités et hyperpolarisabilités caractérisent la réponse d'un système à un champ électrique appliqué [39]. Ils déterminent la force des interactions moléculaires ainsi que les sections transversales des différents processus de diffusion et de collision, mais aussi les propriétés optiques non linéaires (NLO) du système [40,41]. Il est bien connu que la réponse optique non linéaire d'une molécule isolée dans un champ électrique E_i peut être présentée comme une expansion en série de Taylor du moment dipolaire total μ_{tot} , induite par le champ:

$$\mu_{tot} = \mu^i_0 + (1/2) \alpha_{ij} E_j + (1/6) \beta_{ijk} E_j E_k + \dots, \quad (7)$$

μ^i_0 , α_{ij} , et les coefficients de β_{ijk} sont les composantes du moment dipolaire du système non perturbé, la polarisabilité dipolaire, et la première hyperpolarisabilité statique, respectivement. Le isotrope (ou moyenne) linéaire de polarisabilité $\langle \alpha \rangle$ et anisotropie de polarisabilité $\Delta \alpha$ est défini comme [42]:

$$\langle \alpha \rangle = 1/3(\alpha_{xx} + \alpha_{yy} + \alpha_{zz}) \quad (8)$$

$$\Delta \alpha = 1/2[(\alpha_{xx} - \alpha_{yy})^2 + (\alpha_{xx} - \alpha_{zz})^2 + (\alpha_{yy} - \alpha_{zz})^2]^{1/2} \quad (9)$$

L'hyperpolarisabilité première est un troisième tenseur de rang qui peut être décrit par la matrice 3x3x3. Les 27 composants de la matrice 3D peuvent être réduites à 10 éléments en raison de la symétrie Kleinman [43] ($\beta_{xyy} = \beta_{yxy} = \beta_{yyx} = \beta_{yyz} = \beta_{zyy} = \beta_{zyx}$; ...). Même d'autres permutations prennent également même valeur. La sortie de Gaussian 09 fournit 10 composants de cette matrice comme β_{xxx} , β_{xxy} , β_{xyy} , β_{yyy} , β_{xxz} , β_{xyz} , β_{yyz} , β_{xzz} , β_{yzz} , β_{zzz} , respectivement. Les composants de l'hyperpolarisabilité première peuvent être calculés en utilisant l'équation suivante [30]:

$$\beta_i = \beta_{iii} + 1/3 \sum_{i \neq j} (\beta_{ijj} + \beta_{jij} + \beta_{jji}) \quad (10)$$

Par l'utilisation des composants x, y et z de b, l'amplitude de la tenseur de la première hyperpolarisabilité peut être calculée par:

$$\beta_{tot} = (\beta_x^2 + \beta_y^2 + \beta_z^2)^{1/2} \quad (11)$$

L'équation complète pour calculer l'amplitude de première hyperpolarisabilité statique total est donnée comme suit [44]:

$$\beta_{tot} = [(\beta_{xxx} + \beta_{xyy} + \beta_{xzz})^2 + (\beta_{yyy} + \beta_{yzz} + \beta_{yxx})^2 + (\beta_{zzz} + \beta_{zxx} + \beta_{zyy})^2]^{1/2} \quad (12)$$

Les valeurs moyennes de polarisabilités statiques, anisotropie de polarisabilités et hyperpolarisabilités premières totales des composés étudiés calculés au même niveau de la

théorie pour les molécules étudiées, peuvent fournir une comparaison raisonnable de ces quantités, en l'absence de données expérimentales. Le β_{TOTAL} (hyperpolarisabilité totale intrinsèque) de l'isomère pAPac est assez grand par rapport aux deux autres homologues (Tableau IV.A7).

Tableau IV.A7 : Calculs par B3LYP/6-31G (d, p) des moments dipolaires électriques (Debye), polarisabilité (a.u), composants β et β_{tot} de mAPac, oAPac et pAPac.

Paramètres	mAPac	oAPac	pAPac
μ_x	2.6174	3.9358	2.0497
μ_y	0.0615	-1.2768	2.4779
μ_z	0.634	0.9842	2.9942
μ_{tot}	2.6938	4.2531	4.3939
α_{xx}	-94.6348	-98.349	-98.618
α_{yy}	-130.0688	-128.5653	-136.7073
α_{zz}	-117.4523	-108.3636	-114.8732
$\langle\alpha\rangle$	-114.0519	-111.7593	-116.7328
$\Delta\alpha$	21.9964	18.8508	23.40808
β_{xxx}	-2.6113	12.0406	-39.7927
β_{xxy}	48.1408	100.2274	146.4142
β_{xyy}	77.3883	28.4447	40.7512
β_{yyy}	-25.8796	-12.9892	15.5488
β_{xxz}	29.5875	32.4841	57.7719
β_{xyz}	29.3361	29.5958	13.4553
β_{yyz}	46.6792	49.5103	64.8758
β_{xzz}	-8.3855	22.8746	7.5526
β_{yzz}	24.158	4.5709	8.0324
β_{zzz}	9.3629	-23.9124	7.2445
β_{TOTAL}	128.425	161.518259	261.534

IV.A8 Propriétés thermodynamiques

Les paramètres thermodynamiques à savoir la capacité thermique, entropie, constantes de rotation et de vibration et des énergies de vibration de point zéro des composés ont également été calculé à la température 298.15 k et pression 1,00 atm par le niveau DFT-B3LYP utilisant la base 6-31G (d, p) (Tableau IV.A8).

Tableau IV.A8 : Paramètres thermodynamiques calculés de **pAPac**, **mAPac** et **oAPac** par B3LYP/ 6-31G (d, p).

	mAPac	oAPac	pAPac
Energie SCF (a.u.)	-1576.75634	-1576.77884	-1576.79072
Energie Totale (thermique), E total (kcal.mol ⁻¹)			
TOTALE	150.788	150.977	150.721
Electronique	0.000	0.000	0.000
Translation	0.889	0.889	0.889
Rotation	0.889	0.889	0.889
Vibration	149.01	149.199	148.943
Capacité calorifique, C _v (cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹)			
TOTALE	65.872	65.602	65.998
Electronique	0.000	0.000	0.000
Translation	2.981	2.981	2.981
Rotation	2.981	2.981	2.981
Vibration	59.911	59.640	60.037
Entropie, S (cal.mol ⁻¹ .K ⁻¹)			
TOTALE	130.183	132.718	131.094
Electronique	0.000	0.000	0.000
Translation	42.963	42.963	42.963
Rotation	33.994	33.678	34.020
Vibration	53.226	56.077	54.111
Energie de Vibration, E _{vib} (kcal.mol ⁻¹)	149.01		
E ₀ (kcal.mol ⁻¹)	140.29465	140.47206	140.16995
Constants de Rotation (GHz)			
A	0.4422407	0.4871643	0.4843607
B	0.2494768	0.2721775	0.2328536
C	0.1899396	0.217278	0.1809694

Les paramètres thermodynamiques sont présentés dans le [Tableau IV.A8](#). L'énergie minimale globale obtenue pour la structure optimisée de pAPac, mAPac et oAPac a été calculée à -1576.79072, -1576.75634 et -1576.77884 a.u, respectivement. Les données thermodynamiques fournissent des informations utiles pour l'étude plus loin sur les composés étudiés, lorsque ceux-ci peuvent être utilisés comme des réactifs dans une nouvelle réaction.

Ces fonctions thermodynamiques standards peuvent être utilisées comme valeurs thermodynamiques de référence pour calculer les changements de l'entropie (ΔS_T), les changements d'enthalpies (ΔH_T) et les changements de l'énergie libre de Gibbs (ΔG_T) de la réaction. Il n'y a pas beaucoup de déviation dans les propriétés thermodynamiques calculées à partir de ces méthodes.

Sur la base de l'analyse vibratoire au niveau B3LYP/6-31G (d, p), les fonctions thermodynamiques statistiques standard: capacité thermique ($c^0_{m, p}$), l'entropie (S^0_m), et les

changements d'enthalpie (ΔH_m^0), pour les composés étudiés ont été obtenue à partir des fréquences harmoniques théoriques et listé dans le [tableau IV.A9](#). Dans le [tableau IV.A9](#), on peut observer que ces fonctions thermodynamiques augmentent avec la température allant de 100 à 1000K en raison du fait que les intensités de vibration moléculaire augmentent avec la température [45].

Tableau IV.A9: Variations des propriétés thermodynamiques en fonction des températures pour **mAPac**, **oAPac** et **pAPac**.

T (K)	S_m^0 (J/mol.K)			$C_{p,m}^0$ (J/mol.K)			ΔH^0 (kJ/mol)		
	mAPac	oAPac	pAPac	mAPac	oAPac	pAPac	mAPac	oAPac	pAPac
100	343.57	354.99	346.64	111.51	112.08	112.22	6.8	7.02	6.91
200	448.65	459.73	452.2	201.58	200.4	202.32	22.48	22.64	22.66
298.15	544.79	555.4	548.61	283.92	282.79	284.45	46.38	46.43	46.62
300	546.56	557.16	550.37	285.37	284.24	285.89	46.91	46.95	47.15
400	638.68	648.99	642.62	355.87	354.96	356.23	79.1	79.05	79.39
500	724.26	734.39	728.28	410.75	410.03	411.04	117.56	117.42	117.87
600	803.02	813.03	807.08	452.58	452.01	452.83	160.82	160.61	161.16
700	875.32	885.25	879.42	485.01	484.55	485.23	207.76	207.51	208.13
800	941.84	951.71	945.96	510.99	510.61	511.18	257.6	257.31	257.99
900	1003.3	1013.13	1007.45	532.47	532.14	532.62	309.81	309.48	310.21
1000	1060.37	1070.17	1064.53	550.66	550.38	550.79	363.99	363.63	364.41

Les équations de corrélation entre les capacités de chaleur, entropie, changements d'enthalpie et les températures ont été équipées par des formules quadratiques:

• Pour **mAPac**

$$S_m^0 = 234,31256 + 1,13222T - 3,0766 \cdot 10^{-4}T^2 \quad (R^2 = 0.99998)$$

$$C_{p,m}^0 = 18,53023 + 1,02928T - 5,05486 \cdot 10^{-4}T^2 \quad (R^2 = 0.99827)$$

$$\Delta H^0 = -16,09952 + 0,15181T + 2,3257 \cdot 10^{-4}T^2 \quad (R^2 = 0.99908)$$

• Pour **oAPac**

$$S_m^0 = 246,15728 + 1,12742T - 3,0481 \cdot 10^{-4}T^2 \quad (R^2 = 0.99998)$$

$$C_{p,m}^0 = 18,59004 + 1,0255T - 5,01745 \cdot 10^{-4}T^2 \quad (R^2 = 0.9984)$$

$$\Delta H^0 = -15,73854 + 0,15057T + 2,33093 \cdot 10^{-4}T^2 \quad (R^2 = 0.99908)$$

• Pour **pAPac**

$$S_m^0 = 237,22895 + 1,13553T - 3,09817 \cdot 10^{-4}T^2 \quad (R^2 = 0.99998)$$

$$C_{p,m}^0 = 19,45479 + 1,02767T - 5,04654 \cdot 10^{-4}T^2 \quad (R^2 = 0.99828)$$

$$\Delta H^0 = -16,0437 + 0,1525T + 2,32245 \cdot 10^{-4}T^2 \quad (R^2 = 0.99909)$$

Les graphes de corrélation de ces équations sont présentés dans les figures (Fig.IV.6, IV.7 et IV.8).

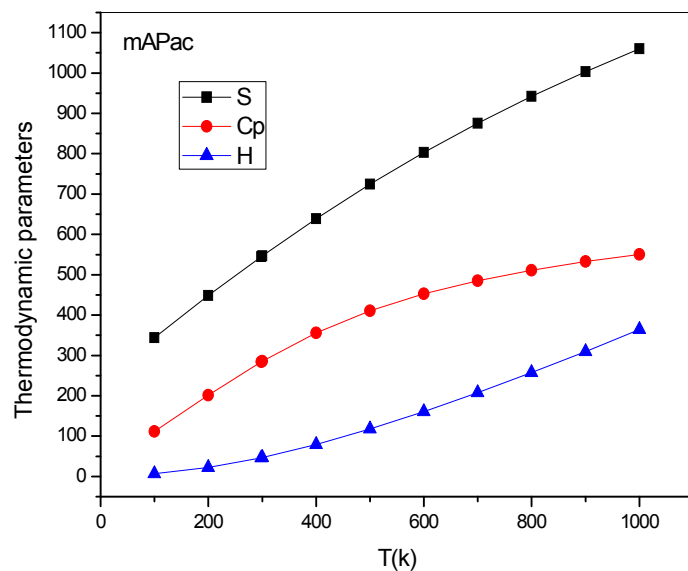


Fig. IV.A6. Courbes de corrélation des fonctions thermodynamiques de mAPac.

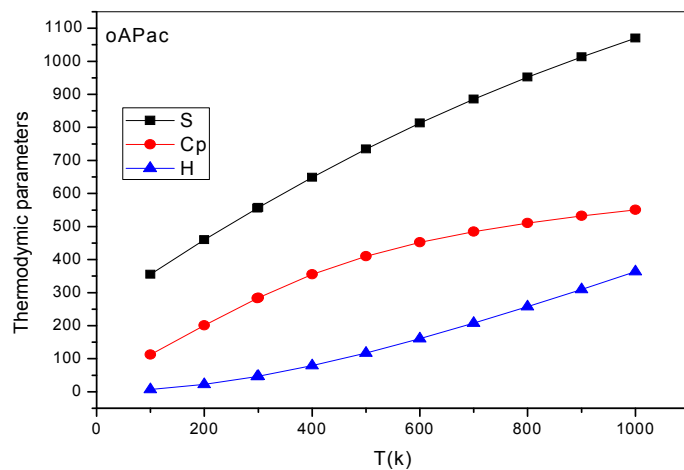


Fig. IV.A7. Courbes de corrélation des fonctions thermodynamiques de oAPac.

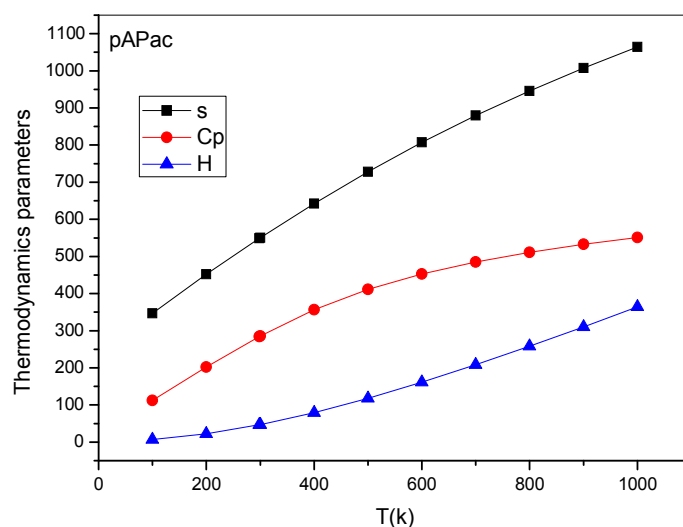


Fig.IV.A8. Courbes de corrélation des fonctions thermodynamiques de pAPac.

IV.A9 Conclusion

Les géométries optimisées, les paramètres géométriques, les fréquences de vibration, frontière orbitale, surfaces MEP, etc. du composé étudiés ont été calculés par la méthode DFT. Les résultats indiquent que le composé mAPac, avec un plus petit écart LUMO/HOMO, est plus douce, moins stable, plus électrophile et plus réactif que oAPac et pAPac. Les données thermodynamiques fournissent des informations utiles pour l'étude plus loin sur les composés étudiés. Les corrélations entre les fonctions thermodynamiques statistiques et la température sont également obtenus. On voit que les capacités thermiques et les enthalpies, entropies augmentent avec l'augmentation de la température en raison de l'intensité des vibrations moléculaires augmentent avec l'augmentation de la température.

Références bibliographiques

- [1] W. Kohn, L.J. Sham, *Phys. Rev.* 1133-1138, 140(1965).
- [2] A.D. Becke, *J. Chem. Phys.*, 648-5652 98(1993).
- [3] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, *Phys. Rev.* 785-789, 37(1998).
- [4] B. Miehlich, A. Savin, A. Stoll and H. Preuss, *Chem. Phys. Lett.* 200-206, 157(1989).
- [5] M.J. Frisch et. al., Gaussian, Inc., Wallingford CT (2009).
- [6] A. Frisch, A.B. Nielson, A.J. Holder, GAUSSVIEW User Manual, Gaussian Inc., Pittsburgh, PA, (2000).
- [7] A.P. Scott, L. Radom, *J. Phys. Chem.* 16503-16513, 100(1996).
- [8] M.H. Jamroz, Vibrational Energy Distribution Analysis: VEDA 4 program, Warsaw(2004).
- [9] R. Zwarich, J. Smolarch & L. Goodman, *J. Mol. Spectrosc.* 336, 38(1971).
- [10] G. Varsanyi, Vibrational Spectra of Benzene Derivatives, Academic Press, New York (1969).
- [11] M. Silverstein, Clayton, G. Basseler & C. Morill, Spectrometric identification of organic compounds: Wiley, New York, (1981).
- [12] R.S. Mulliken., *J. Chem. Phys.* 23, 1833-1840,(1955).
- [13] I.G. Csizmadia., «Theory and Practice of MO Calculations on Organic Molecules», Elsevier, Amsterdam, (1976).
- [14] L.X. Hong, L.X. Ru, Z.X. Zhou, *Comput. Theor. Chem.* 27, 969(2011).
- [15] A. Vektariene, R. Janciene, 13th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-13) (2009).
- [16] G. Varsanyi., «Vibrational Spectra of Benzene Derivatives», Academic Press, New York(1969).
- [17] V. Krishnakumar, R. John Xavier, *J. Indian Pure & Appl. Phys.*, 41, 95(2003).
- [18] M. Silverstein, Clayton, G. Basseler & C. Morill., «Spectrometric identification of organic compounds», (Wiley, New York) (1981).
- [19] I. Sidir, Y.G. Sidir, M. Kumalar, E. Tasal, *J. Mol. Struct.* 134, 964 (2010).
- [20] K. Jug, Z. B. Maksic., «Theoretical Model of Chemical Bonding », Ed. Z.B. Maksic, Part 3, Springer, p. 29, p. 233 , Berlin (1991).
- [21] S. Fliszar, «Charge Distributions and Chemical Effects», Springer, New York (1983).
- [22] L. X. Hong, L. X. Ru., Z. X. Zhou., *Comput. Theor. Chem.* 969 , 2 (2011).
- [23] A. Vektariene, R. Janciene, «The DFT reactivity estimation of amino-1,5-benzodiazepin-2-ones in the cyclization reaction with dimethyl-2-oxoglutaconate». 13th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-13)(2009).
- [24] K. Fukui, T. Yonezawa., H. Shingu, «A Molecular Orbital Theory of Reactivity in Aromatic Hydrocarbons», *J. Chem. Phys.*, vol. 20, pp. 722(1952).
- [25] J.F. Janak, *Phys. Rev. B*, 7165-7168, 18(1978).
- [26] R.G. Pearson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 8440-8441, 83(1986).
- [27] R.G. Pearson, *J. Chem. Sci.* 369-377 117 (2005).
- [28] R.G. Parr, L. Szentpaly, S. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* 1922-1924 , 121(1999).
- [29] P. Geerlings, F. de Proft, W. Langenaeker, *Chem. Rev.* 1793-1873 , 103(2003).
- [30] P.K. Chattarji, B. Maiti, *Journal of the American Chemical Society*. 2705-2710 125 (9) (2003).
- [31] P.G. Parr, R.G. Pearson, *Journal of the American Chemical Society*. 7512-7516, 105(1983).
- [32] K.D. Sen, D.M.P. Mingos, Springer. (1993).
- [33] F. De Proft, P. Geerlings, *Chem. Rev.* 1451-1464, 101(2001).

- [34] A.B. Sawant, C.H. Gill, R.S. Nirwan, *Indian Journal of Pure & Applied Physics*.38-44 50 (1) (2012).
- [35] A. Vektariene, G. Vektaris, J. Svoboda, *Arkivoc*. 311-319,7(2009).
- [36] S. Liu, *Journal of Chemical Sciences*.477-483,117(5) (2005).
- [37] D.A. Kleinman, *Phys. Rev.*1977–1979, 126(1962).
- [38] J. Pipek and P.Z.Mezey, *J. Chem. Phys.* 4916-4926, 90(1989).
- [39] A.D. Buckingham, *Adv. Chem. Phys.* 107-142 (1967) 12.
- [40] C.R. Zhang, H.S. Chen, G.H. Wang, *Chem. Res. Chin.*640, U20(2004).
- [41] Y. Sun, X. Chen, L. Sun, X. Guo, W. Lu, *Chem. Phys. Lett.* 397, 38(2003).
- [42] O. Christiansen, J. Gauss, J.F. Stanton, *Chem. Phys. Lett.*147, 305(1999).
- [43] H. Soscun, O. Castellano, Y. Bermudez, C.T. Mendoza, A. Marcano and Y. Alvarado, *J. Mol. Struct. (Theochem)*. 195,92(2002).
- [44] R. Zhang, B. Du, G. Sun, Y.X. Sun, *Spectrochim. Acta Part A*.1115-1124 75. (2010)
- [45] J. Bevan Ott, J. Boerio-Goates, *Calculations from Statistical Thermodynamics*, Academic Press (2000).

CHAPITRE IV

IV.B) ETUDE QUALITATIVE DE LA RELATION STRUCTURE-ACTIVITE

IV.B1 Introduction

La modélisation moléculaire est un outil destiné aux chercheurs préoccupés par la structure et la réactivité des molécules. La connaissance de la structure des édifices moléculaires permet de comprendre ce qui est réalisé dans une transformation physique, chimique ou biologique. Elle peut permettre aussi de prévoir de telles transformations. La compréhension comme la prévision sont considérablement facilitées lorsque l'on peut visualiser les structures. Une molécule est correctement décrite par sa géométrie et ses propriétés thermodynamiques. La visualisation doit rendre compte de l'ensemble de ces caractéristiques. La question essentielle est de représenter une molécule sur l'écran de la façon la plus proche possible de la "réalité". L'utilisation de l'informatique a permis de mettre au point un outil performant: la modélisation moléculaire [1].

La principale technique utilisée dans les processus de découverte et la conception de médicaments est la méthode QSAR, qui étudie les relations qualitatives et quantitatives des structure-activité (QSAR) [2]. Les QSAR sont des tentatives pour corréler entre les paramètres physico-chimiques de la structure chimique et leur activité biologique. Ainsi, les propriétés de la drogue comme sont devenus importants pour la découverte de la recherche biologique [3,4]. Le terme drogue est devenu couramment utilisé en suivant le travail essentiel de Lipinski et ses collègues [3] basé sur l'examen des propriétés structurelles qui influent sur les propriétés physicochimiques de la solubilité et de la perméabilité et leur effet sur l'absorption du médicament. Le terme propriété drug-like a été élargi et a été lié à toutes les propriétés qui affectent ADME.

IV.B2. Les propriétés QSAR qui caractérisent la structure moléculaire

IV.B2.1. Volume moléculaire

Le Volume moléculaire détermine des caractéristiques de transport des molécules, telles que l'absorption de l'intestin ou la pénétration de la barrière hémato-encéphalique. Le volume est donc souvent utilisé dans les études QSAR pour modéliser les propriétés moléculaires et l'activité biologique. Différentes méthodes peuvent être utilisées pour

calculer le volume moléculaire, y compris les méthodes nécessitant génération de géométries 3D moléculaires [4].

IV.B2.2. Surface polaire

C'est un paramètre de prédiction très utile de propriétés de transport de la drogue. La surface polaire est définie comme étant une somme des surfaces des atomes polaires (habituellement, atomes d'oxygène, atomes d'azote et des atomes d'hydrogène attachés) dans une molécule. Ce paramètre a été montré pour corrélérer très bien avec l'absorption intestinale humaine et la pénétration de la barrière hémato-encéphalique [4].

Le calcul de la surface polaire à partir de la structure 3D du composé est possible mais est assez long. Or, le calcul basé sur la topologie de la molécule ou TPSA montre une très bonne corrélation avec ces résultats ($r^2=0.982$, [5]).

Le calcul de l'Aire de la Surface polaire Topologique (TPSA) est basé sur la méthodologie publiée par Ertl et al. comme la somme des contributions basés sur des fragments dans laquelle O- et N-centrée fragments polaires doivent être considérés et calculés par les surfaces qui sont occupés par des atomes d'azote et d'oxygène et par des atomes d'hydrogène attaché à eux. TPSA a été utilisée pour la caractérisation de l'absorption du médicament, y compris l'absorption intestinale, la biodisponibilité, Caco-2 perméabilité, et hémato-encéphalique perméabilité de la barrière.

En effet, alors que l'absorption intestinale devient difficile pour un composé de surface polaire supérieure à $140\text{\AA}^2$, $60\text{\AA}^2$ est le seuil maximal pour le passage de la barrière hématoencéphalique [6].

IV.B2.3. Le nombre de liaisons rotatives

Le nombre de liaisons rotatives (nrotb) est un simple paramètre topologique qui mesure flexibilité moléculaire. Il a été révélé être un très bon descripteur de la biodisponibilité orale de drogues [5]. La bande rotative est définie comme toute bande nonring unique obligatoire, délimitée à l'extrémité non-terminal (ie, atome non hydrogène). Les C-N liaisons ne sont pas considérées parce qu'ils ont une haute barrière d'énergie de rotation.

IV.B2.4. Le nombre de liaison hydrogène

La liaison hydrogène (ou liaison H) est de type électrostatique (charge partielle, dipôle) et stérique entre deux groupements d'une même molécule ou de deux molécules

voisines. La liaison hydrogène joue un rôle primordial dans solubilité des molécules médicamenteuse et leurs interactions avec les récepteurs biologiques [7]. Les liaisons hydrogènes constituent un cas particulier d'une interaction dipôle – dipôle. Les groupements donneurs sont : F-H, O-H, N-H, Cl-H, P-H, et parfois C-H. Les groupements accepteurs doivent obligatoirement porter un doublet disponible : F, O, N, mais aussi Cl, S et P et les entités chargées telles que l'anion carboxylate par exemple. L'énergie de liaison hydrogène est généralement de 2 à 10 Kcal/mol et les longueurs des liaisons hydrogène sont intermédiaires, elles sont plus longues que les liaisons covalentes mais plus courtes que les liaisons de Van der Waals. La solubilité des substances dans un milieu aqueux dépend fortement de leur capacité de former des liaisons hydrogènes avec l'eau.

IV.B2.5. Coefficient de partition (Log P)

Depuis les travaux de Collander à la fin des années 1950, puis ceux du groupe de Hansch quelques années plus tard, le coefficient de partage P d'une molécule dans un système biphasique constitué de deux solvants non-miscibles (le plus souvent le système n-octanol/eau), est reconnu pour sa faculté à mimer le passage de cette molécule à travers les membranes biologiques. Pour des solutions diluées, ce coefficient de partage n-octanol/eau est le rapport de la concentration d'une molécule de soluté dans le n-octanol sur sa concentration dans l'eau lorsque le système biphasique est en équilibre [8]. Log P, est l'un des paramètres largement utilisées dans des études de relations structure-activité quantitatives (QSARs) dans les sciences pharmaceutiques, biochimiques, toxicologiques et dans les sciences de l'environnement [9].

Le coefficient de partage d'une substance chimique entre deux phases non miscibles est le rapport des concentrations à l'équilibre du composé dans la phase organique apolaire et la phase aqueuse. Le solvant organique couramment utilisés pour mesurer expérimentalement le coefficient de partage des molécules médicamenteuses est le 1-octanol. Le coefficient de partage P se calcule de la manière suivante:

La phase aqueuse est habituellement tamponnée à pH 7,4. Log P, est souvent appelée la constante de lipophilie d'une molécule. Une valeur positive pour log P, ($P > 1$), indique que le composé est lipophile. Une valeur négative pour log P, ($P < 1$) indique que le composé est hydrophile. La plupart des méthodes expérimentales de détermination de log P souffrent du même inconvénient, à savoir que leur domaine d'application est relativement étroit. D'autre part, du fait de la nature intrinsèque de certaines molécules,

leurs log P sont inaccessibles à l'expérience. C'est le cas en particulier des surfactants qui ont tendance à s'accumuler à l'interface du système biphasique au lieu de se disperser dans les deux phases. Enfin, dans le domaine de la conception assistée par ordinateur ou dans le domaine de la chimie combinatoire, les chercheurs travaillent sur des modèles moléculaires avant même que les molécules aient été synthétisées [10]. Ceci explique le succès des nombreuses méthodes d'estimation de log P qui ont été décrites dans la littérature depuis plus de trente ans. Les plus anciennes sont des méthodes fragmentales dans lesquelles une molécule est divisée en fragments prédéfinis et les contributions correspondantes sont sommées pour conduire à une valeur estimée du log P [11].

IV.B3. Les propriétés « drug-like »

Lipinski a défini un ensemble de règles permettant d'estimer la biodisponibilité d'un composé par voie orale à partir de sa structure bidimensionnelle (2D). Ces règles sont un ensemble de valeurs de propriété qui ont été tirés de la classification des propriétés physicochimiques des composés clés de la drogue, etc. La règle de Lipinski [12] est la plus utilisée pour caractériser les composés « drug-like ». D'autres règles ont depuis été introduites. Ces règles concernant les propriétés physico-chimiques ont été définies après l'analyse de 2245 médicaments commercialisés ou en phase finale de développement:

- Le poids moléculaire du composé ne doit pas être supérieur à 500 u.m.a.
- Le logarithme décimal du coefficient de partage eau / 1 -octanol, noté logP, doit être inférieur à 5.
- Le nombre de donneurs de liaisons hydrogène (HBD) doit être inférieur à 5.
- Le nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène (HBA) doit être inférieur à 10[12].

De plus, *Veber* a introduit deux critères supplémentaires à ce qui est aujourd'hui communément appelé "la règle des 5", c'est la surface polaire (PSA, polar surface area) du composé doit être inférieure à 140 Å² et le nombre de liaisons de rotation ("rotatable bonds" en anglais) doit être inférieur à 10 pour une bonne biodisponibilité par voie orale chez le rat [13]. Les composés dont les propriétés physico-chimiques ne satisfont pas au moins 2 des règles sont fortement susceptibles de présenter des problèmes d'absorption ou de perméabilité. En effet, en complément de ces règles, d'autres critères sont pris en compte dans la sélection de molécules potentiellement candidates :

- Nombre de fonctions rotatables ≤ 15
- Nombre d'halogènes ≤ 7

- Nombre de cycles ≤ 6
- Pas de grands cycles de plus de 7 membres
- Au moins un atome d'azote ou d'oxygène dans la molécule [12].

Toutes ces propriétés sont calculées par trois logiciels **molsoft**, **molinspiration** et **Osiris**.

IV.B3.1 Calculs des propriétés QSAR

Dans le travail de cette thèse, des calculs de modélisations moléculaires ont été exécutés en utilisant :

IV.B3.1.1. Molinspiration

C'est un logiciel qui est maintenu par l'université de Bratislava (République Slovaque) en 1986 [14]. Ce logiciel calcule logP, surface polaire moléculaire (PSA), nroth et HBA/HBD. Cependant, ce site offre des outils pour calculer d'autres propriétés, telles que le volume et le nombre total d'atomes dans la molécule [15-18].

IV.B3.1.2 Molsoft

Molsoft est logiciel établi par *California Based Software Company*, qui est une source principale de nouvelle technologie percée. Molsoft calcule les propriétés chimiques comme formule moléculaire, poids moléculaire, nombre de liaisons hydrogène accepteurs (HBA/HBD), logP (octanol /coefficient de partage de l'eau) [19].

IV.B3.1.3. OSIRIS Property Explorer

Osiris est une partie intégrante de l'enregistrement des substances en interne d'Actelion system [20]. Il permet de dessiner des structures chimiques et calcule sur la volée différents propriétés pertinentes des médicaments à chaque fois une structure est valide [21,22].

IV.B4. Résultats de calculs

Trois médicaments, deux antibactériens et un antifongique, ont été utilisés pour comparer leurs propriétés QSAR avec nos produits.

- La **streptomycine** est un antibiotique antibactérien cytostatique et cytotoxique [23].
- L'**ampicilline** est une aminopénicilline et, en tant que telle, un antibiotique à spectre large [24].

- Le **fluconazole** (DCI) est un médicament antifongique systémique [25]. Il est commercialisé en France sous le nom de Triflucan®.

Les propriétés d'absorption, de distribution, de métabolisme, d'excrétion et de toxicité d'une molécule peuvent être estimées à partir de sa structure chimique, ce qui contribue à réduire les échecs dus à ces mauvaises propriétés d'ADME-T. Ces propriétés ont été calculées par le logiciel Molinspiration et Molsoft et leurs valeurs sont présentées dans le tableau qui suit (**Tableau IV.B1**) :

Tableau IV.B1. Calculs des propriétés moléculaires et drug-Likness par Molinspiration et Molsoft.

	LogP ^(a)	M	TPSA ^(a)	Volume ^(a)	Nb liaisons rotables ^(a)	Acc. d'H (HBA) ^(b)	Don. d'H (HBD) ^(b)	LogS ^(b) moles/L	NV ^(a)
4AP	-1.14	109.13	46.25	103.35	0	1	3	-1.11 (8497.61 mg/L)	0
pAPac	-0.72	297.14	138.52	227.21	5	7	5	-1.48 (9813.88 mg/L)	0
3AP	-1.14	109.13	46.25	103.35	0	1	3	-1.24 (6330.33 (mg/L)	0
mAPac	-0.72	297.14	138.52	227.21	5	7	5	-1.55 (8415.13 mg/L)	0
2AP	-1.14	109.13	46.25	103.35	0	1	3	-1.24 (6330.33 (mg/L)	0
oAPac	-0.72	297.14	138.52	227.21	5	7	5	-1.66 (6425.56 mg/L)	0
Streptomycin	-5.35	582	336	497	9	16	16	-0.86	3
Ampicillin	-0.87	113	113	299	4	4	24	-2.41	0
Fluconazole	-0.12	81.6	81.6	249	5	1	1	-2.12	0

(a) paramètres calculés par molinspiration, TPSA: Total Polar Surface Area; ONI: OH--NH Interaction; NV: Number of Violation, Vol: volume.

(b) valeurs calculé par Molsoft, LogS: Solubilité dans l'eau.

Les résultats de calcul qui se représente dans le **Tableau IV.1** montrent que tous les composés sont en accord avec les règles de cinq de Lipinski avec aucune violation, ce qui suggère que ces composés théoriquement n'auront pas des problèmes avec la biodisponibilité orale.

De ce tableau, on note que :

- Pour l'absorption gastro-intestinale optimale par perméabilité de diffusion passive après l'administration par voie oral est d'avoir un Log P modéré (intervalle 0-3). Dans cet intervalle, il existe la bonne balance de la perméabilité et la solubilité. Les composés

ayant un faible log P sont plus polaires et ont une mauvaise perméabilité dans la bicouche lipidique. Les composés ayant un Log P supérieur sont plus non polaires et ont une faible solubilité aqueuse. Par conséquent, tend à favoriser l'absorption et rend les composés plus sensibles au métabolisme et/ou à la clairance biliaire. L'influence de la lipophilicité sur la clairance métabolique des médicaments est attribuée principalement à l'affinité accrue des médicaments pour les enzymes [26,27]. La lipophilicité augmente proportionnellement avec le caractère d'hydrophobicité du groupe substituant.

A partir des résultats obtenus dans le tableau, on peut dire que les produits de départ et les acides aminophosphoniques sont hydrophiles. Les produits de départ présentent le coefficient de partage (Log P) le plus bas (-1.146), vient ensuite les acides aminophosphoniques (oAPac, mAPac et pAPac) (-0.72). Comme on le voit dans (Tableau IV.B1), tous les composés présentent un faible coefficient de partage. Ces composés offrent une bonne solubilité mais une mauvaise absorption et pénétration dans le cerveau, à cause de la faible perméabilité à diffusion passive. En outre, ces molécules tendent à être libérées fortement par le rein, en raison de leur polarité. Ces composés peuvent avoir aussi, une perméabilité para cellulaire si leur poids moléculaire est faible. Abraham et al. [28,29] ont montré que Log P est affecté par plusieurs propriétés structurales fondamentales du composé. Aussi quand le coefficient de partage est assez bas, il a pour conséquence une meilleure tolérance gastrique.

- Les composés synthétisés contiennent Cinq sites donneurs de proton (un OH phénolique et quatre OH phosphoniques) et sept sites accepteurs de proton (7O). D'autre part, le produits de départ ne possèdent que Trois sites donneurs (2H du NH₂ et 1H de OH) mais ne possède qu'un seul site accepteur (1O du OH phénoliques). Cette propriété prend en charge les composés synthétisés, non seulement en les fixant sur le récepteur, mais également l'activité. Il s'agit donc des agonistes. Il a pour conséquence une meilleure répartition dans les tissus. Nombre d'hydrogène accepteurs obligatoires (atomes de O et N) et le nombre de donneurs de liaison hydrogène (NH et OH) dans les composés testés ont été trouvés pour être dans la limite de Lipinski c'est-à-dire moins de 10 et 5 respectivement.
- La solubilité aqueuse d'un composé affecte considérablement les caractéristiques de l'absorption et la distribution. En règle générale, une faible solubilité va de pair avec une mauvaise absorption et donc l'objectif général est d'éviter des composés peu solubles. Les valeurs estimées de la solubilité aqueuse S présentent sous forme de logarithme

(base10) de la solubilité d'un composé mesurée en mol/l. Il y a plus de 80% des médicaments sur le marché ont une Valeur (estimation) de log S plus de -4. Dans le cas du composé de départ, les valeurs de logS sont faibles par rapport aux acides α -aminophosphoniques qui sont plus solubles.

- **Les molécules drogues à faible masse moléculaire (<500) sont facilement transportées, diffuse et absorbées par rapport aux molécules lourdes.** La masse moléculaire de tous les autres composés ont été trouvés pour être inférieur à 500.
- La Surface polaire (TPSA) est étroitement liée au potentiel de liaison hydrogène d'une molécule et est une très bonne prédiction des propriétés de transport de médicament, tels que l'absorption intestinale, la biodisponibilité, la pénétration de sang cerveau barrière etc. TPSA des composés testés a été trouvé dans la gamme de 46.25 à 138.52 et est bien en dessous de la limite de 140 Å².
- Nombre de liaisons rotatives est un paramètre topologique simple qui mesure la flexibilité moléculaire et est considéré comme un bon descripteur de biodisponibilité orale des médicaments. Parmi tous les deux catégories de composés criblés, les acides α -aminophosphoniques sont flexibles (5 liaisons rotatives) et le composé de départ étaient rigides qu'ils ne possèdent pas de liaisons rotatives.

Les scores de bioactivité prédites des composés criblés ainsi que leur comparaison avec de médicament standard sont résumés dans le [Tableau IV.B2](#).

Tableau IV.B2: Les résultats de scores de bioactivité prédites par Molinspiration.

	GPCRL	ICM	KI	NRL	EI	PI
4AP	-2.90	-2.32	-2.76	-3.05	-2.42	-2.97
pAPac	-0.03	0.64	0.04	0.05	0.61	0.43
3AP	-2.94	-2.35	-2.73	-3.15	-2.47	-3.02
mAPac	-0.05	0.62	0.06	0.01	0.59	0.4
2AP	-3.05	-2.77	-2.87	-3.48	-2.55	-3.16
oAPac	-0.01	0.44	0.03	0.03	0.58	0.36
Streptomycin	0.09	-0.16	-0.17	-0.18	0.38	0.65
Ampicillin	0.04	-0.47	-0.71	-1.61	0.25	0.87
Fluconazole	-0.04	0.01	-0.09	-0.23	0.03	-0.09

[b] GPCRL: GPCR ligand; ICM: Ion Channel Modulator; KI: Kinase Inhibitor; NRL: Nuclear Receptor Ligand; EI: Enzyme inhibitor, PI: Protease inhibitor

En règle générale, plus la valeur du score de la bioactivité est élevée (positive), plus la probabilité qu'un composé sera actif est élevée. Par conséquent, une molécule ayant le **score à la bioactivité** plus de 0,00 est le plus susceptible de posséder des activités

biologiques considérables, tandis que les valeurs -0.50 à 0.00 sont devrait être modérément active et si le score est inférieur à -0,50 il est présumé être inactif [30].

Les résultats de la présente étude a démontré que les composés étudiés sont des molécules biologiquement actives et produiront physiologique action en interagissant avec des ligands GPCR, des ligands de récepteurs nucléaires, et inhiber la protéase et d'autres enzymes.

- Le score à la bioactivité de ligand GPCR des acides aminophosphonique était entre 0.00 et -0.50 suggérer leur interaction modérée avec cet objectif. Alors que tous les produits de départ ont un score inférieur à 0.5, ils sont donc inactifs.
- Le score à la bioactivité pour l'activité de modulateur du canal ionique se trouve être > 0,00 pour tous les composés testés, mais le score le plus élevé (>0,60) a été observée pour pAPac et mAPac suivi de près par oAPac (0,44).
- Des résultats similaires sont obtenus pour l'inhibition de la kinase et que le composé pAPac et mAPac qui ont montré score > 0.
- Scores de bioactivité pour le nucléaire ligand de récepteur, inhibiteur de protéase et inhibition de l'enzyme est révélée des valeurs positives, suggèrent nature hautement bioactif de molécules synthétisées alors que les produits de départ présentent des scores très négatifs.
- Les médicaments standards ont des valeurs numériques négatives cohérentes de modulateur des canaux ioniques et l'inhibiteur de kinase. Ce sont donc modérément actif par rapport aux acides α -aminophosphoniques.
- Le composé le plus prometteur a été identifié comme le **pAPac** pour lequel le score à la bioactivité de 0.64, 0.04, 0.05, 0.61, 0.43 a été obtenue pour un ligand de récepteur nucléaire, inhibiteur de protéase et inhibition de l'enzyme et inhibiteur de Protease, respectivement.

IV.B5. Risques de toxicité

Le prédicteur de risque de toxicité (**OSIRIS**) localise les fragments dans une molécule qui indiquent un risque de toxicité potentielle. Les alertes de risque de toxicité sont une indication que la structure dessinée peut être nuisible en ce qui concerne la catégorie de risque spécifique. L'analyse de risques de toxicité pour ces séries théoriques en utilisant un logiciel Osiris ont révélé que les acides aminophosphoniques et les médicaments standards examinés toutes étaient non mutagène, non tumorigènes, non irritant et sans effets sur la reproduction des mammifères (**Tableau IV.B3**). En outre, les

composés de départ ont été évalués en tant que médicaments potentiels par la drogue ressemblance, montrant des risques de toxicité, ils sont mutagène, irritant et avec effets de reproduction.

Tableau IV.B3. Risques de toxicité calculés par Osiris.

	Risque de toxicité			
	MUT	TUMO	IRRI	REP
4AP				
pAPac				
3AP				
mAPac				
2AP				
oAPac				
Streptomycin				
Ampicillin				
Fluconazole				

MUT: Mutagenique; TUMO: Tumorogénique; IRRI: Irritant; REP: Reproductive Effective;
Vert: pas de Risque de toxicité, Rouge: Risque de toxicité, jaune: Modérément toxique

IV.B6. Conclusion

Les composés synthétisés ont été jugés en conformité avec "la règle de cinq de Lipinski". Les calculs de molinspiration rapportés aux composés (oAPac, mAPac, pAPac, 3AP, 4AP et 2AP et les trois médicaments standards) montrent que les acides α -aminophosphoniques pourraient être de bons candidats pour interagir avec les différentes cibles enzymatiques (ligand GPCR, modulateur des canaux ioniques, un inhibiteur de kinase, un ligand récepteur nucléaire, inhibiteur de protéase et inhibiteur d'enzyme), ils ont des caractéristiques mieux que les médicaments standards utilisés. Il peut être conclu que les acides α -aminophosphoniques sont des molécules biologiquement importantes et possèdent des propriétés moléculaires souhaitables pour être *candidat médicament* (antibactériens et antifongiques) à l'exception des valeurs de log P. Par conséquent, certaines modifications structurelles doivent être faites dans le squelette à améliorer leur caractère lypophile.

Références bibliographiques

- [1] R. Paugam, ORSAY, UE CHIM 403, Initiation à la modélisation moléculaire, octobre (2008).
- [2] S. Belaidi; M. Mellaoui, *Organic Chemistry International*. 7(2011).
- [3] R. Borchardt; E. Kerns; C. Lipinski; D. Thakker; B. Wang, *Scientific, educational and communication issues associated with integrating and applying drug-like properties in drug discovery*. 451(2004).
- [4] G. Barcellos, I. Pauli, R. Caceres; M. Timmers, L. Saraiva; R. Dias, J. Azevedo, W. Filgueira, *Current drug targets*. 9 1084(2008).
- [5] P. Ertl, B. Rohde, P. Selzer. *J. Med. Chem.*, 43(20), 3714–3717(2000).
- [6] R. Cecchelli, V. Berezowski, S. Lundquist, M. Culot, M. Renftel, M.P. Dehouck, L. Fenart: Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov*, 6(8), 650–661(2007).
- [7] L. Autin, Paris 5, [http://dx.doi.org/10.1038/nrd2368 (2005)].
- [8] G. Pèpe, G. Guiliani, S. Loustalet, P. Halfon, *European journal of medicinal chemistry*., 37 865(2002).
- [9] A. Carpy, *Analisis*. 27, 3(1999).
- [10] R. Mannhold, G. Poda, C. Ostermann, I. Tetko, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 98 861(2009).
- [11] H. Kubinyi, *Quantitative Structure-Activity Relationships*. 21 348(2002).
- [12] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 23, 3–25 (1997).
- [13] D.F. Veber, S.R. Johnson, H.-Y. Cheng, B.R. Smith, K.W. Ward, K.D. Kopple, Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J. Med. Chem.*, 45, 2615–2623(2002).
- [14] Université de Bratislava..Molinspiration. <http://www.molinspiration.com/>(1986).
- [15] A.M. Alafeefy, S.I. Alqasoumi, A.E. Ashour, V. Masand, N.A. Al-Jaber, T.B. Hadda, M.A. Mohameda, *Eur. J. Med. Chem.*, 53, 133–140(2012).
- [16] P. Ali, J. Meshram, J. Sheikh, V. Tiwari, R. Dongre, T.B. Hadda, *Med. Chem. Res.* (2012),
- [17] D.T. Mahajan, V.H. Masand, K.N. Patil, T.B. Hadda, R.D. Jawarkar, S.D. Thakur, V. Rastija, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 22, 4827–4835(2012).
- [18] Z.H. Chohan, S.H. Sumrra, M.H. Yousoufi, T.B. Hadda. *Eur. J. Med. Chem.*, 45, 2739–2747(2010).
- [19] C.A. Lipinski, Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. *Drug Discov. Today Technol.*, 1, 337–341(2004).
- [20] R. Proudfoot, Drugs, leads, and drug-likeness: An analysis of some recently launched drugs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12, 1647–1650(2012).
- [21] WHO Model List of Essential Medicines, 18th list [archive], avril (2013)
- [22] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, sur <http://monographs.iarc.fr> (2009).
- [23] D. Mølgaard-Nielsen, B. Pasternak, A. Hviid, *J. Med.*, 369:830-839(2013)

- [24] R. Borchardt; E. Kerns; C. Lipinski; D. Thakker; B. Wang, *Scientific, educational and communication issues associated with integrating and applying drug-like properties in drug discovery*. 451(2004).
- [25] E. Kerns, *Academic Press, USA*, 43-47(2008).
- [26] M. Abraham, H. Chadha; R. Leitao, R. Mitchell, W. Lambert, R. Kaliszan, A. Nasal, P. Haber, *Journal of Chromatography A*. 766 35(1997).
- [27] M. Abraham; J. Gola; R. Kumarsingh; J. Cometto; W. Cain, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 74, 103(2000).
- [28] A. Verma Lead finding from *Phyllanthusdebelis* with hepatoprotectivepotentials. *Asian Pac J Trop Biomed.*:S1735-S1737(2012).

CHAPITRE V

V.A) EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE ET ANTIFONGIQUE DES PRODUITS SYNTHETISES

V.A1. Introduction

De nombreuses recherches ont été consacrées à la préparation et à l'étude des activités biologiques de structures comportant un motif phosphore. C'est pourquoi nous sommes intéressés à ce type de composés et plus particulièrement à l'étude des activités antimicrobiennes des acides α -aminophosphoniques.

V.A2. Evaluation de l'activité antibactérienne

Tous les composés ont été criblés contre des bactéries *Gram-positives* et des bactéries *Gram-négatives* par la méthode de diffusion sur disque et les résultats ont été comparés avec l'Antibiotiques standard (chloramphénicol) qui a été utilisés comme contrôle positif et le DMSO utilisées comme contrôle négatif. La méthode de diffusion sur disque nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien des produits testés vis-à-vis six bactéries. C'est une méthode simple qui donne des résultats efficaces, mais il est difficile d'utiliser cette méthode avec des quantités importantes d'échantillons car le disque est petit et le papier filtre utilisé ne permet pas d'imprégner une grande quantité au risque de déborder l'échantillon étudié (la quantité maximale imprégnée est de 25 à 30 μ l). En réalité, ce test n'est qu'un criblage des activités antimicrobiennes des produits testés, il nous permet de sélectionner pour chaque souche le produit qui a présenté le plus d'activité antimicrobienne. Pour la dissolution des produits à tester, un test préliminaire est effectué pour choisir un solvant approprié (qui ne présente aucun effet sur la croissance normale des souches microbiennes) ce qui a mené au choix du DMSO. On a utilisé des dilutions d'une solution mère de 1g/ml pour préparer les trois concentrations 50, 75 et 100 μ g/ml.

En mesurant les diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne au tour des disques, les résultats de l'activité antibactérienne maximale de pAPac, mAPac, oAPac, 4AP, 3AP et 2AP ainsi que le standard et le DMSO sont indiquées dans les Tableaux V.A1- VA4.

Tableau V.A1: Diamètres des zones d'inhibition (mm) de 4AP, pAPac et le contrôle positif.

		pAPac			Standard
		4AP			(+ Ctrl)
	M.O testés	50 µg/ml	75 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml
Gram-Positive	<i>B. subtilis</i>	16.6±0.4	19.9±0,4	25.6±0,4	32.8±0.0
	R		11.0±0.8	16.3±0.0	
	<i>B.megaterium</i>	15.3±0.7	20.6±0,5	25.6±0.3	34.5±0.9
	R		13.4±0.7	14.1±0.0	
	<i>S.aureus</i>	15.0±0.0	16.3±0,4	24.3±0.4	30.1±0.0
	R		12.7±0.0	16.4±0.7	
	<i>E. aerogenes</i>	15.0±0.0	18.0±0,4	20.0±0.0	29.7±0.8
	R	08.4±0	09.0±0.1	14.0±0.8	
Gram-Négative	<i>E. coli</i>	14.0±0.0	19.9±0,4	25.0±0.0	30.8±0.0
	R		09.4±0.6	14.7±0.0	
	<i>P. aeruginosa</i>	12.3±0.7	17.0±0,2	23.0±0.5	29.5±0.9
	R		12.8±0.5	15.9±0.8	
	<i>S. typhi</i>	11.0±0.0	16.3±0,3	24.0±0.6	28.9±0.0
	R		11.0±0.9	13.2±0.7	
	<i>K. pneumoniae</i>	10.3±0.7	15.0±0,0	22.0±0.0	29.7±0.0
	R		10.3±0.5	15.4±0.7	
	DMSO (Ctrl-)	R	R	R	

Tableau V.A2: Diamètres des zones d'inhibition (mm) de 3AP, mAPac et le contrôle positif.

		Produit mAPac			Standard
		3AP			(+ Ctrl)
	M.O testés	50 µg/ml	75 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml
Gram-Positive	<i>B. subtilis</i>	14.6±0.4	19.8±0,8	32.6±0,4	32.8±0.0
		10.4±0.0	12.6±0.0	20.4±0.5	
	<i>B.megaterium</i>	16.0±0.9	18.6±0,7	29.6±0.3	34.5±0.9
		06.2±0.8	11.4±0.6	19.4±0.6	
	<i>S.aureus</i>	17.0±0.1	22.3±0,1	33.3±0.4	30.1±0.0
	R		11.9±0.8	19.4±0.0	
	<i>E. aerogenes</i>	15.5±0.0	17.6±0,3	25.0±0.0	29.7±0.8
	R		13.4±0.9	16.4±0.1	
Gram-Négative	<i>E. coli</i>	14.0±0.8	17.9±0,5	31.0±0.7	30.8±0.0
		09.0±0.1	11.0±0.7	18.4±0.8	
	<i>P. aeruginosa</i>	12.3±0.0	19.6±0,9	25.0±0.5	29.5±0.9
	R		10.4±0.8	17.4±0.0	
	<i>S. typhi</i>	13.0±0.6	19.3±0,7	29.0±0.0	28.9±0.0
		08.9±0.6	10.1±0.3	15.4±0.9	
	<i>K. pneumoniae</i>	12.3±0.7	22.0±0,0	27.0±0.9	29.7±0.0
	R		11.2±0.1	15.4±0.6	
	DMSO (- Ctrl)	R	R	R	

Tableau. V.A3: Diamètres des zones d'inhibition (mm) de 2AP, oAPac et le contrôle positif.

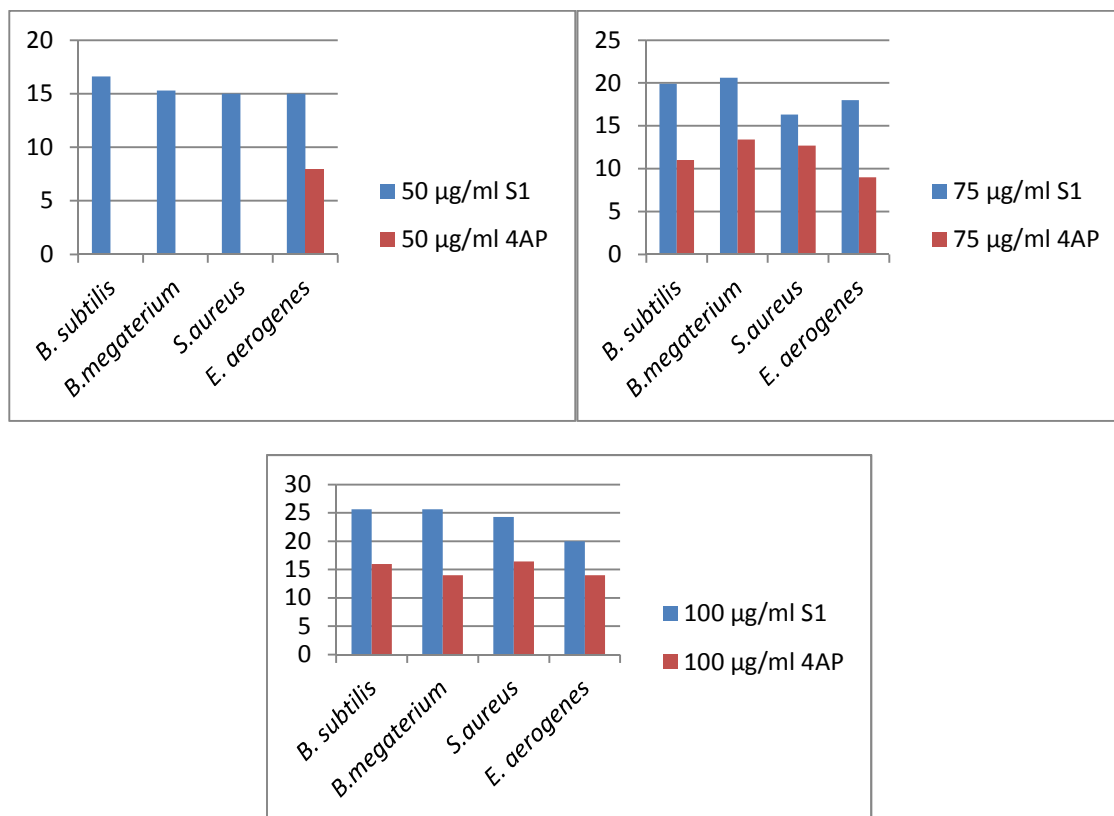
		oAPac			Standard
		2AP			(+ Ctrl)
	M.O testés	50 µg/ml	75 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml
Gram-Positive	<i>B. subtilis</i>	16.9±0.4	22.9±0,4	35.0±0.0	32.8±0.0
	R		12.9±0.2	17.4±0.0	
	<i>B.megaterium</i>	15.1±0.7	21.6±0,0	34.0±0.5	34.5±0.9
	R		13.4±0.6	19.4±0.1	
	<i>S.aureus</i>	17.0±0.0	23.0±0,4	32.6±0.2	30.1±0.0
	R		11.5±0.6	18.4±0.4	
	<i>E. aerogenes</i>	14.0±0.9	18.0±0,4	30.0±0.0	29.7±0.8
	R		14.8±0.5	20.4±0.8	
Gram-Négative	<i>E. coli</i>	14.0±0.9	19.9±0,4	34.0±0.0	30.8±0.0
	R		10.4±0.8	21.4±0.6	
	<i>P. aeruginosa</i>	13.3±1.2	19.6±0,5	30.3±0.8	29.5±0.9
	R		11.2±0.0	22.4±0.1	
	<i>S. typhi</i>	11.0±0.4	19.3±0,4	32.7±0.6	28.9±0.0
	R		10.4±0.3	19.0±0.8	
	<i>K. pneumoniae</i>	11.3±0.7	23.0±0,4	33.6±0.9	29.7±0.0
	R		11.9±0.7	22.7±0.0	
	DMSO (- Ctrl)	R	R	R	R

R : Résistant

A l'aide des résultats mentionnés dans les tableaux V.A1, V.A2 et V.A3, on a pu tracer les histogrammes de comparaison suivants (Fig.V.A1, Fig.V.A2, Fig. V.A3):

- Le premier groupe des histogrammes représente les comparaisons des zones d'inhibition : **produits synthétisés-produits de départ**, à différentes concentrations contre les *Gram-* et *Gram+*.

(a) Gram +



(b) Gram –

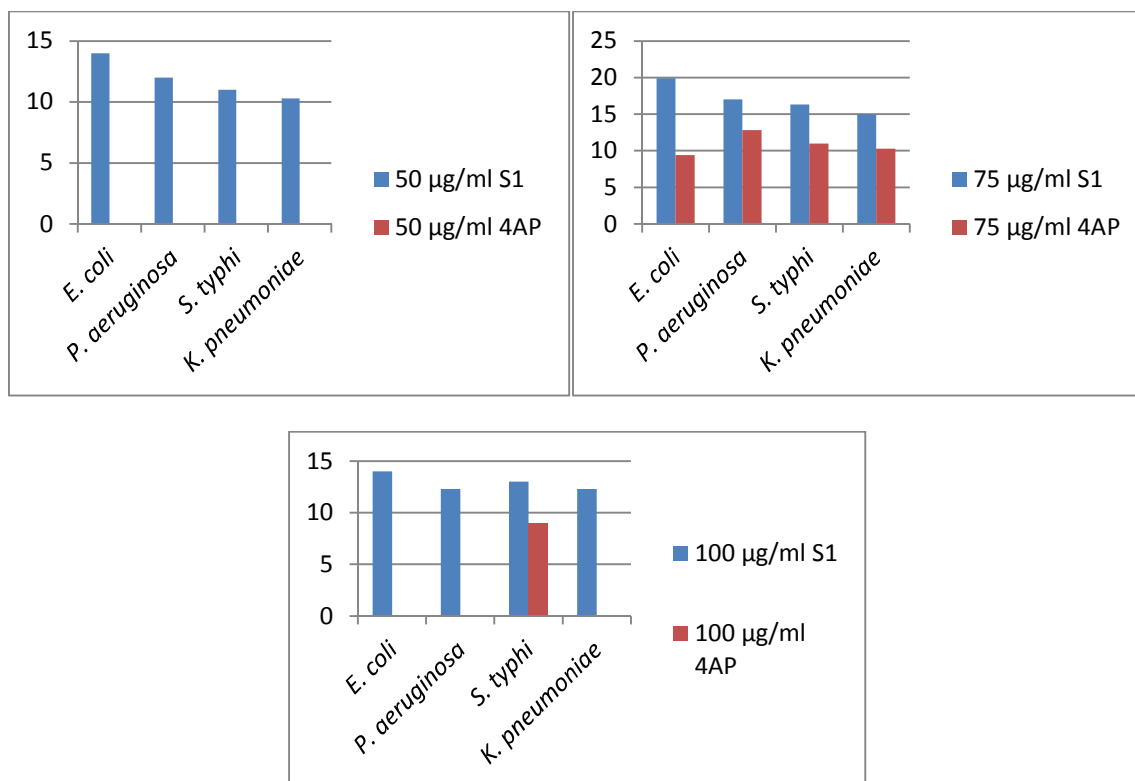
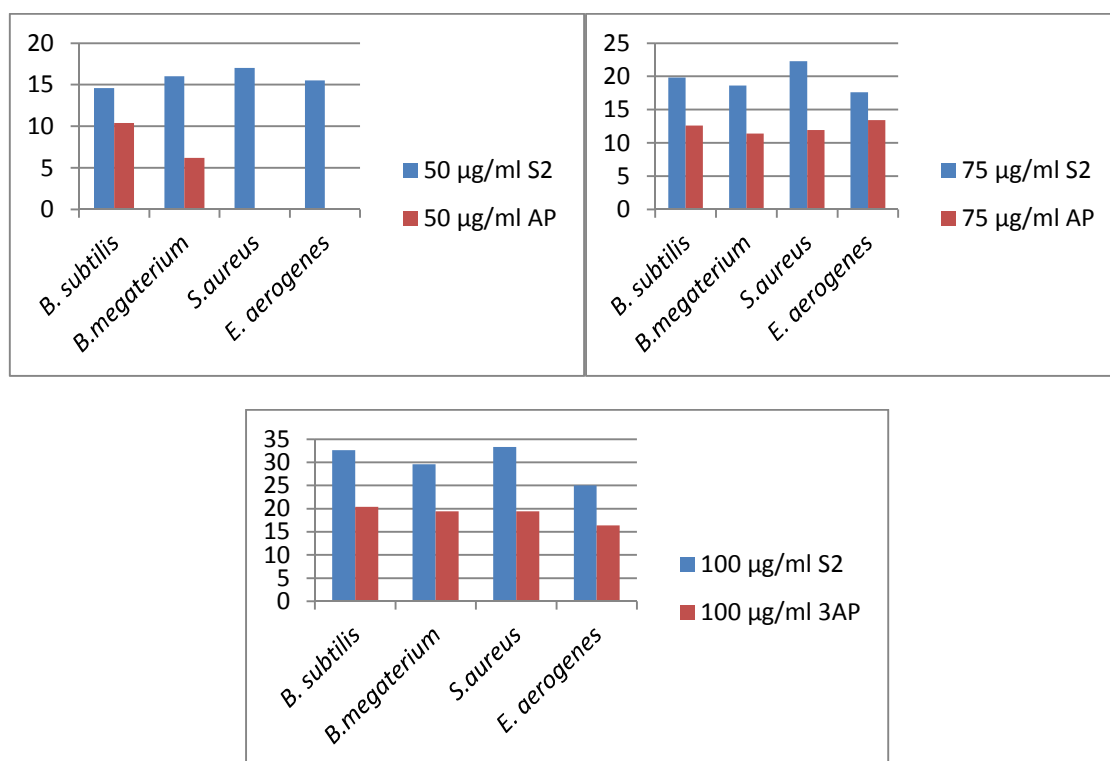


Fig.V.A1: Histogrammes de comparaison des zones d'inhibition entre le 4AP et S1 (pAPac).

(a) Gram +



(b) Gram-

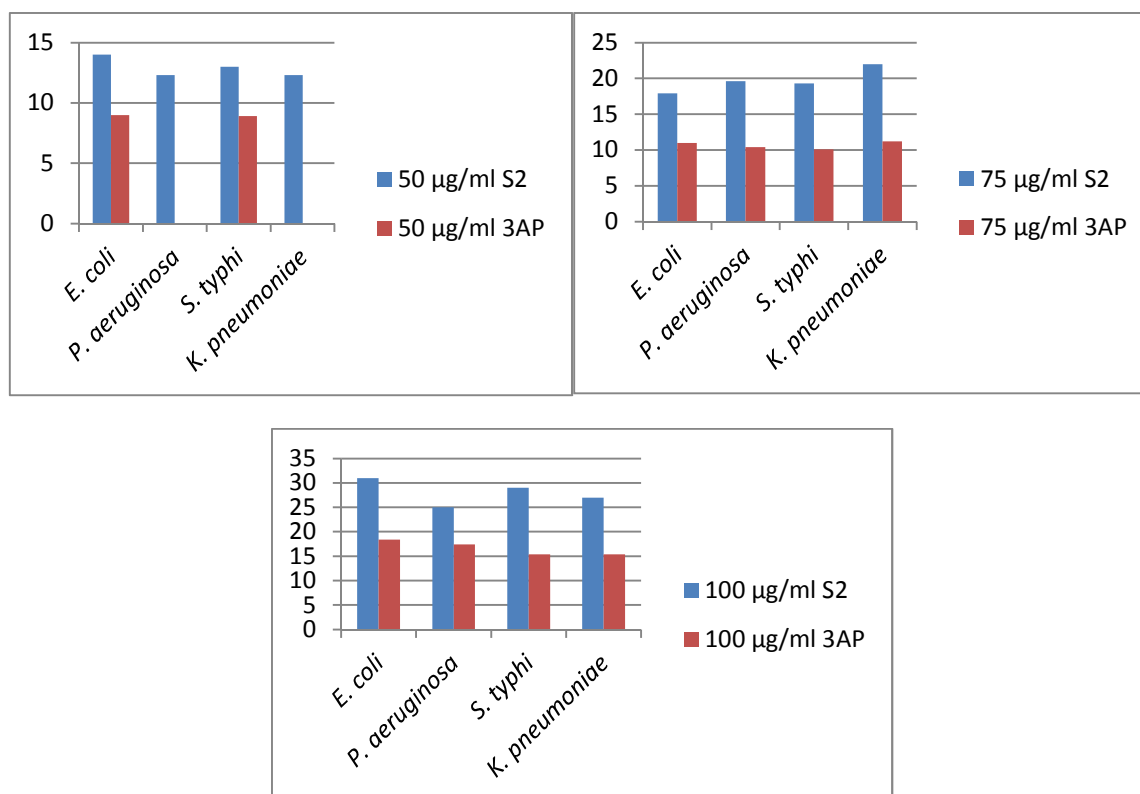
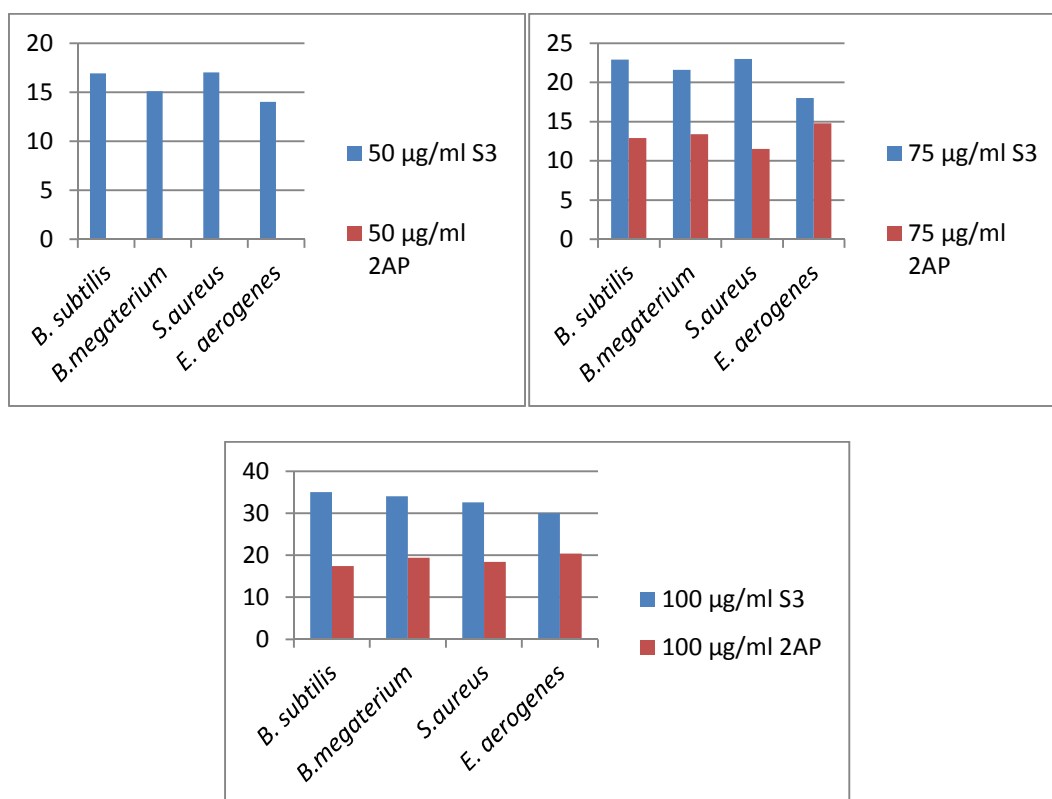


Fig.V.A2: Histogrammes de comparaison des zones d'inhibition entre le 3AP et le S2 (mAPac).

(a) Gram +



(b) Gram -

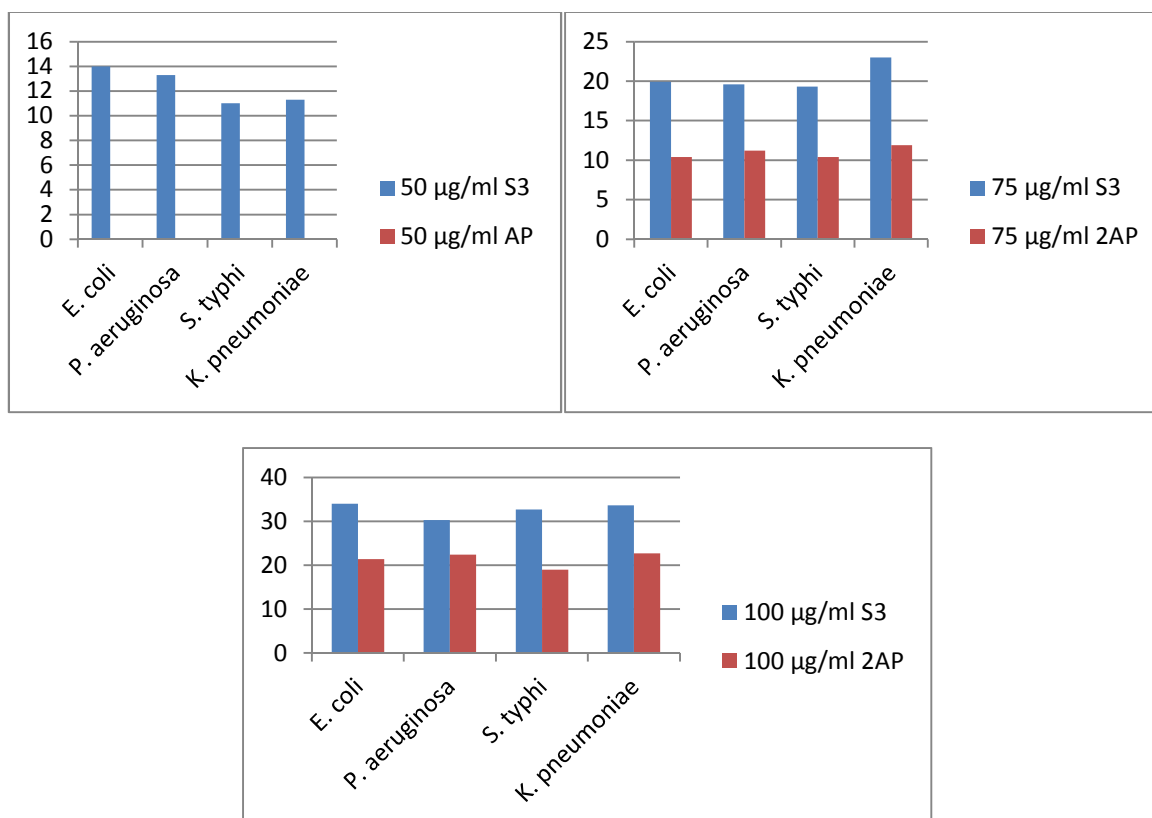


Fig.V.A3: Histogrammes de comparaison des zones d'inhibition entre le 2AP et le S3 (oAPac).

- Dans le deuxième groupe sont représentés les histogrammes de comparaisons des zones d'inhibition : **des produits synthétisés entre eux et le standard positif**, à différentes concentrations.

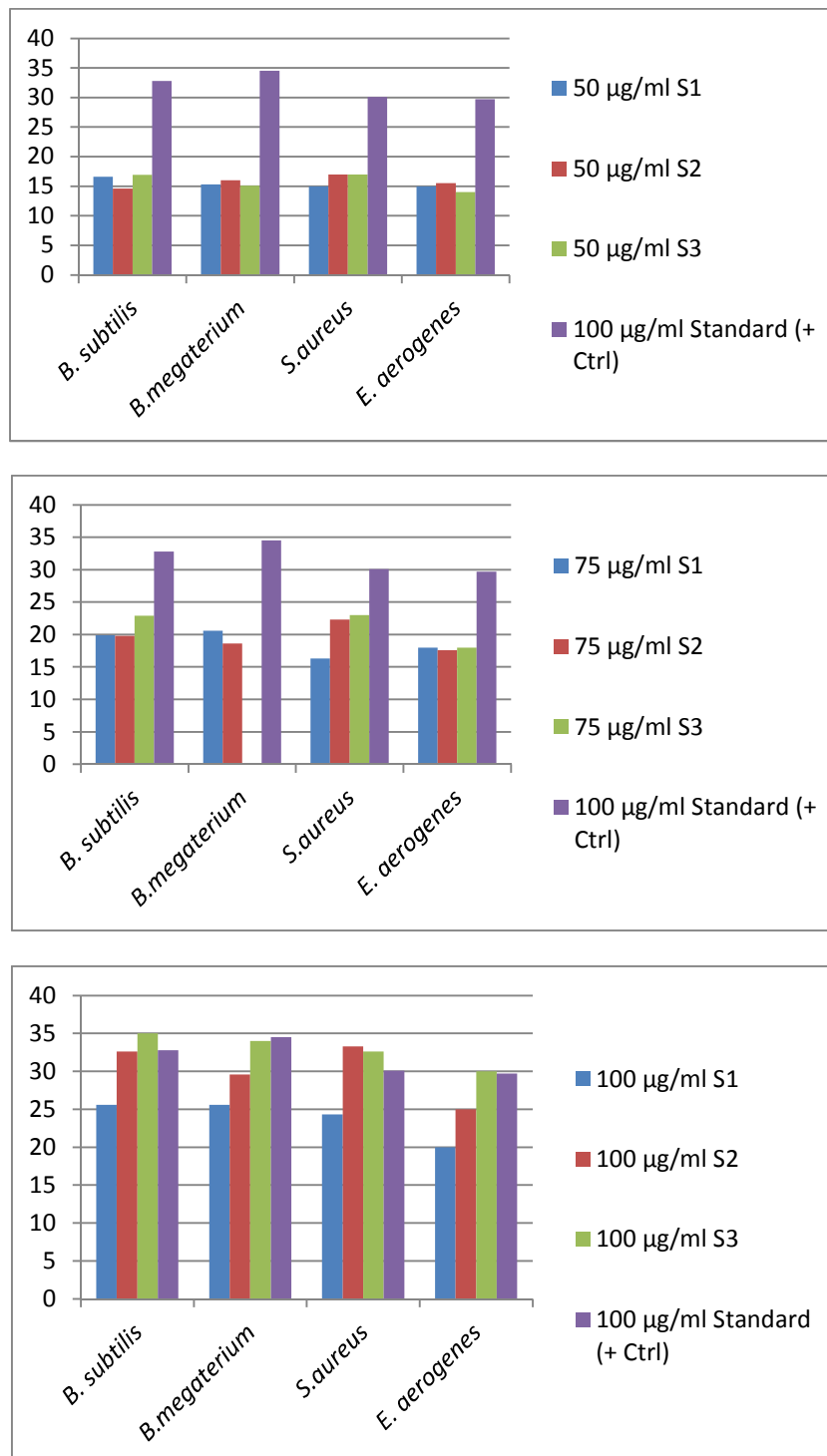


Fig.V.A4: Comparaison des pouvoirs inhibiteurs (contres bactéries G+), à différentes concentrations, entre Antibiotique standard/produits synthétisés S1 (pAPac), S2 (mAPac), S3 (oAPac).

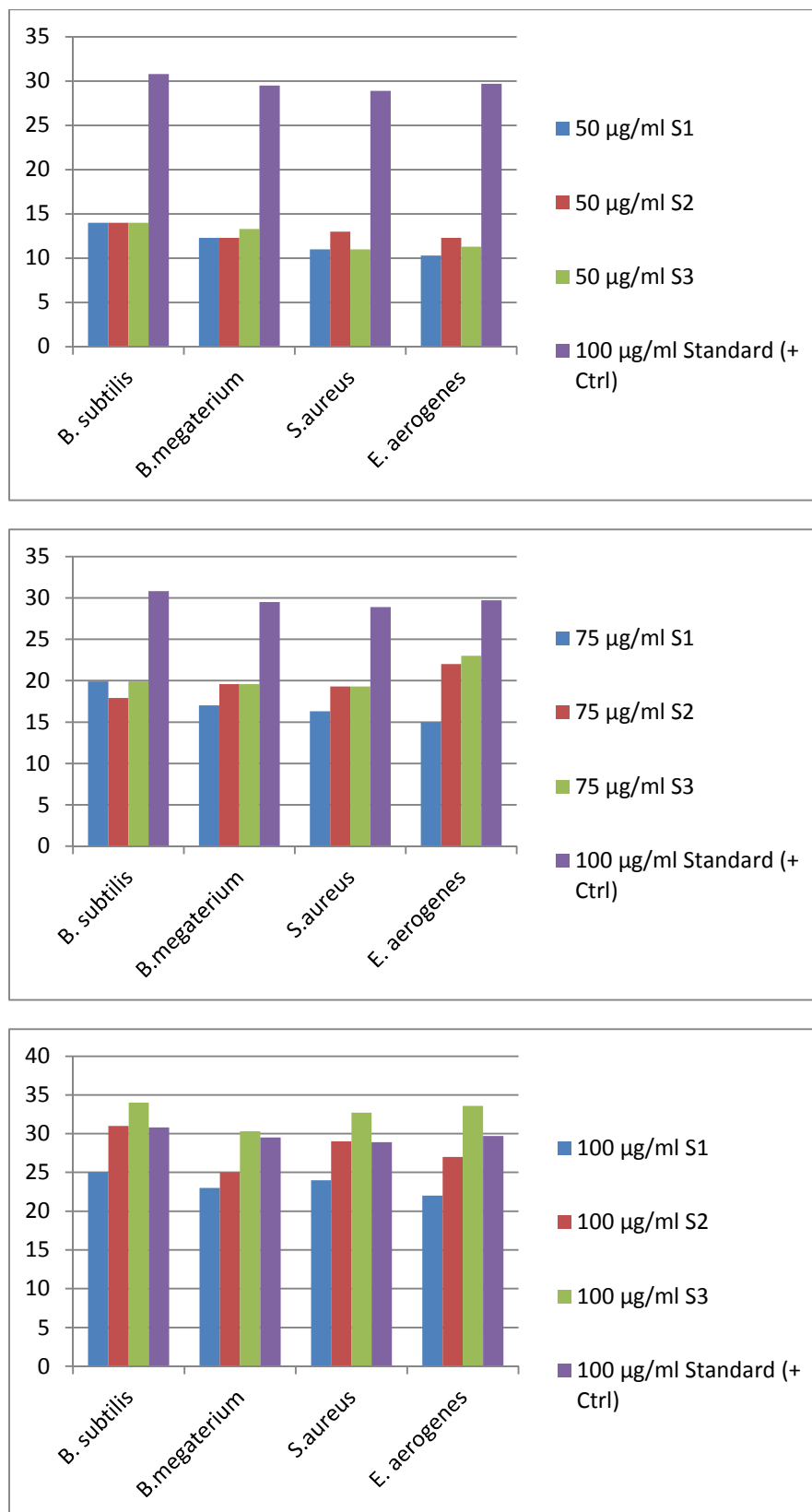


Fig.V.A5: Comparaison des pouvoirs inhibiteurs (contres bactéries G-), à différentes concentrations, entre Antibiotique standard/produits synthétisés S1 (pAPac), S2 (mAPac), S3 (oAPac).

D'après les **tableaux** et les **figures** ci-dessus, nous constatons facilement que :

- Le DMSO n'a eu aucun effet sur les bactéries dans les concentrations étudiées. Alors que tous les autres composés ont montré une activité inhibitrice.
- Une mauvaise activité a été démontrée par les produits de départ (2AP, 4AP, 3AP) contre les bactéries *Gram-positif* et les bactéries *Gram-négatif* par rapport au Chloramphénicol et les composés synthétisés (oAPac, mAPac et pAPac).
- Les composés synthétisés présentent l'activité antibactérienne la plus forte que les produits de départ.
- L'activité la plus élevée (d'un diamètre de zone d'inhibition > 27 mm) a été mise en évidence par tous les composés contre toutes les bactéries testées à haute concentration (100 µg/ml), tandis que l'activité la plus faible (diamètre de zone d'inhibition < 16 mm) a été démontrée par les produits à faible concentration (50 µg/ml) contre des bactéries *Gram-négatives*.
- D'autre part, les composés oAPac, pAPac et mAPac présentent une meilleure activité par rapport à celle de chloramphénicol contre tous les souches bactériennes étudiées.
- En outre, les résultats ont montré que ces acides α -aminophosphoniques présentent une meilleure activité inhibitrice contre les *Gram positifs* que les *Gram négatifs*.

Cette variabilité des résultats de l'activité biologique des produits synthétisés peut dépendre de ces structures chimiques, ces propriétés physicochimiques et les caractéristiques des membranes plasmiques des bactéries.

Le fait que chacun des produits testés démontrait une activité antibactérienne contre les souches étudiées suggère que ces microorganismes avec peu de défense contre les produits testés. Cependant, ces résultats sont en accord avec le fait que les bactéries *Gram-positives*, telles que *S. aureus*, sont généralement plus sensibles aux antibiotiques en comparaison aux bactéries *Gram-négatives* [1]. Cette sensibilité est généralement liée à la structure de la paroi cellulaire. La paroi des bactéries *Gram-positives* est organisée de telle sorte qu'elle offre moins de protection contre les corps étrangers, ces bactéries sont donc plus vulnérables à la destruction.

Plusieurs mécanismes d'action peuvent être proposés :

- La bonne activité des composés synthétisés peut être aussi attribuée à la présence de groupes aminophosphoniques pharmacologiquement actifs attachés à un groupement phényle. Lorsque les groupements méthylène phosphoniques ont été remplacé par de

l'hydrogène (produits de départ), une forte diminution de l'activité contre la plupart des souches a été observée.

- Du fait que la principale cible de ces composés est la membrane bactérienne, l'activité antibactérienne peut être expliquée par la lyse de ces membranes. Ces composés pourraient induire une fuite d'ions potassium, par exemple, au niveau de la membrane et par conséquent des lésions irréversibles au niveau de cette membrane. Cette perméabilité au potassium est un effet précurseur de leur mort [2].
- Les molécules synthétisées sont des composés hydrophiles (voir chapitre IV-B). Les molécules hydrophiles, comme les β -lactamines, inhibent la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne en se fixant de façon covalente sur certaines enzymes responsables de la transpeptidation, étape essentielle de la synthèse du peptidoglycane, les empêchant ainsi d'assurer leurs fonctions [3]. Ces enzymes sont situées sur la face externe de la membrane interne et sont nommées protéines liant les pénicillines ou PLP [4]. Les PLP sont présentes en quantité variable (de 3 à plus de 8) selon les espèces bactériennes et présentent des affinités différentes pour chaque famille de β -lactamines [5].
- D'autres substances hydrophiles, Les aminosides par exemple, perturbent la synthèse des protéines au niveau de la fraction 30S du ribosome entraînant la destruction bactérienne [6]. Ils se fixent sur les ribosomes et perturbent à leur niveau, la traduction des ARN, par une altération conformationnelle. Il s'ensuit des erreurs de réception des messages et l'incorporation d'acides aminés différents avec formation de protéines défectueuses d'où l'effet bactériostatique [7].
- Pour quelques antibiotiques hydrophiles, tels que le cas des **quinolones**, après avoir la pénétration à l'intérieure des cellules bactériennes par des protéines de perméabilité spécifique, ces molécules hydrophiles inhibent les topoisomérases de type II (ADN gyrase) et IV empêchant leur action dans le déroulement harmonieux de l'ADN qui est nécessaire à sa réplication [8]. Ces molécules interagissent avec ce complexe ADN-ADN gyrase en formant un complexe ternaire ADN-ADN gyrase-quinolone. Elles bloquent le changement conformationnel de l'enzyme. Ainsi, l'ADN serait stabilisé au moment de la coupure et ne pourrait être religaturé [9].

V.A3. Paramètres de l'activité antibactérienne

La détermination des paramètres d'inhibition (CMI et CMB) nous a permis de confirmer, quantifier et comparer les activités. Les CMI et MBC de ces composés contre les bactéries pathogènes sont présentés dans le [tableau V.A4](#).

Les valeurs de CMI concordent d'une manière générale avec celles des diamètres d'inhibition. Les produits ayant induit une importante zone d'inhibition présentent les plus petites CMI sur les souches correspondantes.

Pour les composés synthétisés, les valeurs des CMI se situaient entre 8 et 32 µg /ml contre *Gram-positives* et *Gram-négatives*, et les MBC, entre 32 et 256 µg/ml. En règle générale, les valeurs MBC sont généralement plus élevées que ceux du MIC, suggérant une meilleure inhibition et l'activité est considérée comme *bactéricide*.

L'exception a été observée avec les composés de départ contre toutes les souches testées. Le 2AP, 3AP et 4AP présentent de hautes valeurs de MIC et MBC par rapport aux produits synthétisés. Ces composés ont montré une activité modérée à faible contre les bactéries *Gram-positives* et *Gram-négatives* (CMI entre 32 et 256 µg/ml et MBC entre 64 et 256 µg/ml).

L'activité antibactérienne de oAPac, mAPac et pAPac contre ces bactéries exprimée en CMI indique que les produits synthétisés sont plus efficaces contre les bactéries *Gram-positives* à une concentration inférieure que celle contre les bactéries *Gram-négatives*. La forte activité antibactérienne de oAPac a été confirmée par les plus faibles valeurs de MIC et MBC (8-16 µg/ml et de 16 à 128 µg/ml, respectivement), observées contre tous les microorganismes testés. Les valeurs de CMI de pAPac ont été jugées entre 8-32 µg/ml et les valeurs CMB étaient 32-128 µg/ml. D'autre part les valeurs de MIC et MBC de mAPac ont également été trouvés à être entre 8-32 et 64-128 µg/ml, respectivement ([Tableau V.A4](#)).

L'effet bactéricide et bactériostatique des composés testés a été déterminé en utilisant le ratio MBC/MIC. Les substances antimicrobiennes sont considérés comme des agents bactériostatiques lorsque la ration $MBC/MIC > 4$ et agents bactéricides quand la ration $MBC/MIC \leq 4$. Les résultats des effets bactéricide et bactériostatique bactéricide et bactériostatique ont été donnés dans le [Tableau V.A4](#). Dans la présente étude, oAPac, mAPac, pAPac et l'antibiotique standard ont montré le rapport $MBC/MIC \leq 4$, suggérant

que ces composés agissent comme des agents bactéricides sur ces souches. La plupart des produits de départ ont montré un rapport de MBC/MIC plus de 4, qui peuvent être classés comme des agents bactériostatiques.

Tableau V.A4: Concentration Minimale Inhibitrice(CMI) et bactéricide (CMB) de oAPac, mAPac, pAPac, 4AP, 2AP et 3AP.

	pAPac			mAPac			OAPac			Standard		
	4AP			3AP			2AP					
M.O. testés	MIC	MBC	MBC/MIC (Effet)	MIC	MBC	MBC/MIC (Effet)	MIC	MBC	MBC/MIC (Effet)	MIC	MBC	MBC/MIC (Effet)
<i>Bacillus subtilis</i>	8	32	4(+)	16	32	2(+)	8	16	2(+)	8	16	2(+)
	16	128	8(-)	32	256	8(-)	32	256	4(+)			
<i>Bacillus megaterium</i>	16	64	4(+)	16	128	4(+)	8	16	2(+)	8	16	2(+)
	32	256	8(+)	32	128	4(+)	16	128	4(+)			
<i>Staphylococcus aureus</i>	32	128	4(+)	16	128	4(+)	8	32	8(-)	16	32	2(+)
	64	256	4(+)	16	256	16(-)	32	64	2(+)			
<i>Enterobacter aerogenes</i>	16	32	2(+)	32	128	4(-)	16	128	8(-)	32	128	4(-)
	32	256	8(-)	64	256	4(+)	64	128	4(+)			
<i>Escherichia coli</i>	16	32	2(+)	32	128	4(+)	8	32	4(+)	16	32	2(+)
	64	128	2(+)	128	256	2(+)	64	256	4(+)			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32	128	4(+)	16	128	4(+)	16	32	2(+)	32	128	4(+)
	64	128	4(+)	32	128	8(-)	32	128	4(+)			
<i>Salmonella typhimurium</i>	32	64	2(+)	32	128	4(+)	16	128	4(+)	16	32	2(+)
	64	256	4(+)	64	256	4(+)	32	64	2(+)			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16	128	4(+)	32	128	4(+)	16	128	4(+)	32	128	4(-)
	32	128	4(+)	64	128	4(+)	32	256	8(-)			

(+):Effet bactéricide,

(-) Effet bactériostatique

V.A.4. Evaluation de l'activité antifongique

Cette partie de notre étude a pour but d'évaluer, dans un premier temps, l'activité antifongique de différents composés synthétisés vis-à-vis de trois souches fongiques par la méthode des disques. Dans un deuxième temps nous avons déterminé les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et fongicides (CMF).

L'activité antifongique des composés a également été déterminée à trois doses différentes (100,200, 400 µg/ml) contre trois souches fongiques pathogènes à savoir *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatus*.

Les résultats relatifs à l'évaluation de l'activité antifongique (diamètres des zones d'inhibition) des composés sur les souches fongiques sont présentés dans le [tableau V.A5](#).

Tableau V.A5: Diamètre d'inhibition (mm) de oAPac, mAPac, pAPac, 4AP, 2AP, 3AP et le standard « Nystatin ».

M.O.	pAPac 4AP			mAPac 3AP			oAPac 2AP			Standard
	100 µg/ml	200 µg/ml	400 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml	400 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml	400 µg/ml	400 µg/ml
<i>Candida albicans</i>	12.9±0,9 R	17.9±0,4 10.0±0.8	26.6±0,4 12.3±0.0	14.6±0.4 R	19.8±0,8 12.6±0.0	25.6±0,4 15.4±0.5	10.9±0.4 R	20.0±0,4 12.9±0.2	27.0±0.0 16.4±0.0	27.8±0.0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	11.9±0,0 R	16.6±0,5 09.4±0.7	25.6±0.3 10.1±0.0	16.0±0.9 R	18.6±0,7 10.4±0.6	25.6±0.3 13.4±0.6	15.1±0.7 R	19.6±0,0 11.4±0.6	30.0±0.5 17.4±0.1	26.5±0.9
<i>Aspergillus flavus</i>	11.8±0,9 R	14.3±0,4 08.7±0.0	29.3±0.4 11.4±0.7	17.0±0.1 R	22.3±0,1 10.9±0.8	28.3±0.4 13.4±0.0	17.0±0.0 R	20.0±0,4 11.5±0.6	22.6±0.2 16.4±0.4	24.9±0.0

R= Résistance

Pour une comparaison claire et facile et à l'aide des résultats mentionnés dans le [tableau V.A5](#), on a tracé les histogrammes de comparaison suivants :

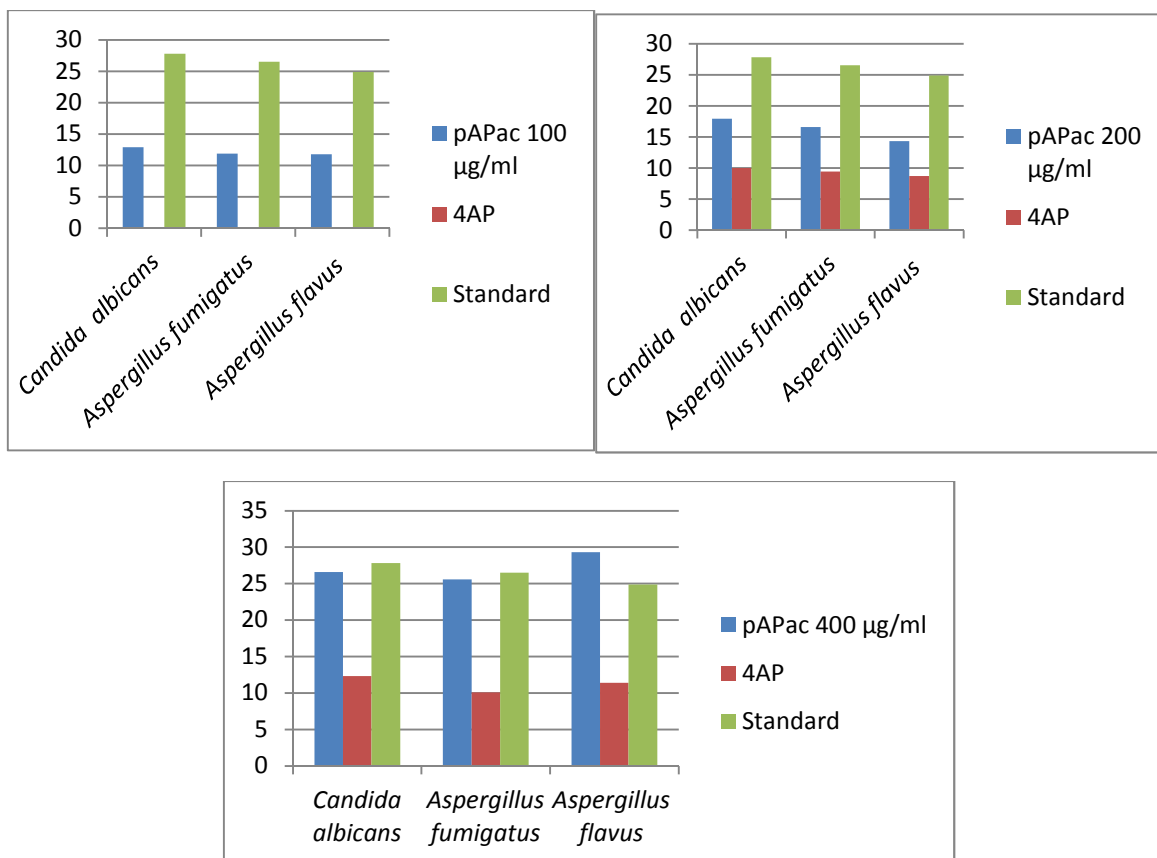


Fig.V.A6: Histogrammes de comparaison des zones d'inhibition de 4AP et pAPac.

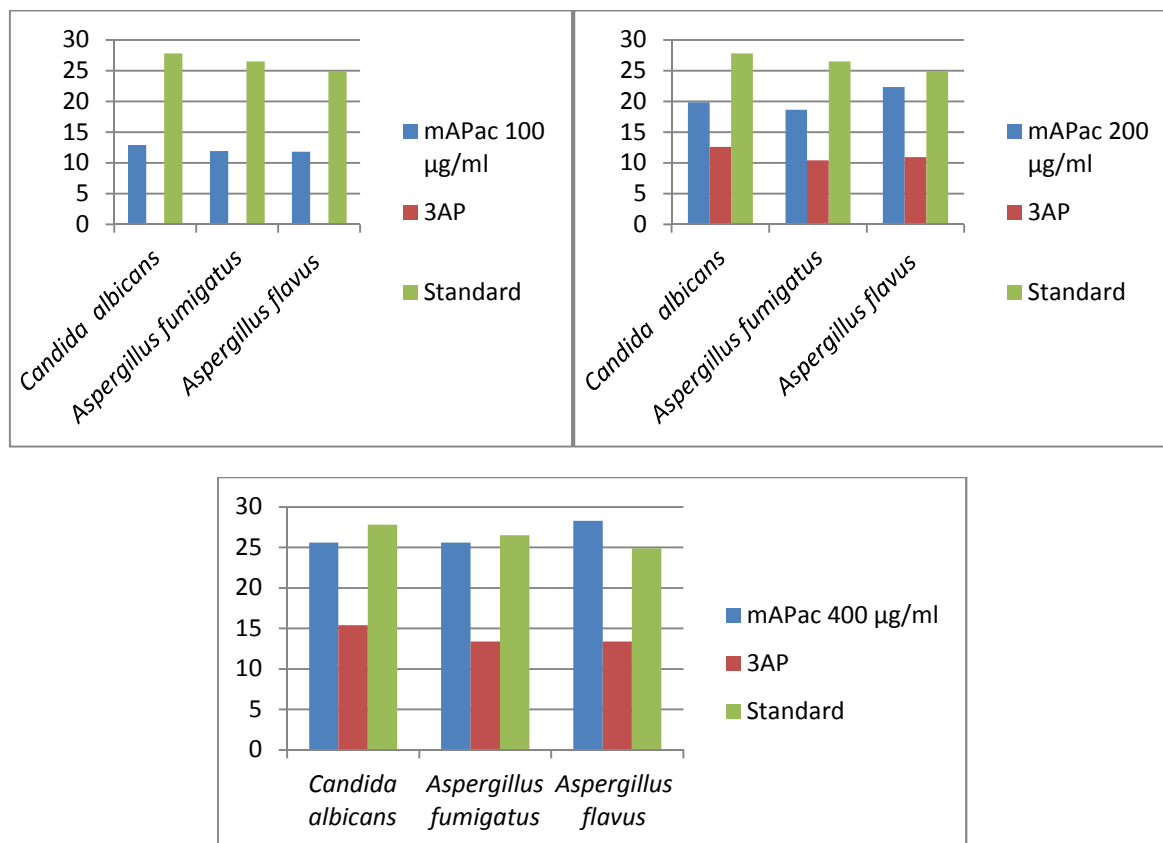


Fig.V.A7: Histogrammes de comparaison des zones d'inhibition de 3AP et mAPac.

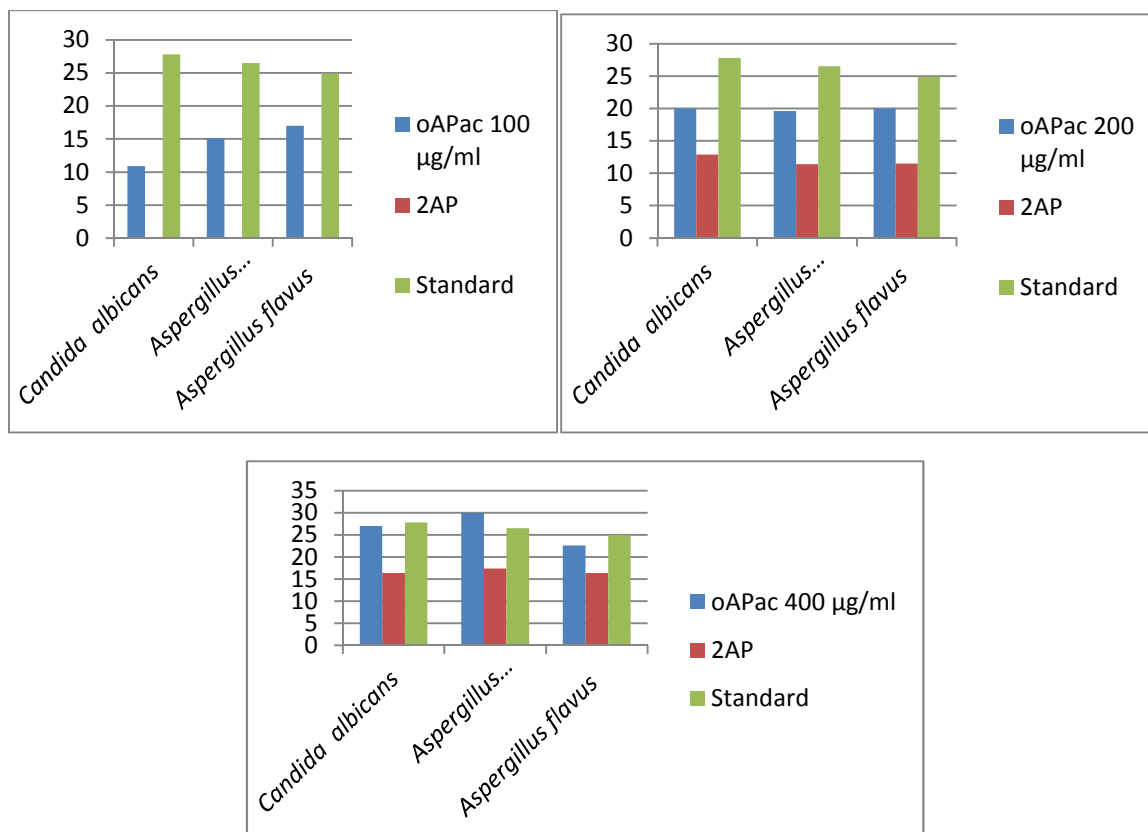


Fig.V.A8: Histogramme de comparaison des zones d'inhibition de 2AP et oAPac.

On constate que les différents composés synthétisés sont actifs sur les trois souches fongiques étudiées. Nous remarquons qu'à des doses plus faibles, tous ces microorganismes étaient insensibles aux produits de départ mais à doses élevées, les composés ont montré des activités légères à modérées qui sont donnés dans le [tableau V.A5](#) et les figures [V.A6-V.A8](#).

Alors que la croissance des souches a été inhibée pour les produits synthétisés et le maximum d'inhibition est obtenu avec le composé **oAPac** qui a montré une plus forte activité contre *Aspergillus fumigatus* (zone d'inhibition de $30,0 \pm 0,5$ mm à 400 µg/ml) alors que pAPac et mAPac sont efficaces à même étendue contre *Aspergillus flavus* (zone d'inhibition $29 \pm 0,3$ mm à 400 µg/ml) et *Aspergillus fumigatus* (zone d'inhibition de 28 ± 3 mm à 400 µg / ml), respectivement.

A la lumière des résultats obtenus, il est clair que les acides α -aminophosphoniques présentent une activité antifongique significative *vis-à-vis* des champignons testés en engendrant des niveaux d'efficacité très élevés.

V.A.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale fongicide (CMF) :

Les subcultures réalisées suite à l'obtention des CMI, ont permis d'observer les concentrations minimales fongicides (CMF) sur les trois souches fongicides. Le [tableau V.A6](#) regroupe les CMI et CMF des produits testés sur les trois souches fongiques.

La Concentration Minimale Fongicide est souvent égale ou plus élevée à la CMI. Il est à noter qu'il faut au moins le double de la CMI pour obtenir l'effet fongicide sur les levures étudiées. Nous observons que les produits de départ sont moins actifs que les produits synthétisés et que oAPac est le plus actif vis-à-vis des souches testées suivi de pAPac et mAPac, respectivement. En effet, lorsque le rapport CMF/CMI est inférieur ou égale à 4, le produit testé est fongicide. Quand ce rapport est supérieur à 4, le produit est dite fongistatique. Le [tableau V.A6](#) présente les différents rapports :

Tableau V.A6: Concentrations minimales inhibitrice (CMI), Concentrations minimales fongicide (CMF) et rapport CMF/CMI des oAPac, mAPac, pAPac, 2AP, 3AP et 4AP.

M.O. testés	<i>pAPac</i> 4AP			<i>mAPac</i> 3AP			<i>oAPac</i> 2AP			Standard			
	MIC	CMF	CMF/ CMI	MIC	CMF	CMF/ CMI	MIC	CMF	R	MIC	CMF	CMF/ CMI	CMF/ CMI
<i>Candida albicans</i>	8	32	4	16	32	2	8	16	2	16	32		2
	16	128	8	16	128	8	32	128	4				
<i>Aspergillus fumigatus</i>	32	64	2	16	32	2	8	16	2	8	32		4
	64	256	4	32	256	8	16	128	8				
<i>Aspergillus flavus</i>	32	64	2	64	64	1	8	8	1	16	32		2
	64	256	4	32	256	8	16	128	8				

L'analyse des résultats relatifs à la croissance des souches fongiques soumis à l'action de différentes concentrations des produits de départ et produits synthétisés permet de constater que :

- Les acides α -aminophosphoniques sont fortement actifs que les produits de départ.
- Ces acides exercent des effets fongicides contre les souches testées (CMF/CMI<4).

- Les produits de départs 2AP, 3AP et 4AP présentent de hautes valeurs de MIC et CMF par rapport aux produits synthétisés. Ces composés ont montré une activité modérée à faible vis-à-vis les souches testées. Ils exercent des effets fongistatiques ($CMF/CMI > 4$).

V.A.6. Activité antimicrobienne des complexes : acides α -aminophosphoniques/ Cu^{2+}

Les complexes de métaux de transition ont été largement étudiés pour leurs propriétés antibactériennes, antifongiques, comme agents chimio-thérapeutiques. Ils ont été évalués contre plusieurs champignons pathogènes et les bactéries avec des résultats très prometteurs.

Le cuivre est un élément essentiel dont les plantes et les animaux ont besoin pour vivre. La littérature scientifique cite l'efficacité du cuivre pour tuer et inactiver plusieurs types de bactéries pathogènes, moisissures. La capacité antibactérienne du cuivre dépend de la température, de la concentration en cuivre et du type de micro-organisme avec lequel il est en contact. Les études actuelles démontrent que l'emploi du cuivre et de ses complexes procure une activité antibactérienne vis-à-vis de micro-organismes pathogènes dans des environnements très variés.

L'une des approches pour l'augmentation de l'efficacité d'une molécule consiste à l'utilisation simultanée d'une substance hydrophile (ligand) et d'un élément inorganique (métal) ce qui améliore remarquablement l'activité antimicrobienne inhérente à un produit résultant de cette combinaison, de sorte que cette activité antimicrobienne satisfaisante peut être obtenue même avec une concentration plus basse de l'agent antimicrobien.

Les complexes sont obtenus comme suit : 1 mmol de chaque ligand est dissout dans 20 ml d'eau distillée. La déprotonation des acides α -aminophosphoniques est assurée par NaOH [10]. Ensuite 2 mmols du sel métallique ($CuCl_2$) solubilisés dans 2 ml d'eau distillé, est ajouté à la solution contenant le ligand déprotoné. Le tout est agité pendant quelques minutes. Le précipité obtenu est ensuite filtré et lavé avec de l'eau plusieurs fois et séché dans l'air. Pour les précipités obtenus sont de coloration bleue avec le cuivre. Le complexe est soluble dans le méthanol, éthanol, DMSO et DMF.

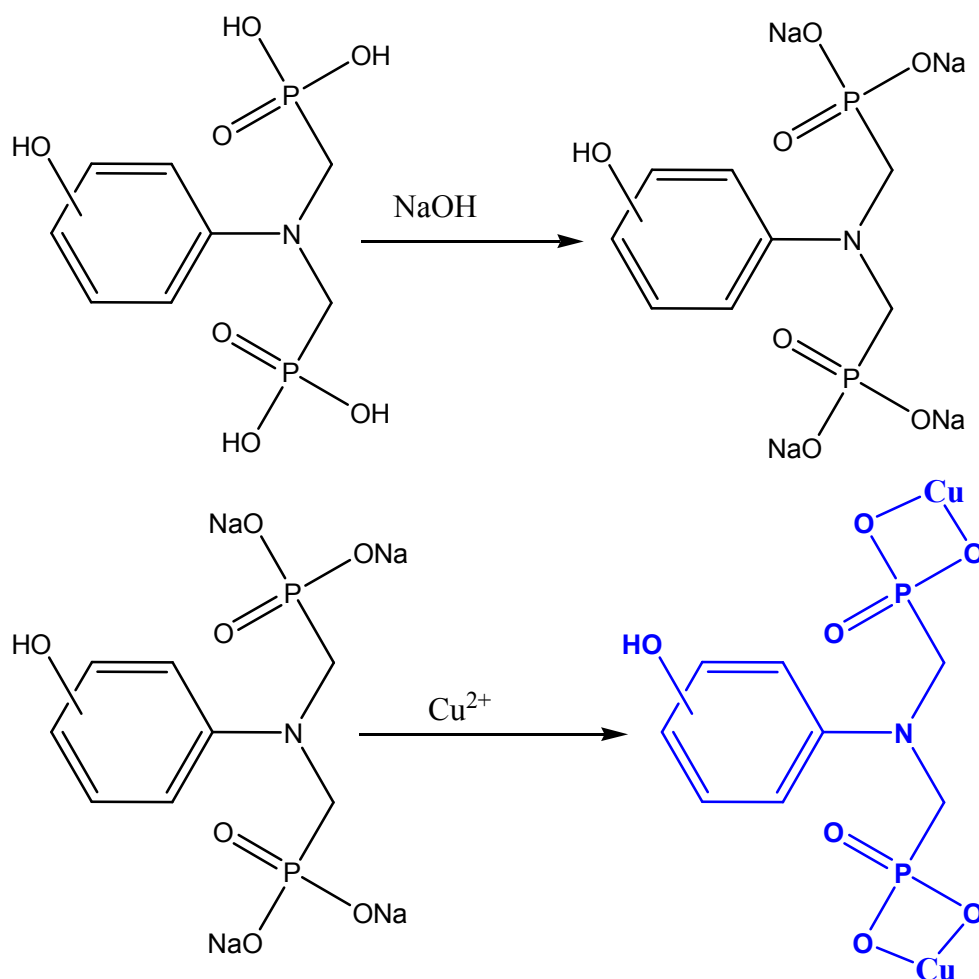


Schéma V.A1: Réactions de synthèse des complexes de cuivre.

L'objectif de la présente étude était de faire entrer un élément minéral sur les acides synthétisés et évaluer les propriétés antifongiques et antibactériennes des complexes de cuivre (II) pour faire une comparaison avec le ligand libre et les standards de référence. Les tests ont été réalisés contre deux souches de bactéries *Gram*⁺ et deux souches *Gram*⁻ pour une concentration de **100 µl/ml** et pour trois souches fongiques à une concentration de **400 µl/ml**. Les résultats de l'activité antimicrobienne des complexes de cuivre contre les genres de bactérie et levures et sont représentés dans les tableaux et les graphes ci-dessous:

- Pour l'activité antibactérienne :

Tableau V.A7: Diamètres des zones d'inhibition (mm) des acides α -aminophosphoniques et leurs complexes de cuivre.

		100 μ l/ml						
	M.O. testés	mAPac	Complexe mAPac-Cu	pAPac	Complexe pAPac-Cu	oAPac	Complexe oAPac-Cu	Standard (+ Ctrl)
⊕	<i>B. subtilis</i>	25.6 $\pm$ 0,4	39 $\pm$ 0,9	32.6 $\pm$ 0,4	40 $\pm$ 0,0	35 $\pm$ 0.0	48 $\pm$ 0,8	32.8 $\pm$ 0.0
	<i>B.megaterium</i>	25.6 $\pm$ 0.3	37 $\pm$ 0,3	29.6 $\pm$ 0.3	39 $\pm$ 0,1	34 $\pm$ 0.5	43 $\pm$ 0,5	34.5 $\pm$ 0.9
⊖	<i>E. coli</i>	25 $\pm$ 0.0	33 $\pm$ 0,2	31 $\pm$ 0.7	37 $\pm$ 0,9	34 $\pm$ 0.0	40 $\pm$ 0,4	30.8 $\pm$ 0.0
	<i>P. aeruginosa</i>	23 $\pm$ 0.5	32 $\pm$ 0,6	25 $\pm$ 0.5	38 $\pm$ 0,4	30.3 $\pm$ 0.8	39 $\pm$ 0,1	29.5 $\pm$ 0.9

A l'aide des résultats mentionnés dans le **tableau V.A7**, on a pu tracer l'histogramme de comparaison suivant (**Fig.V.A9**):

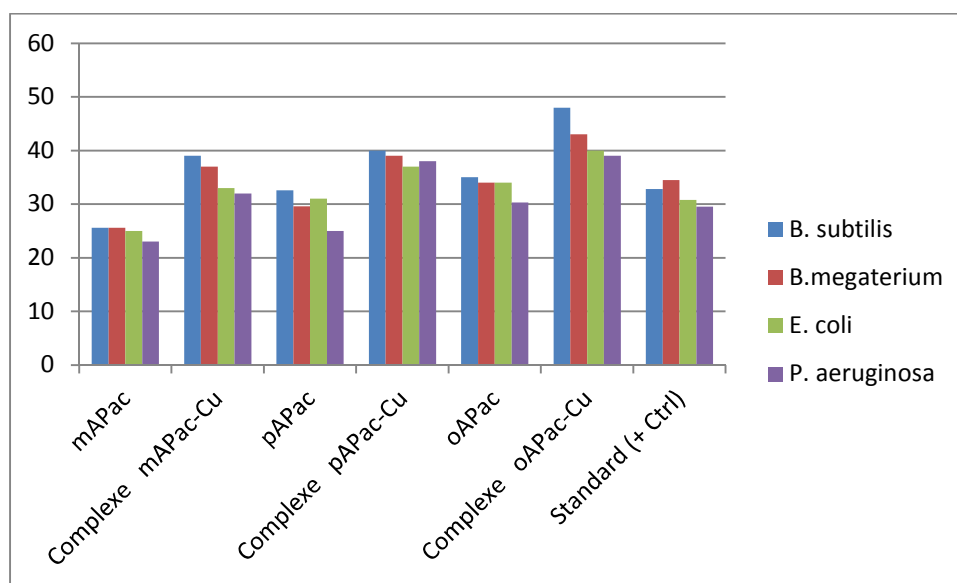


Fig.V.A9: Histogramme de comparaison des zones d'inhibition des acides aminophosphoniques et leurs complexes de cuivre.

- Pour l'activité antifongique :

Tableau V.A8: Diamètres (mm) des zones d'inhibition des acides α -aminophosphoniques et leurs complexes de cuivre.

		400 μ g/ml						
		mAPac	Complexe mAPac-Cu	pAPac	Complexe pAPac-Cu	oAPac	Complexe oAPac-Cu	Standard (+ Ctrl)
<i>Candida albicans</i>		25.6 $\pm$ 0,4	35 $\pm$ 0.9	26.6 $\pm$ 0,4	39 $\pm$ 0,0	27.0 $\pm$ 0.0	49 $\pm$ 0,6	27.8 $\pm$ 0.0
<i>Aspergillus fumigatus</i>		25.6 $\pm$ 0.3	37 $\pm$ 0.8	25.6 $\pm$ 0.3	37 $\pm$ 0,9	30.0 $\pm$ 0.5	44 $\pm$ 0,3	26.5 $\pm$ 0.9
<i>Aspergillus flavus</i>		28.3 $\pm$ 0.4	37 $\pm$ 0,0	29.3 $\pm$ 0.4	34 $\pm$ 0,8	22.6 $\pm$ 0.2	46 $\pm$ 0,6	24.9 $\pm$ 0.0

A l'aide des résultats mentionnés dans le [tableau V.A8](#), on a pu tracer l'histogramme de comparaison suivant ([Fig.V.A10](#)):

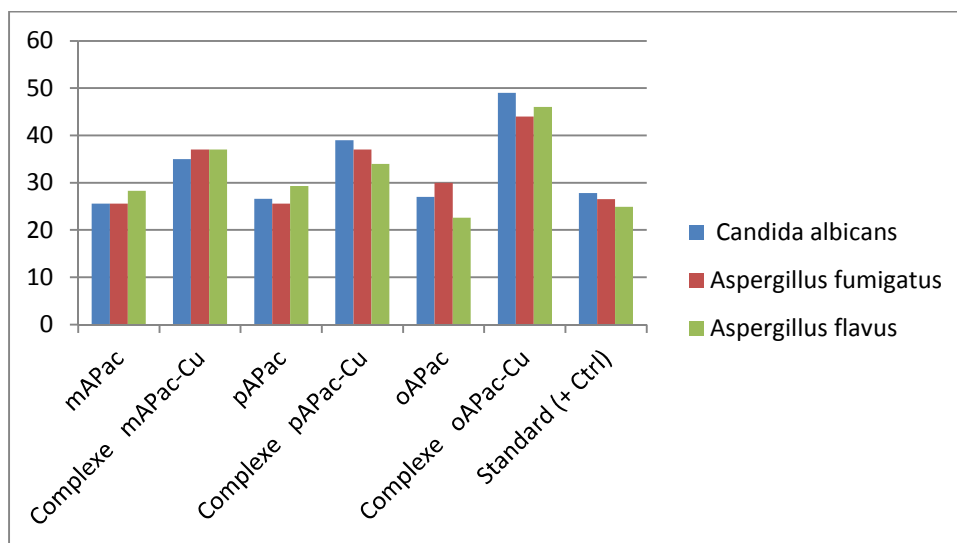


Fig.V.A10 : Histogramme de comparaison des zones d'inhibition des acides α -aminophosphoniques et leurs complexes de cuivre.

Les [tableaux V.A7 et V.A8](#) ainsi que les [Fig.V.A9 et V.A10](#) montrent clairement l'augmentation des diamètres des zones d'inhibition dans le cas des complexes correspondant à une diminution de la résistance des souches testées vis-à-vis les complexes. On observe aussi de larges écarts dans les diamètres des zones d'inhibitions dans le cas des complexes par rapport aux produits synthétisés. Les résultats de cette étude ont montré que l'activité antimicrobienne a augmentée par la complexation des acides α -aminophosphoniques. A la concentration de 100 $\mu\text{g/ml}$, les diamètres d'inhibition pour le complexe **oAPac-Cu** avec les souches bactériennes testées varient de 39 mm à 48 mm avec *S. Subtilis* comme espèce la plus sensible. Alors que les diamètres d'inhibition oAPac seul ne dépassent pas 35mm. D'après le [tableau V.A8](#) et la [figure V.A10](#), nous constatons facilement que l'incorporation de l'élément cuivre permet une amélioration de l'activité antifongique. Donc, on peut dire qu'on a obtenu des produits hautement antibactériens à un coût relativement bas par l'ajout d'un substrat inorganique.

L'explication de cette augmentation d'activité peut être faite, on se basant sur la théorie de chélation [11]. Il est connu que la chélation permet aux ligands libres de jouer un pouvoir puissant comme des agents bactéricides ou fongicides. Il a été rapporté que l'activité antimicrobienne d'un complexe est influencée par sa stabilité. Plus la stabilité du complexe est inférieure, plus l'activité antimicrobienne est grande. Ceci est probablement

parce qu'ils ont plus d'ions libres dans la solution, ce qui peut améliorer l'interaction coopérative entre les ions métalliques et les ligands [12,13]. Cela peut expliquer la différence d'activité antimicrobienne des complexes de cuivre en fonction du type d'acides α -aminophosphoniques. Une autre possibilité est que l'activité des complexes chélatés est liée à la charge positive du métal qui est partiellement partagée avec les atomes donneurs présents dans les ligands et à la délocalisation des électrons π sur l'ensemble du cycle aromatique du chélate [11]. Ceci augmente le caractère lipophile du chélate de métal et favorise la perméation à travers les couches lipoïdiques des membranes bactériennes [14]. En dehors de cela, d'autres facteurs tels que la solubilité, la conductivité et le moment dipolaire (influencé par la présence d'ions métalliques [15], les longueurs de liaison Métal-Ligand peuvent également être les raisons possibles de l'augmentation de cette activité que les ligands seuls.

V.A.7. Conclusion

L'évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique, par la méthode des disques nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien et antifongique de trois acides aminophosphoniques ainsi que les produits de départ correspondant vis-à-vis six souches bactérienne et trois souches fongiques. Ces pouvoirs sont importants pour les produits synthétisés, avec des zones d'inhibition >30 mm. Alors que ces pouvoirs sont relativement faibles pour les produits de départ. L'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne est donné par Mutai *et al.* (2009) [16]. Ils ont classé les diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne en 5 classes:

- **Très fortement inhibitrice:** $D \geq 30$ mm.
- **Fortement inhibitrice:** $21\text{mm} \leq D \leq 29\text{mm}$.
- **Modérément inhibitrice:** $16\text{mm} \leq D \leq 20\text{mm}$.
- **Légèrement inhibitrice:** $11\text{mm} \leq D \leq 16\text{mm}$.
- **Non inhibitrice:** $D < 10\text{mm}$

Selon l'échelle de Mutai *et al.*, on peut classer les produits testés comme suit :

- Les produits oAPac, mAPac, pAPac ont une très fortement inhibitrice sur toute les souches testées (**$D \geq 30\text{mm}$**).
- Les produits de départ présentent une activité modérée.
- L'incorporation d'un métal (Cu) permet d'améliorer considérablement l'activité antimicrobienne.

Références bibliographiques

- [1] P. Cos, A. J. Vlietinck, D.V. Berghe, L. Maes, , *Journal of Ethno pharmacology*, vol. 106, 3, p. 290-302 (2006).
- [2] K. Hayour, Thèse de doctorat, Univ. Fès, p 158 (2002).
- [3] J-D. Cavallo, R. Fabre, F. Jehl, C. Rapp, E. Garrabé. E.M.C. Bêta lactamines. Maladies infectieuses. 1 : 129-202(2004).
- [4] J-L. Fauchère, Avril J-L. Bactériologie générale et médicale. Ed ellipses. pp 280(2002).
- [5] J.F. Fisher, S. O. Meroueh, et al., *Chem Rev* **105**(2): 395-424(2005).
- [6] D. Yala, A-S. Merad, D. Mohameddi, M-N. Ooar Korich. Classification et mode d'action des antibiotiques. Ed Médecine du Maghreb. 91 :1(2001).
- [7] J. Poisson. Glycoaminosides. In Traite de chimie thérapeutique volume 2 : Médicaments antibiotiques. Edition Tec et Doc. Lavoisier(1992).
- [8] P. Nordmann. L'émergence de la résistance aux quinolones chez les entérobactéries. *Pathologie Biologie*. 54 : 7-9(2006).
- [9] M. Audrey, A.Servonnet.. Mécanismes et épidémiologie de la résistance aux fluoroquinolones en 2010. La résistance aux anti-infectieux. *Revue francophone des laboratoires*. 422 : 33-41(2010).
- [10] A. Stanila, A. Marcu, D. Rusu, M. Rusu, L. David, Spectroscopic studies of some copper (II) complexes with amino acids. *J Mol.Struct.* 834:364-368(2007).
- [11] S.K. Sengupta, O.P. Pandey, B.K. Srivastava, V.K. Sharma..*Transit. Metal. Chem.* 23(4):349-353(1998).
- [12] A. Marcu, A. Stanila, O. Cozar, L. David..*J Optoelectron. Adv M.* 10(4):830-833(2008).
- [13] A. Stanila, A. Marcu, D. Rusu, M. Rusu, L.David. *J.Mol. Struct.* 834:364-368(2007).
- [14] S. Chandra, S. Raizada, M. Tyagi, A. Gautam..*Bioinorg.Chem.Appl.* (1): 51483(2007).
- [15] Z. Chohan, S. Mushtaq. *Pak J Pharm Sci* 13(1):21-27(2000).
- [16] C. Mutai, C. Bii, C. Vagias, D. Abatis, V. Roussis, doi : 10.1016/j.jep.02.007(2009).

CHAPITRE V

V.B) EVALUATIONN DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE IN VITRO

V.B1. Introduction

Les antioxydants sont des molécules qui, lorsqu'elles sont présentes à faibles concentrations par rapport aux substrats oxydables, retardent ou stoppent le processus d'oxydation. La capacité antioxydante de molécules peut être évaluée soit de façon *in vivo*, sur des organismes vivants, soit de manière *in vitro*, en utilisant des tests qui miment le phénomène physiologique.

La plupart des méthodes de mesure de l'activité antioxydante sont basées sur l'utilisation de systèmes générant des radicaux très variés. Ce sont principalement des méthodes dites "d'inhibition " dans lesquelles une espèce chimique capable de générer des radicaux libres est utilisée avec une substance capable de détecter ces espèces. L'échantillon dont on souhaite mesurer le pouvoir antioxydant est capable d'inhiber la génération des radicaux. Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation, il n'existe pas de méthode unique qui permettrait de refléter le profil antioxydant d'un échantillon. C'est pourquoi, on effectue différents tests de mesure du pouvoir antioxydant. L'un des objectifs dans ce travail de thèse a consisté à apprécier l'activité antioxydante des composés synthétisés avec trois techniques :

V.B2. L'essai de piégeage du radical DPPH•

Plusieurs méthodes ont été développées pour évaluer l'activité antioxydante des substances synthétiques ou naturelles par le piégeage de radicaux libres en solution dans des solvants polaires comme le méthanol à température ambiante. Parmi les radicaux les plus fréquemment utilisés est le 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•).

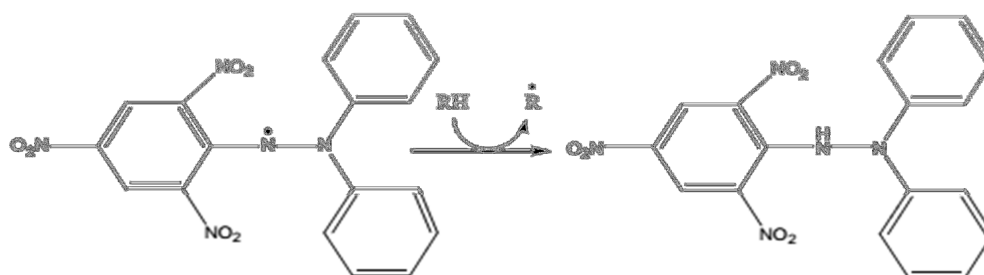


Schéma V.B1: Réaction de réduction du radical libre DPPH•.

Dans cette étude, la méthode par le DPPH est choisie pour évaluer l'activité antioxydante car elle est reconnue comme étant simple, rapide et efficace en raison de la grande stabilité du radical DPPH• [1]. Par des dilutions en cascade des différents composés acides α -aminophosphoniques à tester, ainsi que la substance de référence (acide gallique), nous obtenons une gamme de concentrations. Pour chacune d'elles nous mesurons les densités optiques à 515 nm et, les valeurs obtenues permettent de tracer des courbes à partir desquelles nous pouvons déterminer le % de DPPH restant et la valeur de l'IC₅₀.

L'activité antioxydante est déterminée par la diminution de l'absorbance d'une solution alcoolique de DPPH• à 515 nm, en fonction des concentrations de l'antioxydant ajouté (Fig.V.B1) cette diminution est due à sa réduction à une forme non radicalaire DPPH-H, par les antioxydants (AH) donneurs d'hydrogènes présents dans la molécule ou par une autre espèce radicalaire comme le montre l'équation suivante [2,3]:

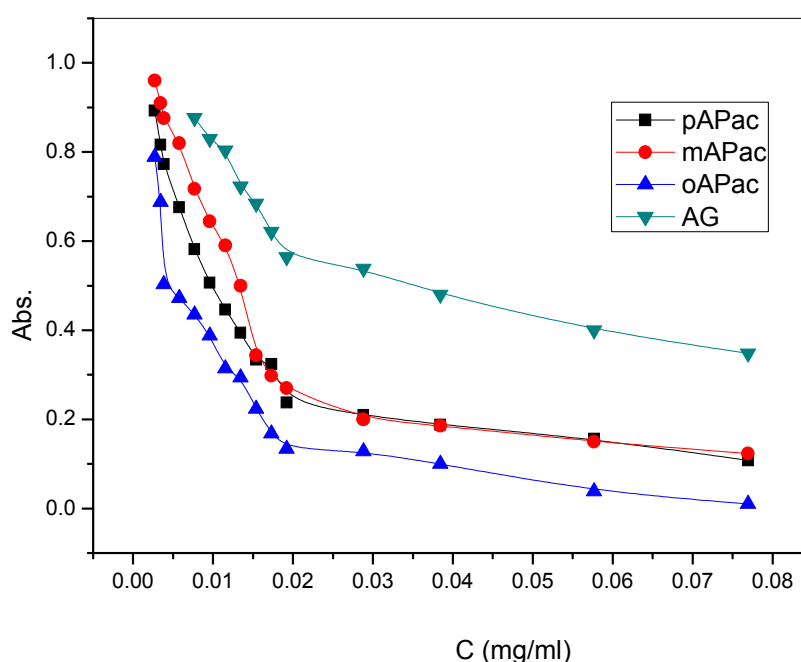


Fig.V.B1: Réduction de l'absorbance du DPPH• en fonction des concentrations des produits testés.

Ces résultats obtenus de l'absorbance en fonction des concentrations, ne nous permettent pas de calculer le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration (IC%) selon :

$$\text{Pourcentage d'inhibition (\%)} = [(A_c - A_t) / A_c] \times 100$$

La figure ci-dessous (Fig.V.B2) rapporte les pourcentages d'inhibition obtenus en fonction des différentes concentrations utilisées d'acides α -aminophosphoniques et en acide gallique. La Fig.V.B2 montre les pourcentages de l'effet de piégeage des acides testés ainsi que celle du l'acide gallique. Tous les échantillons étaient capables de piéger les radicaux libres DPPH[•]. Les résultats de l'activité antioxydante a révélé que les produits testés possèdent une activité anti-radicalaire significative dose-dépendante. Quand la concentration des composés étudiés augmentent dans le milieu réactionnel, le pourcentage d'inhibition augmente proportionnellement jusqu'à arriver à un plateau qui correspond à l'inhibition presque totale du DPPH[•] présent dans ce milieu. L'acide α -aminophosphonique (oAPac) a montré un pouvoir de piégeage du radical DPPH très important avec un pourcentage d'inhibition élevé à de faibles concentrations à la différence des autres produits testés qui présentent des pourcentages d'inhibition moins. Une concentration de **0.11428 mg/ml** des produits testés produit un pourcentage d'inhibition de (**IC_{oAPac} = 99.028 %**), (**IC_{pAPac} = 96.076%**), (**IC_{mAPac} = 93.173%**) et (**IC_{acide gallique} = 92,643%**).

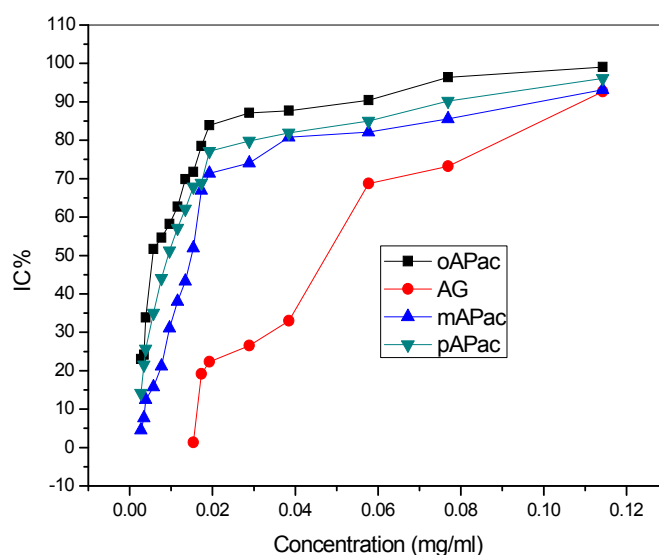


Fig.V.B2. Activité anti-radicalaire en % (IC%) des acides α -aminophosphoniques et de standards acide gallique (Chaque valeur représente la moyenne trois essais $\pm$ sd).

V.B2.1 Détermination des IC_{50}

La capacité antioxydante de nos composés est déterminée à partir des IC_{50} , paramètres couramment utilisés pour mesurer l'activité antioxydante. L' IC_{50} a été défini comme la quantité d'antioxydant nécessaire de diminuer la concentration de radicaux DPPH initiale de 50% (IC_{50}). Une valeur faible d' IC_{50} correspond à une activité antioxydante plus élevée de composé [4].

Tous les IC_{50} sont calculés à partir de la partie linéaire des courbes de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des différents composés à tester avec un coefficient de corrélation supérieur à 0,95 ($R^2 > 0,95$).

Les Fig.V.B3-V.B5 représentent les valeurs des concentrations responsables de 50% de l'activité de piégeage du radical le DPPH $^{\bullet}$ (IC_{50}) des acides α -aminiophosphoniques et de l'acide gallique (Référence ou standard).

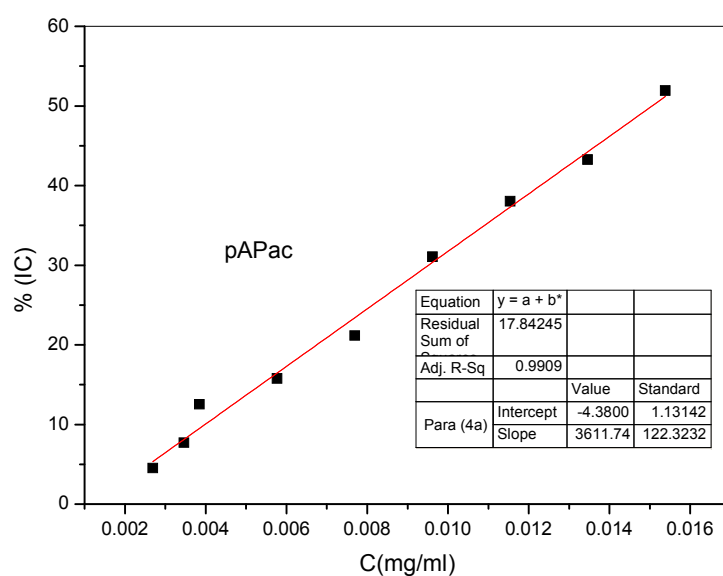


Fig.V.B3: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH $^{\bullet}$ en fonction des différentes concentrations utilisées pour pAPac.

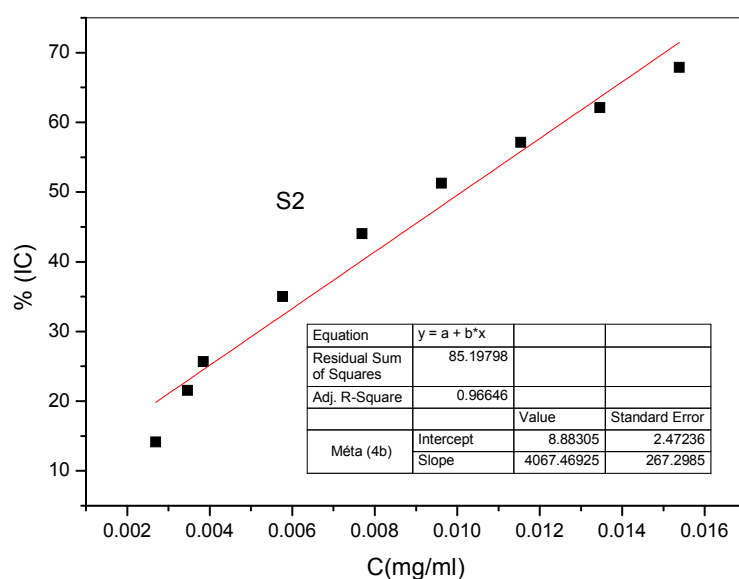


Fig.V.B4: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour **mAPac**.

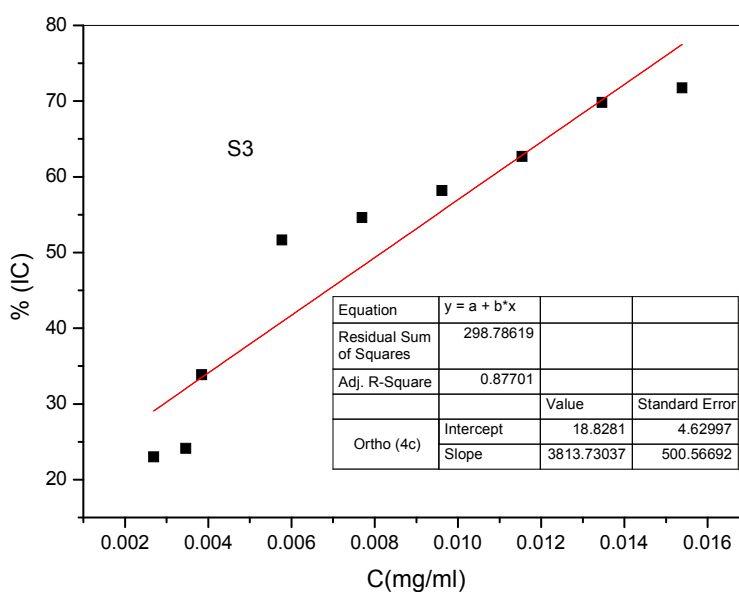
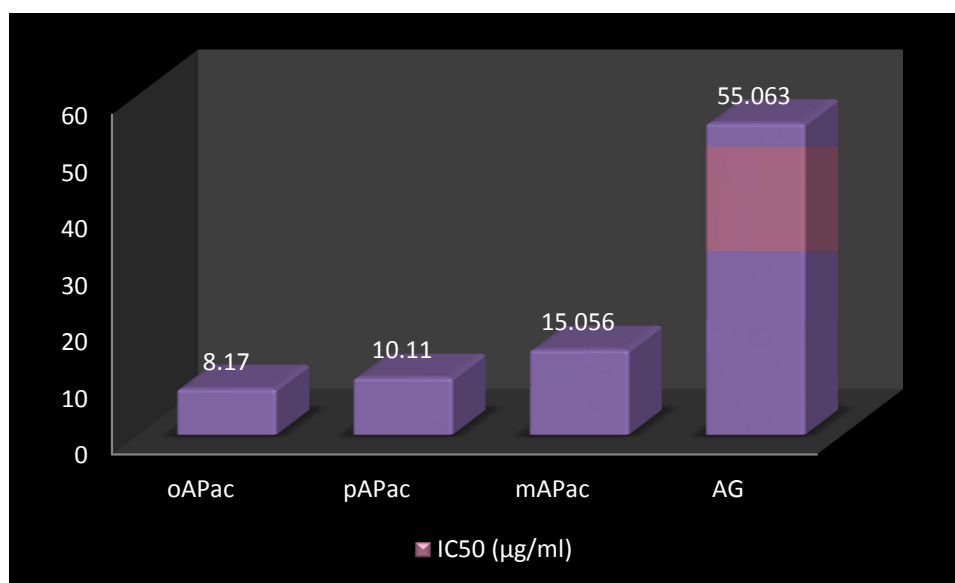


Fig.V.B5: Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour **oAPac**.

Les paramètres des équations de calculs des valeurs des IC_{50} trouvées pour tous les composés testés sont représentés dans le [tableau V.B1](#) et dans la [Fig.V.B6](#) sous forme d'histogrammes de comparaison:

Tableau V.B1: Valeurs des IC₅₀ calculées pour les composés étudiée.

Paramètre	oAPac	pAPac	mAPac	AG
Equation	$y = a + b \cdot x$	$y = a + b \cdot x$	$y = a + b \cdot x$	$y = a + b \cdot x$
R ²	0,97701	0,96646	0,9909	0,90345
a	18,8281	8,88305	-4,38008	1,90562
b	3813,73037	4067,46925	3611,74748	873,43769
IC ₅₀ (μg/ml)	08,17360	10,10873	15,05645	55,06332

**Fig.V.B6:** Histogramme de comparaison des valeurs des concentrations inhibitrices IC₅₀ des différents composés en μg/mL.

De ces résultats, nous pouvons déduire que la réduction de 50% du DPPH a été atteinte pour tous les produits testés.

Pour cette raison, comme le montre le [Tableau V.B1](#), la valeur de IC₅₀ de **oAPac**, **pAPac**, **mAPac** et **l'acide gallique** était $8.173 \pm 0,090 \mu\text{g/ml}$, $10.108 \pm 0,08 \mu\text{g/ml}$, $15.056 \pm 0,09 \mu\text{g/ml}$, $55,063 \pm 0,034 \mu\text{g/ml}$, respectivement. Il apparaît que les trois acides α -aminosphosphoniques présentent l'activité antioxydante la plus élevée que celle du l'acide gallique.

Ceci a révélé la haute capacité de piégeage de DPPH[•] des trois acides α -aminosphosphoniques. D'après l'histogramme illustré dans la [Fig.V.B6](#), nous pouvons classer les composés testés par ordre de réactivité décroissante:



Le tableau suivant illustre les pourcentages d'inhibition atteints à 0,114 mg/ml ainsi que les IC₅₀ de chaque produit.

Tableau V.B2. Activités Scavenging et valeurs d'IC₅₀ de (oAPac, pAPac, mAPac) et les standards AG.

Composés	Activités Scavenging (%) (à 0,114 mg/ml)	Valeur IC ₅₀ (µg/ml)*
oAPac	99.028± 0.43	08,17360± 0.003
pAPac	96.076± 0.48	10,10873± 0.002
mAPac	93.173± 0.60	15,05645± 0.001
Acide Gallique	92,64 ± 0.56	55,06332± 0.001

* (Chaque valeur représente la moyenne trois essais±sd)

V.B2.3 Mécanisme d'action des composés étudiés vis-à-vis le radical DPPH[•] :

Les relations structure-activité suggèrent que le pouvoir antioxydant des composés acides et phénoliques est favorisé par plusieurs caractéristiques structurales. C'est-à-dire que l'activité antioxydante ne dépend pas seulement de la concentration en antioxydant, mais aussi de la structure chimique et l'interaction entre les antioxydants.

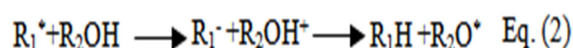
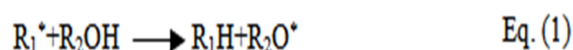
Pour certains composés aromatiques, une structure ortho-hydroxy sur le noyau aromatique est responsable du pouvoir réducteur de la molécule, et ainsi, de son aptitude à réduire les EOR. Par ailleurs, la présence d'un système conjugué sur le noyau, accentue la délocalisation électronique du radical permet sa stabilisation, qui est accentuée par la formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire [5].

Par ailleurs, le nombre de groupements (OH) et leur position ont un impact sur le pouvoir réducteur des substances. Leur pouvoir antioxydant s'accroît généralement avec le nombre d'OH libérant du proton [6].

Dans le cas des acides phénoliques, la présence d'un second OH sur le cycle accroît leur pouvoir antioxydant et la position des groupements hydroxyles joue également un rôle sur l'efficacité: ortho ≥ para > méta [6].

L'activité antioxydante des antioxydants ont été attribués par deux mécanismes principaux [7-9], à savoir:

- (i) Hydrogen Atom Transfer (HAT), (Eq. 1))
- (ii) Single-Electron Transfer (SET), (Eq. 2)).



Dans le mécanisme (1), l'antioxydant (R_2OH) réagit avec le radical libre ($R_1^\bullet$) en transférant un atome d'hydrogène à elle. Le radical $R_2O^\bullet$ est beaucoup moins réactif que le $R_1^\bullet$ radical car elle est généralement stabilisée par plusieurs facteurs tels que les effets de résonance (Schéma V.B2), la conjugaison, et des liaisons hydrogène [9].

- La propriété de piégeage de nos produits peut être due aux groupes hydroxyle phénoliques et aux groupements phosphoniques existant dans la structure chimique qui peuvent fournir le composant nécessaire en tant que piègeur de radicaux et un antioxydant. Ces groupements peuvent être déprotonés et l'anion correspondant peut être stabilisé par conjugaison :

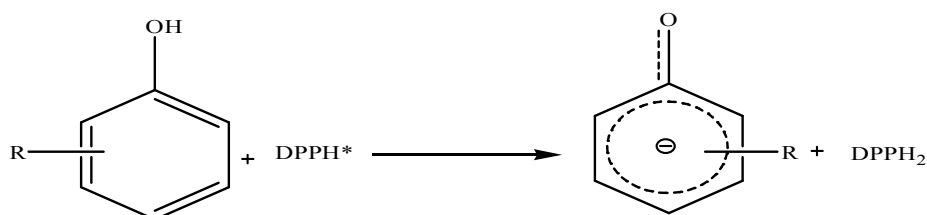


Schéma V.B2: Formation du radical libre Phenolate.

- D'autre part, des groupes phosphoniques (Schéma V.B3) peuvent également neutraliser le radical par donation d'hydrogène et elle devient elle-même un radical phosphonate, le plus souvent, stabilisée par des liaisons hydrogène.

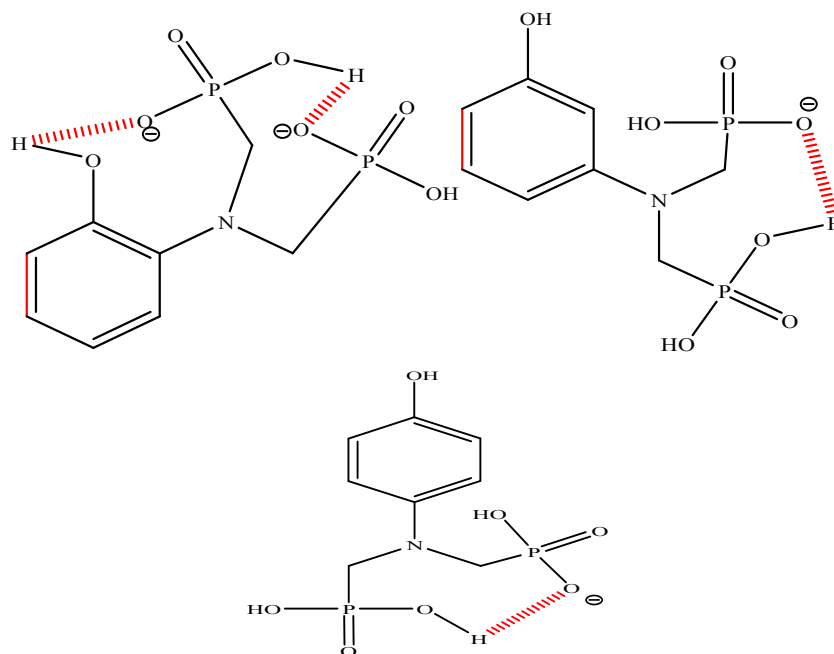


Schéma V.B3: Stabilisation du phosphonate par liaisons hydrogènes

Une liaison hydrogène intramoléculaire entre l'hydrogène phénolique et l'atome de l'oxygène d'un groupement phosphonique à la position *ortho*, stabilise l'état fondamental du phénol à annuler la réduction de la résistance de la liaison O-H, et il y a un changement négligeable dans l'énergie de la dissociation de la liaison (0,2 kcal/ mol) [10].

D'autre part, le radical phosphonate est stabilisé par une liaison hydrogène intramoléculaire entre les deux groupements phosphoniques et entre l'atome d'hydrogène phénolique. L'effet électro-attracteur des substituants tels que (-P(O)-(OH)₂) à la position *para* stabilise la forme phénol d'antioxydants et déstabiliser la forme du radical phénoxy de l'antioxydant, pour augmenter la force O-H et rendre les antioxydants moins efficace [11], pour cette raison, l'activité antioxydante de (**mAPac**) est inférieure à celle (**oAPac**) et (**mAPac**). Cependant, le (**pAPac**) présente une activité antioxydante intermédiaire.

D'autre part, pour le mécanisme SET, le potentiel d'ionisation (PI) est le paramètre important pour l'évaluation de l'activité de piégeage.

Le PI est un critère pris en considération pour l'activité réductrice : c'est le potentiel d'ionisation (PI) d'une molécule à laquelle correspond l'énergie minimale qu'il faut lui fournir pour lui arracher un électron. Plus un composé aromatique est substitué par des groupements donneurs d'électrons, plus son PI est faible et plus son caractère réducteur est élevé. Il peut alors subir une oxydation mono-électronique qui conduit au radical correspondant. **Le potentiel d'ionisation est le facteur déterminant du pouvoir piégeur d'électrons. Un potentiel bas implique un arrachement facile d'électron et en conséquence une réaction avec le radical libre.**

Donc, pour rechercher s'il y a une corrélation entre le potentiel d'ionisation des produits étudiés et l'activité réductive, nous avons utilisés les valeurs de (HOMO) (*Highest Occupied Molecular Orbital*). Ces derniers sont obtenus dans notre laboratoire par application de la méthode DFT:

$$PI = -HOMO$$

Cette relation a été utilisé pour déterminer les valeurs des potentiels d'ionisation des produits étudiés dans ce travail, nous rappelons que les valeurs d'HOMO sont donnés au chapitre IV partie B. Le facteur de conversion est le suivant:

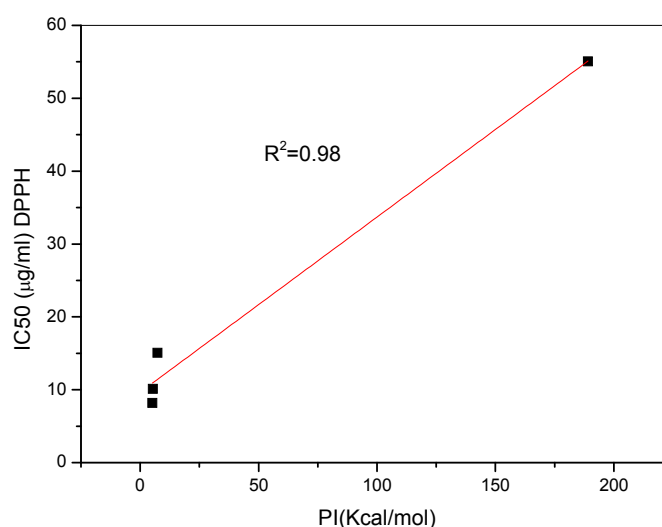
$$1 \text{ ev} = 23.0605 \text{ Kcal/mol}$$

Donc, pour rechercher s'il y a une corrélation entre le potentiel d'ionisation des produits étudiés et la capacité d'inhibition de DPPH[•] nous utilisons les valeurs de PI qui sont regroupés dans le [tableau V.B3](#):

Tableau V.B3: Les valeurs de PI et IC₅₀ de composés étudiés.

		mAPac	oAPac	pAPac	AG
Potentiel d'Ionisation (IP)	ev	0.31999	0.22451	0.23225	8.19512
	Kcal/mol	7.37912	5.17731	5.35580	189.366
IC ₅₀	µg/ml	15.05645	8.17360	10.1087	55.06332

La relation entre les IC₅₀ et les IP théoriquement calculés sont illustrées dans la figure suivante :

**Fig.V.B7:** Corrélation IC₅₀-IP des produits testés.

Nous avons trouvé une très bonne corrélation entre la capacité d'inhibition du radical DPPH[•] et PI avec un coefficient de détermination $R^2 = 0.98$ (Fig.V.B7).

Donc il est clair que :

$$\mathbf{oAPac > pAPac > mAPac \gg AG.}$$

V.B3 Méthode du blanchissement du β -carotène:

Afin d'évaluer l'activité antioxydante de nos produits, nous avons utilisé la méthode de décoloration du β -carotène en présence des acides α -aminophosphoniques et l'antioxydant standard BHT. La β -carotène présente une forte activité biologique et est importante comme composé physiologique puisqu'elle est le précurseur du rétinol. Ainsi le taux de dégradation ou de décoloration du β -carotène dépend de la capacité antioxydante de nos produits.

Les radicaux peroxydes, provenant de l'abstraction des atomes d'hydrogènes à partir des groupements méthylènes diallyliques de l'acide linoléique, attaquent le β -carotène hautement insaturé (Fig.V.B8) entraînant ainsi son oxydation et par conséquent, subit une décoloration (disparition du couleur orange) rapide en l'absence d'antioxydants. Cette diminution de la coloration correspond à une diminution de l'absorbance suivie spectrophotométriquement [12].

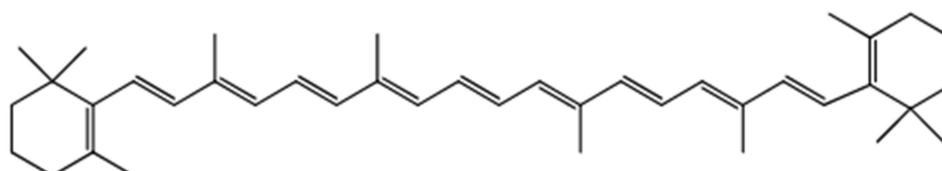


Fig.B8: Structure chimique du β -Carotène.

La cinétique du blanchissement ou de décoloration de la β -carotène en présence et absence des acides α -aminophosphoniques et la référence (BHT), ainsi que les pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique (%IC) sont présentés dans le Tableau V.B4 et les Figures V.B9 et V.B10, respectivement.

Cependant, la présence des antioxydants dans le mélange réactionnel pourrait inhiber relativement l'oxydation de β -carotène. Cette inhibition est due probablement, soit à l'inhibition de l'auto-oxydation de l'acide linoléique ou au piégeage des radicaux peroxydes formés durant leur oxydation [13].

Tableau V.B4 : Variation des absorbances et des pourcentages d'inhibition des mAPac, oAPac et pAPac en fonction du temps.

t (min)	BHT		pAPac		oAPac		mAPac		MeOH
	Abs.	IC	Abs.	IC	Abs.	IC	Abs.	IC	Abs.
0	1.028±0.8	0	1.134±0.0	0	1.132±0.1	0	1.110±0.3	0	1.016±0.3
10	1.010±0.6	67.85	1.110±0.4	56.25	1.104±0.3	50.59	1.098±0.4	78.39	0.960±0.4
20	1.014±0.1	89.10	1.089±0.5	64.69	1.085±0.8	64.1	1.086±0.2	81.38	0.886±0.2
30	1.013±0.7	92.49	1.075±0.8	70.93	1.072±0.7	70.49	1.079±0.0	84.60	0.813±0.1
40	1.009±0.0	93.03	1.069±0.0	75.89	1.054±0.6	71.44	1.076±0.9	87.08	0.747±0.0
60	1.010±0.5	95.61	1.050±0.1	78.97	1.041±0.7	77.41	1.068±0.5	89.38	0.613±0.7
80	1.010±0.2	97.95	1.016±0.4	86.80	1.012±0.6	86.65	1.049±0.7	93.15	0.121±0.8
100	1.009±0.4	97.99	1.009±0.7	86.67	1.010±0.9	86.98	1.057±0.4	94.33	0.079±0.6
120	1.009±0.4	98.12	1.007±0.7	87.79	1.001±0.8	87.052	1.055±0.7	94.52	0.006±0.5

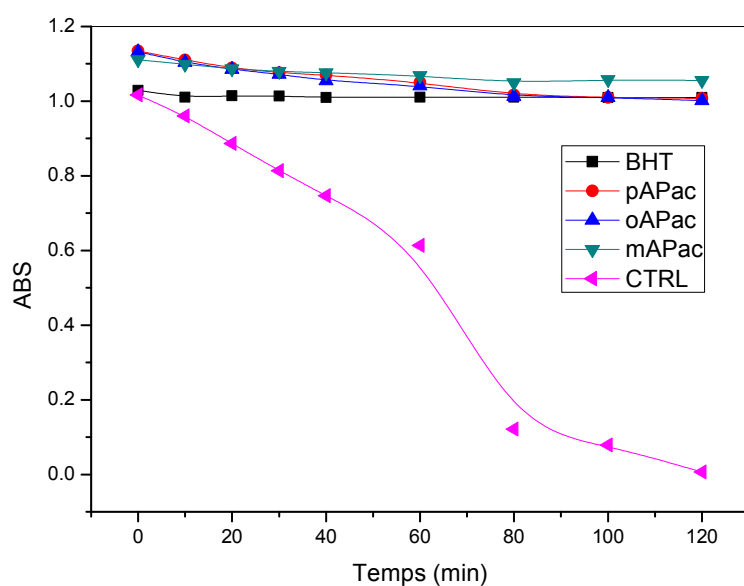


Fig.V.B9: Cinétique de la décoloration du β -carotène induite par oAPac, pAPac, mAPac et le BHT en fonction du temps (Chaque valeur représente la moyenne de deux essais).

L'histogramme ci-dessous (**Fig.V.B10**) représente les valeurs d'absorbances chaque produit comparé à celui du BHT après 120min.

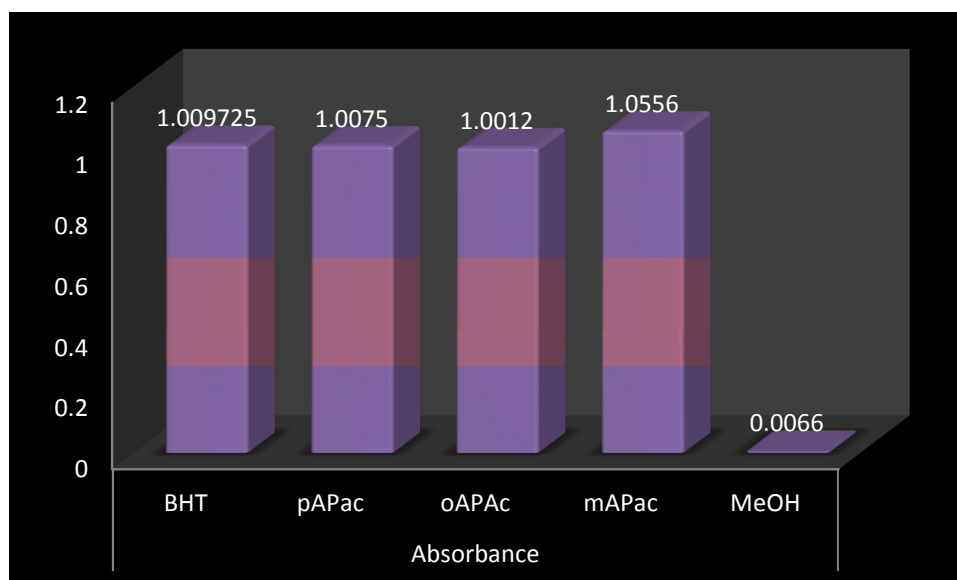


Fig.V.B10. Histogramme de comparaison des absorbances des produits testés après 120min.

A partir des courbes de cinétique de blanchissement du β -carotène, on remarque que les produits synthétisés ainsi que le BHT exercent un grand effet préventif significatif contre

l'oxydation du β -carotène par les radicaux peroxydes durant 120min d'incubation et ceci par rapport au contrôle négatif, qui représente 100% de la peroxydation.

L'activité antioxydante du BHT et les trois acides α -aminophosphoniques, mesurés par la méthode de blanchissement du β -carotène, est exprimée par la variation du % d'inhibition dans le temps. Le pourcentage d'inhibition de l'activité antioxydante par le système β -carotène/ acide linoléique est proportionnel au temps. Les résultats sont présentés dans la Fig.V.B11.

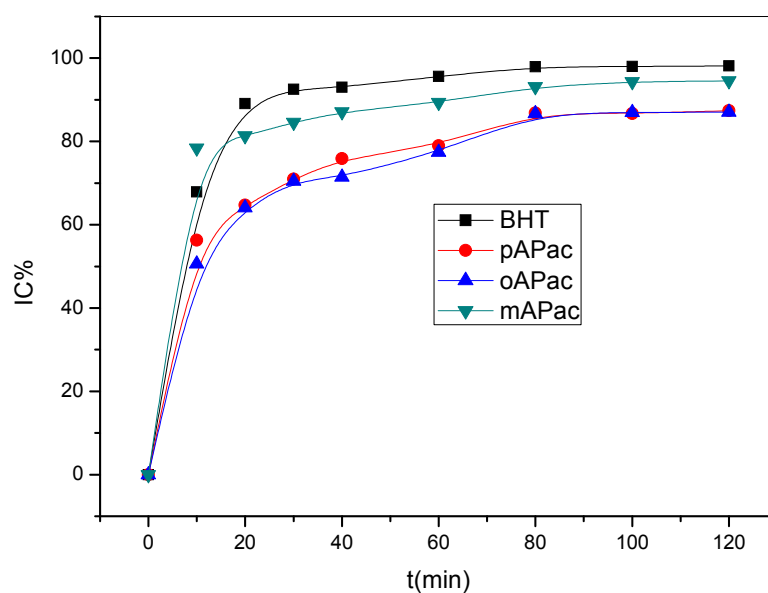


Fig.V.B11. Pourcentages d'inhibition du blanchissement du β -carotène en présence du BHT et (oPAac, pAPac et mAPac) en fonction du temps.

L'histogramme (Fig.V.B12) représente le pourcentage d'inhibition de la décoloration du β -carotène pour chaque produit comparé à celui du BHT après 120min.

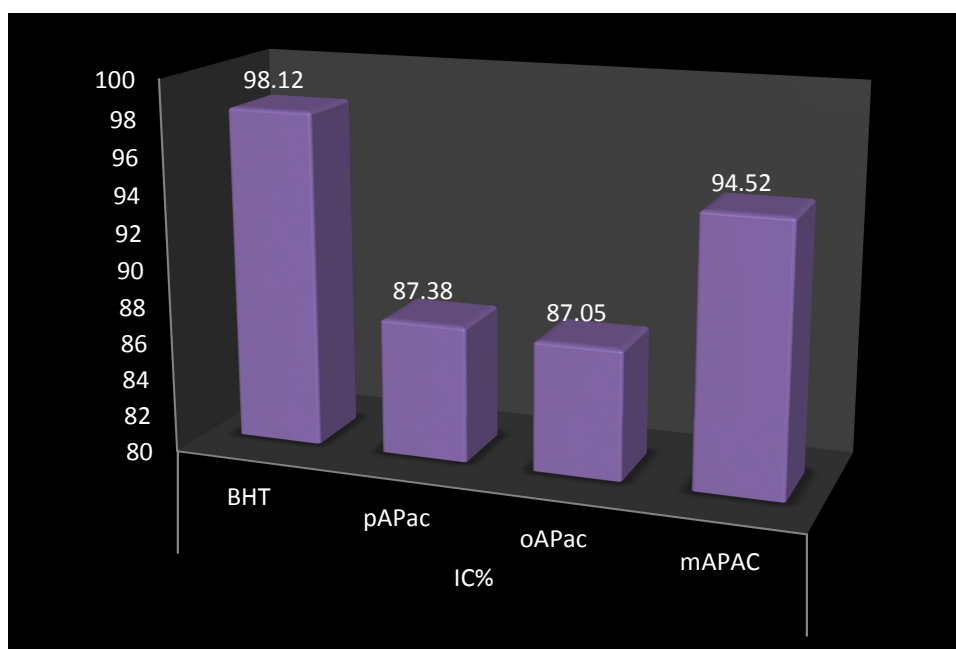


Fig.V.B12. Pourcentage d'inhibition des produits testés après 120min.

Nous remarquons clairement que le BHT présente une meilleure activité inhibitrice et le produit **mAPac** étudié présente une très bonne activité protectrice contre l'oxydation du β -carotène par les radicaux peroxydes comparée à celle du **pAPac** et **mAPac**.

Tous les produits testés inhibent le blanchissement du β -carotène à différentes valeurs par le piégeage des radicaux libres. En comparant les résultats obtenus avec celui de l'antioxydant standard (BHT) qui présente une activité d'inhibition de la décoloration du β -carotène élevée avec le pourcentage d'inhibition de l'ordre de **98.12%**, nous constatons que le **mAPac** présente une activité inhibitrice la plus élevée de **94.52%** suivie de celle de **pAPac** avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de **87.38%** et de **87.05%** pour le **oAPac**.

En comparaison avec l'antioxydant de référence, le mAPac est 1.03 fois moins actif que BHT. Le pAPac est 1.13 fois moins actif que BHT et le oAPac est 1.12 fois moins actif que BHT.

On peut donc résumer l'ordre décroissant des (oAPac, pAPac et mAPac) et le BHT testés en terme d'activité antioxydante relative comme suit :

$$\text{BHT} > \text{mAPac} > \text{pAPac} > \text{oAPac}.$$

On constate d'une part que le BHT apolaire ou moyennement apolaire est plus actif que les acides α -aminophosphoniques polaires. D'autre part, le oAPac et pAPac présentent une activité inhibitrice similaire. À la lumière de ces résultats, les produits synthétisés ont un effet

inhibiteur contre la peroxydation lipidique par clivage des réactions de peroxydation lipidique en chaînes par piégeage du radical peroxy, par conséquent ils constituent une source prometteuse de potentiel thérapeutique.

• **Détermination de « IC₅₀ » :**

Les valeurs IC₅₀ calculées nous ont permis d'évaluer et comparer l'efficacité de chaque produit. Plus la valeur de IC₅₀ est petite, plus l'activité antioxydante à piéger les radicaux libres formés à partir de l'oxydation d'acide linoléique est élevée. Tous les IC₅₀ sont calculés à partir de la partie linéaire des courbes de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des différents composés à tester. La Fig.V.B.13 représente les valeurs des concentrations responsables de 50% de l'activité de piégeage du radical des acides α -aminiophosphoniques et de la référence.

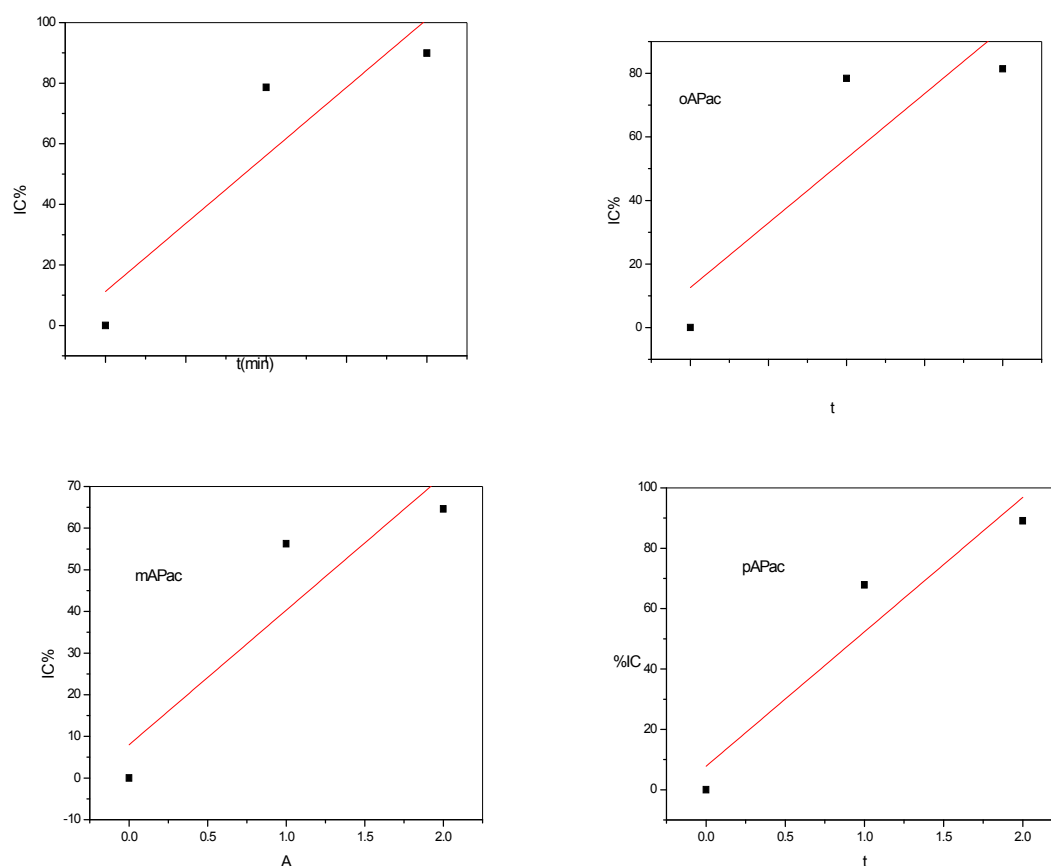


Fig.V.B.13: Pourcentages d'activité d'inhibition de la décoloration du β -carotène en fonction des différentes concentrations utilisées pour **BHT**, **oAPac**, **mAPac**, **pAPac**.

Les valeurs des IC_{50} trouvées pour tous les composés testés sont représentées dans le tableau V.B5 et dans la Fig.V.B14 sous forme d'histogramme:

Tableau V.B5: Valeurs des IC_{50} trouvées pour les composés étudiés.

Paramètres	mAPac	BHT	oAPac	pAPac
Equation	$y = a + b \cdot x$			
R^2	0.83279	0.99908	0.98516	0.91822
a	7.76905	12.56685	4.27385	4.82387
b	4.455	4.06923	0.73427	0.99517
IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	9.48	9.19	62.27	45.39

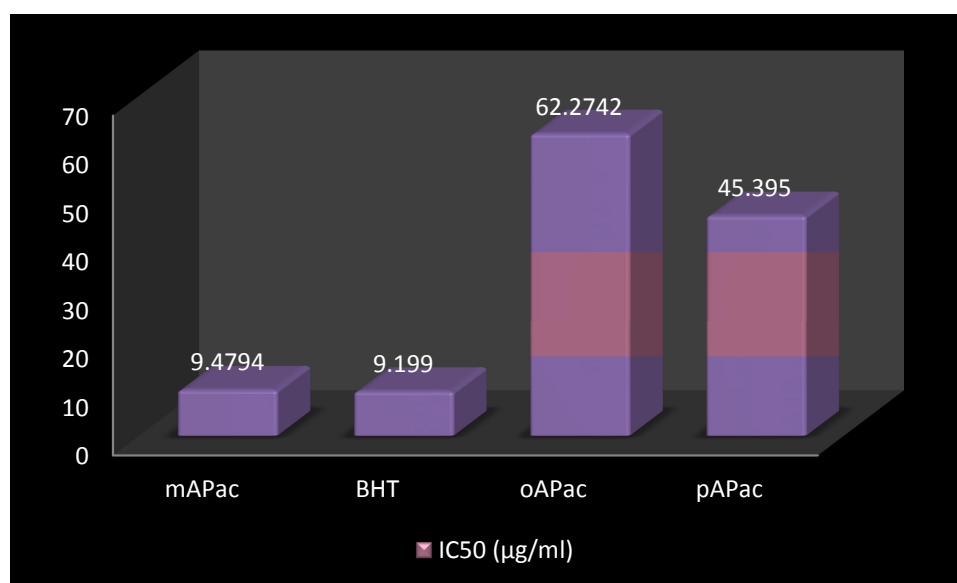


Fig.V.B14: Histogramme de comparaison des valeurs des concentrations inhibitrices IC_{50} des différents composés en $\mu\text{g/mL}$.

On remarque que le mAPac constitue un bon piègeur des radicaux libres en comparant avec les autres acides α -aminophosphoniques. Alors que le BHT et le meilleur antioxydant.

Les acides α -aminophosphoniques synthétisés présentent un peu d'activité lipidique dans la cinétique de blanchissement, ceci est probablement expliqué par la grande spécificité ils partagent. Ce résultat est probablement expliqué par la grande spécificité de ce test pour les composés apolaires donc lipophiles [14].

Par contre l'apparition de l'activité antioxydante significative de oAPac et du pAPac dans le test de DPPH car ce test est indépendant de la polarité des échantillons [15] ce qui confirme en grand partie que chaque acide α -aminophosphonique répond différemment dans l'essai mis en œuvre.

Des études récentes ont mis en évidence que la polarité des agents antioxydants est l'un des facteurs importants dans les systèmes de biomembranes [16]. C'est la raison pour laquelle beaucoup de chercheurs de l'activité antioxydante choisissent le test d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplés à celle du β -carotène comme modèle mimétique de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques [17].

On peut donc expliquer l'activité de nos produits par le paradoxe des phénomènes polaires comme il est décrit par Frankel et ses collaborateurs [18]. Etant donné que le test de blanchissement du β -carotène est similaire à un système d'émulsion de lipides dans l'eau, Frankel et Meyer (2000) [19] ont proposé que les antioxydants apolaires exposent des propriétés antioxydantes plus importantes car ils sont concentrés au sein de l'interface lipide-eau, permettant ainsi de prévenir la formation de radicaux lipidiques et l'oxydation du β -carotène. Alors que les antioxydants polaires restent dilués dans la phase aqueuse et sont ainsi moins efficaces dans la protection des lipides.

La polarité des molécules synthétisées et déterminées à partir des moments dipolaires calculés par la méthode DFT (voir Chap. IV partie A-Tableau IV.A7). Le Tableau IV.A7 montre que les valeurs calculées de moment dipolaire en cas de pAPac et oAPac sont presque égales et bien supérieure à mAPac. Dans une molécule, plus la valeur du moment dipolaire est grande, plus la molécule est polaire. Donc le oAPac et pAPac sont plus polaires et moins actifs que le mAPac. Alors que le *butylatedhydroxytoluene* (BHT) est relativement non polaire ce qui lui confère une bonne activité antioxydante (Fig.V.B15).

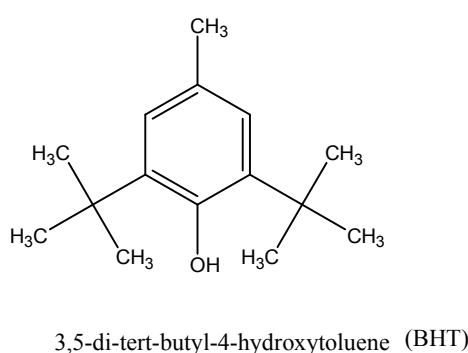


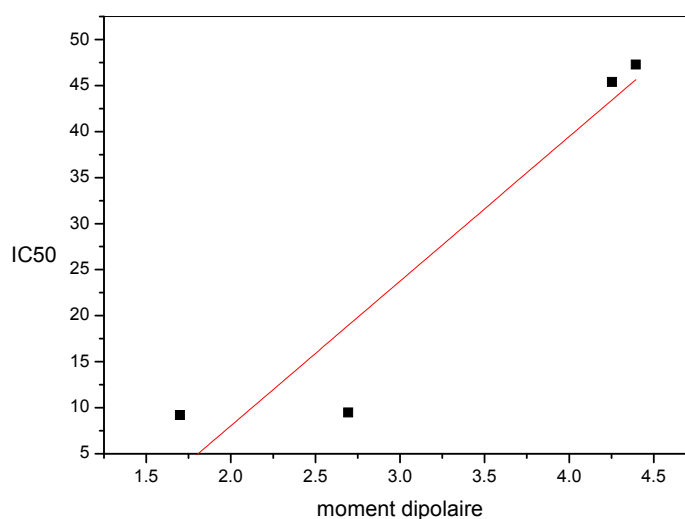
Fig.V.B15: Structure chimique du BHT.

Le tableau suivant résume les valeurs des IC_{50} , déterminées expérimentalement et moments dipolaires des produits étudiés calculés par la méthode DFT.

Tableau V.B6. Valeurs des IC₅₀ et moments dipolaires correspondant:

Paramètre	BHT	mAPac	oAPac	pAPac
$\mu_{\text{tot}}(\text{eV})$	1.7	2.6938	4.2531	4.3939
IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	9.199	9.4794	45.395	47.274

Nous avons trouvé une très bonne corrélation entre la capacité d'inhibition IC₅₀ et le moment dipolaire avec un coefficient de détermination $R^2 = 0.87$ (Fig.V.B.16).

**Fig.V.B16:** Corrélation IC₅₀-Moment dipolaire des produits testés.

V.B.4 Chélation du fer ferreux

Les ions métalliques à double équivalence jouent un rôle très important comme des catalyseurs d'oxydant, ils provoquent la formation des radicaux hydroxyles et la séparation de l'eau oxygéné selon les réactions de FENTON:



La capacité chélatrice est très importante, au fait qu'elle réduit la concentration des métaux de transitions catalyseurs de la peroxydation lipidique. En effet, le fer peut stimuler l'oxydation des lipides par la réaction de FENTON, et accélère également cette oxydation en décomposant les hydroperoxydes en radicaux peroxydes et alcoxydes qui peuvent à leur tour entretenir la réaction en chaîne. Il a été rapportés que les agents chélateurs qui forment une liaison de type σ avec les métaux sont actifs comme antioxydants secondaires car ils réduisent le potentiel redox et stabilisent la forme oxydée de l'ion métallique [20].

L'activité chélatrice de la référence EDTA et les trois acides α -aminophosphoniques, mesurés par la méthode de chélation du fer ferreux, est exprimée par la variation du % d'inhibition avec la concentration. Le pourcentage de l'activité chélatrice est proportionnel à la concentration. Les résultats sont présentés dans la Fig.V.B17.

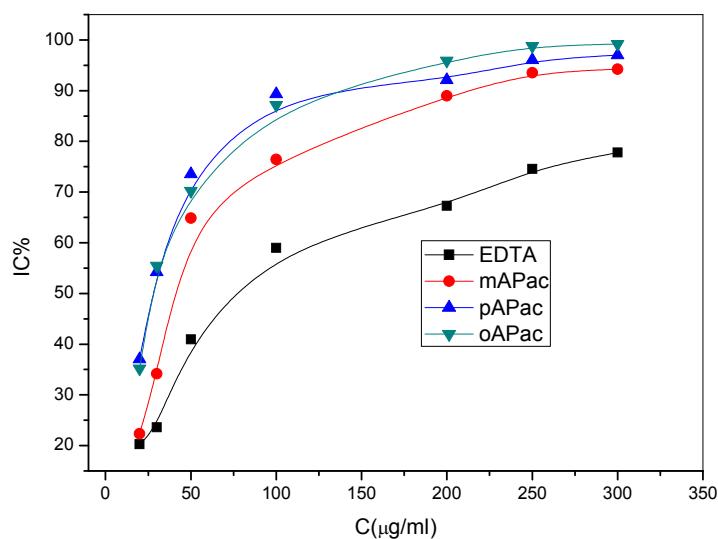


Fig.V.B17: Variations des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de mAPac, pAPac, oAPac et EDTA.

Les valeurs des pourcentages de chélation obtenues ont permis de tracer des courbes ayant une allure droite (Fig.V.B18).

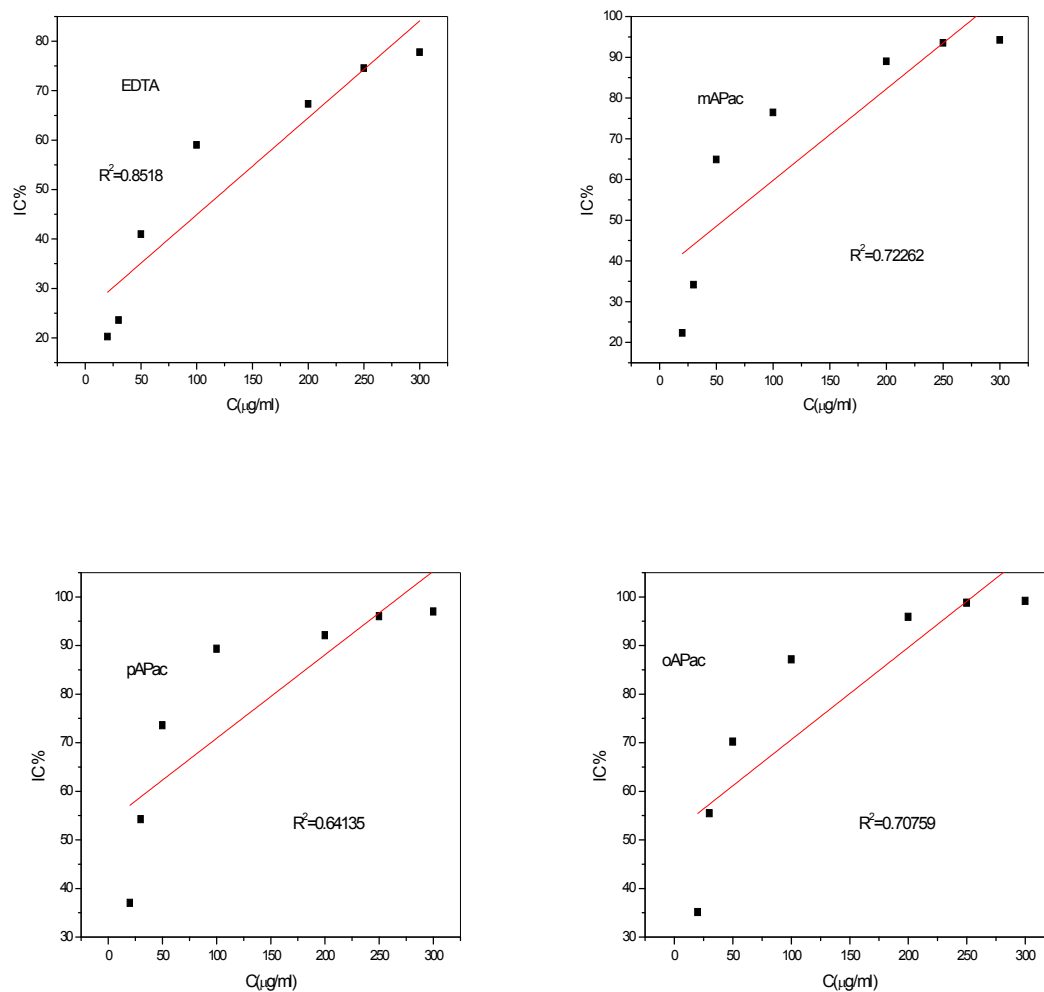


Fig.V.B.18: Activité chélatrice des composés EDTA, oAPac, mAPac et pAPac.

A partir de ces courbes, nous pouvons déterminer les pourcentages de chélation obtenus en fonction des concentrations utilisées ainsi que la valeur d' IC_{50} de chaque composé étudié. Nous avons calculé la concentration IC_{50} pour déterminer la capacité chélatrice des tous les produits testée ([Tableau V.B7](#)) :

Tableau V.B7: La concentration de chélation de Fe^{2+} (IC_{50}) de l'EDTA, oAPac, mAPac et pAPac.

Equation : $y = a + b \cdot x$		
composé	Paramètres d'équation.	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
EDTA	a 25.30669	125.94772
	b 0.19606	
mAPac	a 37.25719	56.647299
	b 0.22495	
pAPac	a 49.69406	1.777894
	b 0.17208	
oAPac	a 49.94498	0.289823
	b 0.18984	

L'efficacité de chélation de Fe^{2+} est inversement proportionnelle à la valeur de IC_{50} .

La chélation des ions ferreux a été estimée selon la méthode de Le et ses collaborateurs [21] qui est basée sur l'inhibition de la formation du complexe Fe(II)-Ferrosine après le traitement des échantillons avec les ions Fe^{2+} .

Dans cette méthode la Ferrosine peut quantitativement former un complexe avec le fer (Fe(II)-Ferrosine) chromophore ayant un maximum d'absorption à 562 nm. En présence d'agents chélateurs, la formation de ce complexe est perturbée aboutissant à une diminution de la couleur qui est suivie spectrophotométriquement. Les résultats obtenus montrent que les différents composés étudiés ainsi que le standard interfèrent d'une manière dose dépendante avec la formation du complexe (Fe^{2+} -Ferrosine), suggérant qu'ils possèdent une activité chélatrice tout en capturant l'ion ferreux avant qu'il soit complexé avec la Ferrosine. Ce test va nous permettre de quantifier les résultats précédemment obtenus. On pourra ainsi définir les IC_{50} de ces composés. Ceux-ci représenteront la concentration nécessaire en composé pour que 50 % de la quantité totale de Fe^{2+} présent dans le milieu soit piégé. Ces résultats vont déterminer un ordre du potentiel chélateur. A partir de nos résultats, on remarque d'une part, que tous les acides α -aminophosphoniques ont une activité chélatrice importante par rapport à la référence EDTA. D'autre part, le composé **oAPac** a la moindre valeur de CI_{50} c'est-à-dire plus chélateur des ions de ferreux, par contre le composé **mAPac** a une activité chélatrice moins importante (Fig.V.B19).

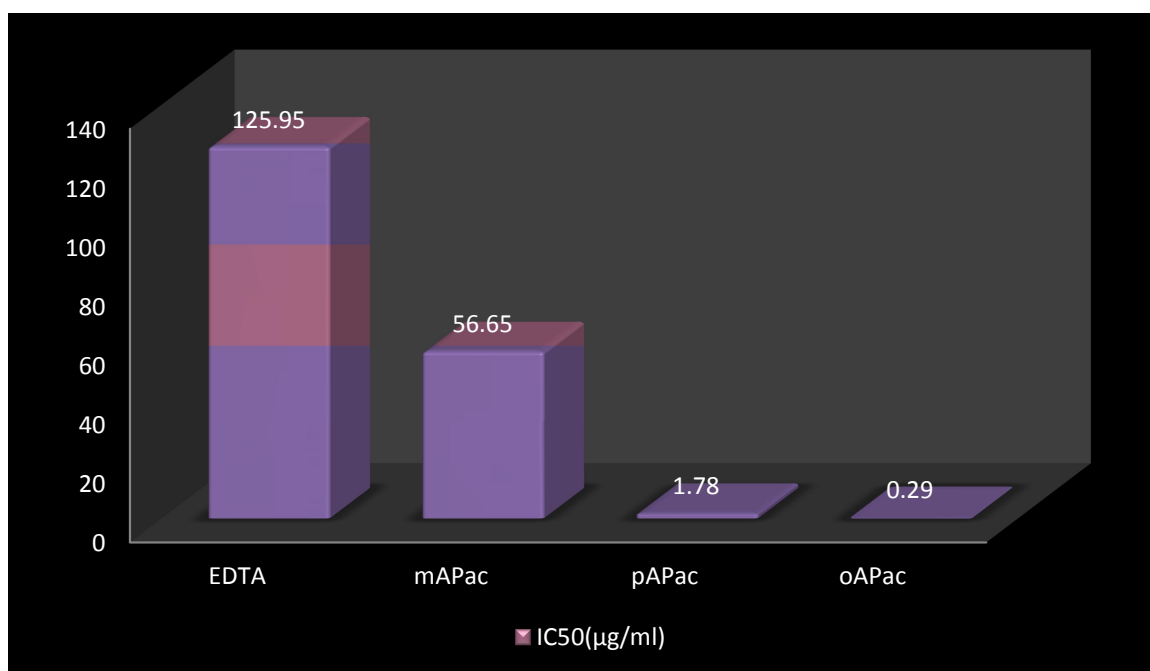


Fig.V.B.19: Histogramme de comparaison de potentiel chélateur des produits testés selon les IC50.

Depuis les travaux de Schwarzenbach en 1949, les acides phosphoniques sont connus comme des agents chélateurs efficaces. L'introduction d'un groupe amine dans la molécule pour obtenir un groupe -NH-C-PO(OH)_2 augmente la capacité de la liaison phosphonate-métal.

Dans la présente étude les pouvoirs chélateurs de nos produits peuvent être attribués aux:

- Selon la position du substituant méthylène phosphonique sur le cycle aromatique, les composés **oAPac** et **pAPac** sont plus actifs que le **mAPac**, ceci peut être qu'ils puissent donner une forte couverture d'ions de fer.
- Les acides α -aminophosphoniques sont polaires (moment dipolaire important) et sont solubles dans l'eau et ces derniers sont capables de former des chélateurs avec les ions ferreux. L'importance du moment dipolaire est due à la présence du groupe méthylène phosphonique ($\text{-CH}_2\text{P(O)(OH)}_2$).
- Il a été rapporté que les composés avec des structures contenant deux ou plusieurs des groupements fonctionnels suivants : -OH , $\text{-PO}_3\text{H}_2$, -NR_2 , P=O et -O- dans une configuration favorable structure-fonction peut montrer une excellente activité chélatrice de métal [22].

- Les composés contenant le nitrogène sont généralement des chélateurs plus puissants que les composés phénoliques [23]. De plus, la capacité chélatrice d'un composé phénolique dépend de la disponibilité d'un certain nombre de groupements fonctionnels convenablement orientés.
- Lorsqu'un élément chimique est engagé dans une liaison, l'électronégativité est une grandeur qui représente l'aptitude d'un élément à attirer vers lui les électrons de la liaison chimique. Selon les résultats d'Électronégativité (χ) obtenus à partir des calculs par la méthode DFT, on a : $\chi(\text{mAPac}) = 0.24896 \text{ eV}$, $\chi(\text{oAPac}) = 0.11883 \text{ eV}$, $\chi(\text{pAPac}) = 0.12258 \text{ eV}$.

Dans un complexe, plus la différence d'électronégativité entre les atomes est importante, plus le caractère ionique est important selon l'échelle suivante :

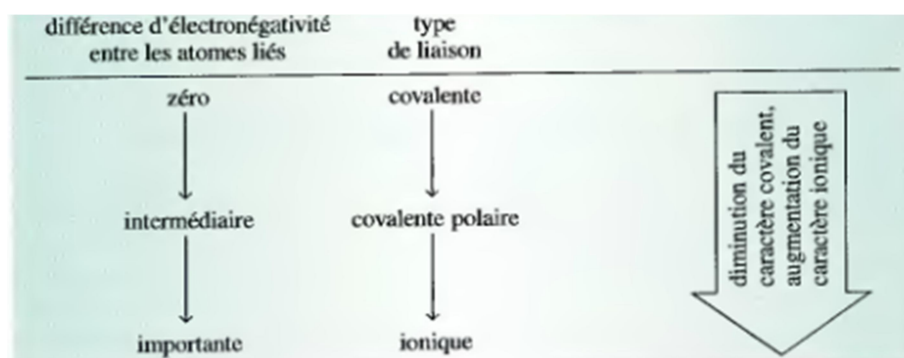
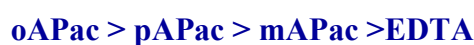


Fig.V.B20. Relation entre l'électronégativité et le type de liaison [24].

Ce qui conduit de dire que : plus la différence de l'électronégativité entre les acides α -aminophosphoniques et les ions Fe^{2+} est importante, plus les ions Fe^{2+} restent libres en solution et donc le pouvoir chélatant est moins.

On peut donc résumer l'ordre décroissant des (oAPac, pAPac et mAPac) et le EDTA testés en terme d'activité chélatrice relative comme suit :



V.B5 Conclusion

Etant donné la nature multiple de l'activité antioxydante, nous avons cherché à rationaliser les résultats antioxydants à travers des tests d'activité piègeur des radicaux libres DPPH $\cdot$. Aussi, l'effet antioxydant observé n'étant pas dû uniquement à un effet antiradicalaire, cela a amené dans un deuxième temps à commencer des études de complexation des ions Fe^{2+} . Le fer est impliqué dans la réaction de FENTON. Ainsi, une bonne chélation de ce métal permettrait également d'expliquer l'activité antioxydante déterminée en biologie. Dans un troisième temps le pouvoir de l'inhibition de blanchissement de la β -carotène a été aussi

vérifié. Les acides α -aminophosphoniques synthétisés ont montré un excellent pouvoir inhibiteur du radical DPPH et chélateur des ions Fe^{2+} et une activité modérée de la peroxydation de l'acide linoléique. Ces résultats sont très prometteurs, surtout qu'ils ont dépassé largement le seuil marqué par l'acide gallique et l'EDTA.

Références bibliographiques

- [1] B. Bozin, N. Mimica-Dukic, M. Bogavac, L. j. Suvajdzic, N. Simin, I. Samojlik, M. Couladis.. *Chemical Bekker ex Heimerls.l. and A. panno* (2008).
- [2] N. Paixao, R. Perestrelo, J.C. Marques, and J.S. Camara, *Food Chemistry* 105: 204–214(2007).
- [3] P. Maisuthisakul, R. Pongsawatmanit, &M.H. Gordon, *Food Chemistry*, Vol. 100, pp 1620-1629 (2007).
- [4] D. Prakash, S. Suri, , G. Upadhyay, and B.N. Singh. *Journal of Food Sciences and Nutrition* 58: 18-28(2007).
- [5] N. Buchner, A. Krumbein, S. Rohn, and L. W. Kroh, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20, 3229-3235(2006).
- [6] L. R.Fukumoto, G. Mazza, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 3597-3604(2000).
- [7] J.S. Wright, E.R. Johnson, G.A. DiLabio, *J. Am. Chem. Soc.* 123:1173(2001).
- [8] G. Litwinienko, K.U. Ingold, *J. Org. Chem.* 68:3433(2003).
- [9] M. Leopoldini, T.Marino, N.Russo, M.Toscano, *J. Phys. Chem. A.* 108:4916(2004).
- [10] G. Brigati, M. Lucarini, V. Mugnaini, G.F. Pedulli, *J. Org. Chem.* 67:4828–32 (2002).
- [11] C. A Rice-Evans, N.J.Miller, G. Paganga. *Free Radical Biol. Med.* 20:933–56 (1996).
- [12] J. Kubola, S. Siriamornpun, *Food Chemistry*, Vol. 110; pp 881-890(2008).
- [13] B. Tepe,D.Daferera, A. Sokmen, M. Sokmen, M. Polissiou. *Food Chem.* 90: 333-340(2005).
- [14] L. Gachkar, D. Yadegari, M.B. Rezaei, M. Taghizadeh, S.A. Astaneh, I. Rasooli, *Food Chemistry*, 102, 898-904(2007).
- [15] N. Kartal, M. Sokmen, B. Tepe, D. Daferera, M. Polissiou, , A. Sokmen, *Food Chemistry*,100: 584–589 (2007).
- [16] P. Terpinc, M. Bezjak, H. Abramovic, *Food Chemistry*, 115: 740-74(2009).
- [17] A. Ferreria, C. Proenca, L.M.L. Serralheiro, M.E.M. Arango, *Journal of Ethnopharmacology*, 108: 31-37(2006).
- [18] E.N. Frankel, S.-W. Huang, J. Kanner, J.B. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 42:1054-1059 (1994).
- [19] E.N. Frankel, A.S. Meyer, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 1925-1940(2000).
- [20] K. Suresh kumar, K. Ganesan et Subba, P.V. Rao; *Food Chemistry*, 107, pp 289-295(2008).
- [21] K. Le, F. Chiu and K. Ng, *Food Chemistry*, 105, 353-363(2007).
- [22] İ. Gülçin, Z. Huyut, M. Elmastaş H.Y. Aboul-enein; *Arabian Journal of Chemistry*, 3, pp 43–53(2010).
- [23] S. Steen Zumdaahl, *Chimie générale*, De Boeck Uniersité, 2^eedition, p245(1988).
- [24] W.C.E. Chan, Y.Y. Lim, O. Mohammed, *Food Chemistry*, 104, pp 1586-1593(2007).

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La synthèse de nouveaux acides α -aminophosphoniques à base d'aminophénols était notre objectif principal vue l'intérêt biologique et pharmaceutique de ces dérivés.

Au cours de ces travaux, nous avons synthétisé trois nouveaux acides α -aminophosphoniques par la réaction d'Irani-Moedritzer dans un milieu aqueux à partir de trois isomères aminophénols, les produits sont obtenus avec de bons rendement ($R_{oAPac}=83\%$, $R_{mAPac}=87\%$, $R_{pAPac}=88\%$). La pureté de ces acides a été vérifiée par la CCM, dont chaque produit est caractérisé par un rapport frontale ($Rf_{oAPac}=0.62$, $Rf_{mAPac}=0.55$, $Rf_{pAPac}=0.39$). Les acides α -aminophosphoniques synthétisés ont été caractérisés par la détermination des quelques propriétés physiques telles que les points de fusion ($Tf_{oAPac}=161^{\circ}C$, $Tf_{mAPac}=145^{\circ}C$, $Tf_{pAPac}=134^{\circ}C$). Dans ce point, on a aussi essayée de voir la solubilité des produits obtenus dans des solvants couramment utilisés. Nos produits sont solubles dans les solvants polaires (H_2O , DMSO, CH_3OH , ...etc). La spectrophotométrie infra rouge a été utilisée pour voir s'il y a la disparition des bandes caractérisant les amines primaires et l'apparition de nouvelles fonctions dans les molécules synthétisées c'est-à-dire identifier les principaux nouveaux groupement fonctionnels (P-C, P=O, N-C, OH phénoliques et phosphoniques...etc). L'examen des spectres permet de faire une première prédiction sur l'obtention de ce que nous cherchons.

L'UV-vis a été exploité dans l'analyse *qualitative*, par comparaison des spectres des produits de départ avec les spectres des produits synthétisés, et dans l'analyse *quantitative* par l'exploitation de la loi de Beer-Lambert. Les résultats trouvés indiquent l'obtention des spectres différents que celles des produits de départ (apparition de nouvelles bandes dans les spectres des produits synthétisés) dont chaque produit est caractérisé par son propre coefficient d'extinction molaire (ϵ). La RMN, par ces trois types (1H , ^{13}C et ^{31}P), constitue un moins très efficaces pour l'identification moléculaire. La structure ainsi que la pureté de nos produits ont été confirmé d'une façon précise grâce à cette technique. Pour enlever tout doute, l'analyse élémentaire vient pour reconfirmer les résultats précédents.

Les trois acides synthétisés, ont été étudiés par la méthode DFT à l'aide du logiciel Gaussian09, afin de connaître, d'une manière approfondie, les propriétés structurales (géométriques) et la réactivité chimiques des molécules synthétisées. Ces propriétés nous a permet, d'une part, de faire une fiche d'identification de chaque molécule, et d'autre part, d'exploiter ces propriétés dans l'interprétation des résultats obtenus ;

- Les isomères avec une plus grande Energie HOMO étaient oAPac et pAPac avec -0,22451 et -0.23225eV, respectivement.
- Les valeurs de dureté chimique calculées pour tous les composés indiquent que le composé pAPac est plus stable et plus dur que les autres composés.
- Le composé mAPac, avec un plus petit écart LUMO/HOMO, est le plus doux, moins stable et plus réactif que oAPac et pAPac.
- Les potentiels d'ionisation de mAPac, oAPac et pAPac indiquent clairement que le pAPac et oAPac sont très stable.
- Les composés oAPac et pAPac sont jugés plus nucléophile que mAPac qui est un électrophile plus fort.
- Dans une molécule, plus la valeur du moment dipolaire est grande, plus la molécule est polaire. Donc le oAPac et pAPac sont plus polaires que le mAPac.
- Les paramètres thermodynamiques à savoir la capacité thermique, l'entropie, les constantes de rotation et de vibration et des énergies de vibration de point zéro des composés ont également été calculé. Les données thermodynamiques fournissent des informations utiles pour l'étude plus loin sur les composés étudiés, lorsque ceux-ci peuvent être utilisés comme des réactifs dans une nouvelle réaction.
- On a vu que les capacités thermiques et les enthalpies, entropies augmentent avec l'augmentation de la température en raison de l'intensité des vibrations moléculaires augmentent avec l'augmentation de la température.

Par des logiciels spécialisés Molinspiration, Molsoft, Osiris, on a étudié les propriétés QSAR afin de voir si nos molécules sont capables d'être médicament ou non, à travers le concept « *Drug Likeness* ». Les résultats obtenus sont très encourageantes et montrent que les acides α -aminophosphoniques pourraient être de bons candidats pour interagir avec les différentes cibles enzymatiques, ils ont des caractéristiques mieux que les médicaments standards utilisés.

L'activité antimicrobienne et antioxydante de nos produits ont été, également, évaluées. Les trois acides α -aminophosphoniques présentent une capacité de piégeage de DPPH intéressante.

D'après les résultats obtenus, nous pouvons classer les composés testés par ordre de réactivité

décroissante: **oAPac>pAPac>mAPac>AG**

Le test de beta-carotène permet de résumer l'ordre décroissant des (oAPac, pAPac et mAPac) et le BHT testés en terme d'activité antioxydante relative comme suit :

BHT>mAPac>pAPac>oAPac.

L'essai de chélation, nous permet de résumer l'ordre décroissant des (oAPac, pAPac et mAPac) et le EDTA testés en terme d'activité chélatrice relative comme suit :

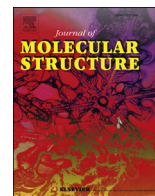
oAPac>pAPac>mAPac>EDTA.

L'évaluation l'activité antibactérienne et antifongique des trois acides α -aminophosphoniques a montré que ces composés ont un pouvoir antimicrobien important avec des zones d'inhibition >30 mm. Alors que ces pouvoirs sont relativement faibles pour les produits de départ.

En essayant d'améliorer et d'explorer le comportement des métaux de transition avec des ligands d'intérêt biologique en solution, on a étudié dans ce modeste travail la complexation d'un métal de transition, Cuivre (II) avec ces trois ligands. Nous avons constaté que l'incorporation de l'élément cuivre permet une amélioration de l'activité antifongique et antibactérienne. Donc, on peut dire qu'on a obtenu des produits hautement antibactériens et antifongiques à un coût relativement bas par l'ajout d'un substrat inorganique (le cuivre).

A partir de ces résultats un certain nombre de perspectives multiples et pluridisciplinaires peuvent être envisagées:

- Nous pensons synthétiser une autre nouvelles série d'acides aminophosphoniques à partir d'aminophénols substituent avec des groupements actifs dans différentes positions par rapport aux groupements hydroxy et amino, dont le but est d'améliorer les rendements de synthèses.
- Il faudrait aussi, avec des moyens de calcul plus importants, étudier d'une manière plus exhaustive les différentes molécules.
- Il est également intéressant de poursuivre les investigations en modélisation moléculaire. En effet, nous disposons maintenant de modèles robustes pour aller plus loin que l'étude structurale.
- Il conviendrait dans le prolongement de ces résultats, de tester l'activité biologique des structures nouvellement proposées, en faisant appel à d'autres programmes de docking; notre étude ici n'étant qu'initiale.
- Pour mieux évaluer les propriétés biologiques des acides α -aminophosphoniques, des études similaires *in vivo* seraient intéressantes et plus prometteuse telles que l'activité anti-inflammatoire, antivirale anticancéreuse, antidiabétique, anti tumorale...etc., ce qui nécessiterait de faire des tests cellulaires et/ou biologiques.



Synthesis, characterization and computational studies of three α -amino-phosphonic acids derivatives from *Meta*, *Ortho* and *Para* aminophenol

A. Hellal^{*}, S. Chafaa, N. Chafai

Laboratoire d'Electrochimie des Matériaux Moléculaires et des Complexes(LEMMC). Département Génie des procédés, Faculté de Technologie, Université Ferhat Abbas Sétif-1, Algeria

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 May 2015

Received in revised form

28 August 2015

Accepted 31 August 2015

Available online 9 September 2015

Keywords:

α -Aminophosphonic acids

DFT

FT-IR

HOMO-LUMO gap

Vibrational analysis

Thermodynamic properties

ABSTRACT

In this paper, we report first, the synthesis of three α -aminophosphonic acids from *Meta*-aminophenol, *Ortho*-aminophenol and *Para*-aminophenol. Then, we present a detailed DFT study based on B3LYP/6-31G (d, p) of geometrical structures and electronic properties of these compounds. The vibrational frequencies determined experimentally were compared with DFT gradient calculations which were obtained theoretically employing the B3LYP/6-31G (d, p) basis set method for the optimized geometry of the compound. The vibrations obtained from DFT method were found in good agreement with the experimental data. The study was extended to the HOMO-LUMO analysis to calculate the energy gap (Δ), Ionization potential (I), Electron Affinity (A), Global Hardness (η), Chemical Potential (μ) and Global Electrophilicity (ω). The calculated HOMO and LUMO energy reveals shows that the charge transfers occurring within the molecule. On the basis of vibrational analyses, the thermodynamic properties of the titles compound were also calculated.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

For a long time aminophosphonic acids as isosters of amino-carboxylic acids have attracted a particular interest for the preparation of analogs of numerous natural products. Among the literature concerning various aspects of the chemistry and biological activity of aminophosphonic and aminophosphinic acids, several monographs and reviews have appeared over the last decade [1–6]. Aminophosphonic acids constitute an important class of biologically active compounds, and their synthesis has been a focus of considerable attention in synthetic organic chemistry as well as in medicinal chemistry [1]. These acids are considered to be structural analogs of the corresponding amino acids. Thus, acting as competitive inhibitors, they can act as false substrates during the course of amino acid metabolism. Aminophosphonic acids are also very good ligands for the coordination of metal ions so they can be used for the extraction of metals such as iron, copper, nickel, and uranium in hydrometallurgy [7]. These acids also form complexes on the surface of metals such as iron [8] and consequently are very

suitable as anticorrosion agents [9]. These acids are also precursors of organic materials [10] or hybrid materials for metal organic frameworks (MOF) [11]. The aminophosphonic acids can be also useful for the modification of inorganic surfaces or for grafting organic compounds on inorganic surfaces [12]. They can be used for making supported catalysts [13] or modified inorganic nanoparticles [14], and they can also be used as enzyme inhibitors [15].

In this study, three compounds ([4-Hydroxyphenyl]phosphonomethyl-amino]-methyl)-phosphonic acid (**pAPac**), ([3-Hydroxyphenyl]phosphonomethyl-amino]-methyl)-phosphonic acid (**mAPac**) And ([2-Hydroxyphenyl]phosphonomethyl-amino]-methyl)-phosphonic acid (**oAPac**) were synthesized from 4-aminophenol, 3-aminophenol and 2-aminophenol, respectively. To the best of our knowledge, neither quantum chemical applications nor the vibrational spectra of the title compounds have been reported, as yet. The present communication is aimed at comparing the molecular structural properties, vibrational and energetic data of pAPac, mAPac and oAPac. The structure and the ground state energy of the molecules under investigation have been analyzed employing DFT/B3LYP level. The optimized geometry and their properties such as equilibrium energy, frontier orbital energy gap, dipole moment and vibrational frequencies along with the

^{*} Corresponding author.

E-mail address: haekpharm@yahoo.fr (A. Hellal).

electrostatic potential maps have also been used to understand the activity of these.

2. Experimental details

2.1. Chemicals/instrumentation

All chemicals used throughout the research were purchased from Aldrich, and used without further purification. Solvents were distilled from the appropriate drying agents and stored under nitrogen atmosphere. Melting points were determined on a digital apparatus Kofler Banc. All reactions were monitored using thin-layer chromatography (TLC) carried out on 0.25-mm E Merck silica gel plates (60F–254) and the spots were visualized by UV light. Infrared spectra were recorded on FT/IR JASCO 4200 (4000–400 cm^{-1}). NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 300 apparatus operating at 300 MHz with TMS as the internal standard and. Samples of the products were diluted in D_2O in the presence of Na_2CO_3 . Chemical shifts are given in parts per million (ppm). Multiplicities are shown as the abbreviations: s (singlet), brs (broad singlet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet). ^{31}P NMR chemical shifts were referenced to external H_3PO_4 (85% w/w). The percentages of carbon, hydrogen and nitrogen were determined by Elemental analyses using Perkin Elmer 2400 CHN Elemental Analyzer.

2.2. General procedure

The α -aminophosphonic acids were synthesized according to the method explained by Irani-Moedritzer [16]. In a three-neck flask, a mixture of 0.1 mol of H_3PO_3 50% and 0.2 mol of Ortho, Para and Meta aminophenol were dissolved into 100 ml water and 50 mL of hydrochloric acid. The mixture was allowed to be refluxed for 3 h at 110 $^\circ\text{C}$ while 0.4 mol of paraformaldehyde 37% solution was added drop wise to the reaction mixture. After adding, the mixture was kept at this temperature for an additional two hours. Completion of the reaction was monitored by TLC analysis. After completion of the reaction, solvent was removed in a rotaevaporator. The crude product was obtained, and the further pure product was received by recrystallization in ethanol.

2.3. Computational details

The molecules under investigation have been analyzed with density functional theory (DFT) [17], employing Becke's three parameter hybrid exchange functional [18] with Lee-Yang-Parr correlation functional (B3LYP) [19,20] with 6-31G (d, p) basis set. The optimized geometrical parameters, true rotational constants, fundamental vibrational frequencies, IR intensity, atomic charges, and other thermodynamic parameters were calculated using the Gaussian 09 package [21]. By combining the results of the GAUSS-VIEW program [22]. We know that DFT potentials symmetrically overestimate (2.5%) the Vibrational wavenumbers. These discrepancies are corrected either by computing anharmonic corrections explicitly or by introducing a scaled field or by directly scaling the calculated wavenumbers with a proper factor. We calibrated the vibrational wavenumbers calculated by B3LYP method with a scaling factor of 0.9679 [23]. After scaling with a scaling factor, the deviation from the experiment is more reliable. Analytic frequency calculations at the optimized geometry were done to confirm the optimized structures to be an energy minimum and to obtain the theoretical vibrational spectra. For the precise vibrational assignments, the normal modes have also been analyzed using the VEDA 4 program [24]. The assignments have also been reported by the potential energy distribution, which is a part of the normal

coordinate analyses.

The structures of pAPac, mAPac and oAPac have been optimized to compare the variation in electronic and non-linear properties on substitution of hydroxyl (OH) group at ortho, para and meta positions. The equilibrium geometry optimization for three isomers has been achieved by energy minimization, using DFT at the B3LYP level, employing the split valence basis set 6-31G (d, p).

The vibrational frequency calculated with this method and then scaled by the factor 0.9679. Molecular geometry is not restricted and all the calculations are performed by using the gauss-view molecular visualization program on a computer. Gauss view program has been considered to get visual animation and for the verification of the normal modes assignment [25].

Mulliken atomic charges calculation has an important role in the application of quantum chemical calculation to molecular system because atomic charges affect dipole moment, molecular polarizability, electronic structure, and a lot of properties of molecular systems [26]. The charge distribution, over the atoms suggests the formation of donor and acceptor pairs involving the charge transfer in the molecule. Atomic charge has been used to describe the processes of electronegativity equalization and charge transfer in chemical reactions [27,28].

The molecular electrical potential surfaces illustrate the charge distributions of molecules three dimensionally. MEP provides a visual method to understand the relative polarity of a molecule. This map allows us to visualize variably charged regions of a molecule. Knowledge of the charge distributions can be used to determine how molecules interact with one another and it is also be used to determine the nature of the chemical bond. While the negative electrostatic potential corresponds to an attraction of the proton by the concentrated electron density in the molecule (and is colored in shades of red on the ESP surface), the positive electrostatic potential corresponds to a repulsion of the proton by atomic nuclei in regions where low electron density exists and the nuclear charge is incompletely shielded (and is colored in shades of blue). There is a great deal of intermediary potential energy, the non red or blue regions indicate that the electro negativity difference is not very great. In a molecule with a great electro negativity difference, charge is very polarized, and there are significant differences in electron density in different regions of the molecule. This great electro negativity difference leads to regions that are almost entirely red and almost entirely blue [29]. Greater regions of intermediary potential, yellow and green, and smaller or no regions of extreme potential, red and blue, are key indicators of a smaller electronegativity.

The analysis of wave function indicates that the electron absorption corresponds to the transition from the ground to the first excited state and is mainly described by one electron excitation from the highest occupied molecular orbital (HOMO) to the lowest unoccupied orbital (LUMO). Molecular orbital's (HOMO and LUMO) are very important terms in quantum chemistry and their energy are very useful for physicists and chemists [30]. The HOMO represents an ability to lose an electron whereas LUMO represents the ability to gain an electron. The energy of the HOMO is directly proportional to the ionization potential and the energy of the LUMO is directly proportional to the electron affinity [31]. The energy difference between the HOMO and LUMO orbital is called HOMO–LUMO gap which explains the eventual charge transfer interaction within the molecule. The energy difference between HOMO and LUMO has been used to prove the bioactivity from intramolecular charge transfer [32,33]. HOMO and LUMO play a predominant role in chemical reactions. Small HOMO–LUMO gap implies low kinetic stability, because it is energetically favorable to add electrons to a high lying LUMO, and/or to extract electrons from a low-lying HOMO [34,35]. The higher HOMO energy corresponds

to the more reactive molecule in the reactions with electrophiles, while lower LUMO energy is essential for molecular reactions with nucleophiles [36,37]. According to the frontier molecular orbital theory, a higher HOMO energy of one reactant molecule and a lower LUMO energy of the other are advantageous to the reaction between the two molecules, because electrons more easily transfer from the HOMO of one reactant to the LUMO of the other in the orbital interaction [38]. The HOMO, LUMO and HOMO–LUMO energy gap of mAPac, oAPac and pAPac in the DFT level in 6-31G (d, p) basis set has been calculated. The HOMO–LUMO energy gap reveals that the energy gap reflects the chemical activity of the molecule.

Global reactivity indices of the compounds, *i.e.*, the ionization energy (I), the electron affinity (A), the global hardness (η), electronic chemical potential (μ), the global softness index (σ), the absolute electronegativity index (χ), and the global electrophilicity index (ω), were assessed within the framework of conceptual density functional theory (DFT) applying Koopmans' theorem in terms of the energies of the highest occupied molecular orbital (E_{HOMO}) and the lowest unoccupied molecular orbital (E_{LUMO}) [39–43]. Chemical hardness is associated with the stability and reactivity of a chemical system. In a molecule, it measures the resistance to change in the electron distribution or charge transfer. On the basis of frontier molecular orbitals, chemical hardness corresponds to the gap between the HOMO and LUMO orbital energies. The larger the HOMO–LUMO energy gap, the harder and more stable/less reactive the molecule [44–46]. The global hardness (η), is:

$$\eta = 1/2(E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}) \quad (1)$$

The inverse of the global hardness is designated as the softness, σ as follows:

$$\sigma = 1/2\eta \quad (2)$$

The global σ index, which bears an inverse relationship with the global hardness index ($\sigma = 1/2\eta$), is a function of LUMO/HOMO energy gap (Eq. (1)). It may serve as a rough criterion for the thermodynamic stability of the compounds and can be used for their reactivity prediction, *i.e.*, the softer molecule, which has a smaller LUMO/HOMO gap, may undergo an easier rearrangement in charge density, and hence it could be predicted to be more reactive than the harder ones [41,43]. In addition, the global softness (or hardness) index might be used in probing the aromatic character of organic compounds, *i.e.*, compounds which have a smaller LUMO/HOMO gap might be considered to have less aromatic character compared to those with a larger LUMO/HOMO gap [47].

In accordance with Janak's approximation [39], there is a connection between the vertical ionization potential (VIP) and E_{HOMO} ($\text{VIP} \approx -E_{\text{HOMO}}$) as well as between the vertical electron affinity and E_{LUMO} ($\text{VEA} \approx -E_{\text{LUMO}}$). Thus the trend of DFT global indices of the compounds, obtained in terms of LUMO and HOMO eigenvalues, is expected to be almost the same as that when using their VIP and VEA values.

Electronic chemical potential is defined as the negative of electronegativity of a molecule [48] and determined using Eq. (3).

$$\mu = 1/2(E_{\text{LUMO}} + E_{\text{HOMO}}) \quad (3)$$

Physically, μ describes the escaping tendency of electrons from an equilibrium system [44].

The absolute electronegativity index (χ) and the global electrophilicity index (ω) are calculated as:

$$\chi = -(E_{\text{LUMO}} + E_{\text{HOMO}})/2 \quad (4)$$

Global electrophilicity index (ω), introduced by Parr [49], is calculated using the electronic chemical potential and chemical hardness as shown in Eq. (3).

$$\omega = \mu^2 / 2\eta \quad (5)$$

Electrophilicity index measure the propensity or capacity of a species, to accept electrons [49]. It is a measure of the stabilization in energy after a system accepts additional amount of electronic charge from the environment [42].

The DFT was also used to calculate the dipole moment, mean polarizability (α) and the total first static hyperpolarizability (β) [50,51]. The dipole moment in a molecule is another important electronic property that results from non-uniform distribution of charges on the various atoms in a molecule. It is mainly used to study the intermolecular interactions involving the Van der Waal type dipole–dipole forces, etc., because higher the dipole moment, stronger will be the intermolecular interactions. The total dipole moment in a Cartesian frame is defined by Ref. [52]:

$$\mu = (\mu_x^2 + \mu_y^2 + \mu_z^2)^{1/2} \quad (6)$$

The calculated dipole moment for the three molecules is given in Table 5. Table 5 show that the calculated value of dipole moment in case of pAPac and oAPac are nearly equal and quite higher than mAPac. Polarizabilities and hyperpolarizabilities characterize the response of a system in an applied electric field [53]. They determine not only the strength of molecular interactions as well as the cross-sections of different scattering and collision processes, but also the non-linear optical (NLO) properties of the system [54,55]. It is well known that the nonlinear optical response of an isolated molecule in an electric field E_i can be presented as a Taylor series expansion of the total dipole moment, μ_{tot} , induced by the field:

$$\mu_{\text{tot}} = \mu_0^i + (1/2)\alpha_{ij}E_j + (1/6)\beta_{ijk}E_jE_k + \dots, \quad (7)$$

Where the μ_0^i , α_{ij} , and β_{ijk} coefficients are the components of the dipole moment of the unperturbed system, dipole polarizability, and first static hyperpolarizability, respectively. The isotropic (or average) linear polarizability $\langle\alpha\rangle$ and anisotropy of polarizability $\Delta\alpha$ is defined as [56]:

$$\langle\alpha\rangle = 1/3(\alpha_{xx} + \alpha_{yy} + \alpha_{zz}) \quad (8)$$

$$\Delta\alpha = 1/2[(\alpha_{xx} - \alpha_{yy})^2 + (\alpha_{xx} - \alpha_{zz})^2 + (\alpha_{yy} - \alpha_{zz})^2]^{1/2} \quad (9)$$

First hyperpolarizability is a third rank tensor that can be described by $3 \times 3 \times 3$ matrix. The 27 components of 3D matrix can be reduced to 10 components due to the Kleinman symmetry [57] ($\beta_{xyx} = \beta_{yxx} = \beta_{xyx} = \beta_{yyz} = \beta_{zyy} = \beta_{zyy}$;... likewise other permutations also take same value). The output from Gaussian 09 provides 10 components of this matrix as β_{xxx} , β_{xxy} , β_{xyy} , β_{yyy} , β_{xxz} , β_{xyx} , β_{yyz} , β_{xzz} , β_{yzz} , β_{zzz} , respectively. The components of the first hyperpolarizability can be calculated using the following equation [51]:

$$\beta_i = \beta_{iii} + 1/3 \sum_{i \neq j} (\beta_{ijj} + \beta_{jij} + \beta_{jji}) \quad (10)$$

Using the x, y and z components of β , the magnitude of the first hyperpolarizability tensor can be calculated by:

$$\beta_{\text{tot}} = (\beta_x^2 + \beta_y^2 + \beta_z^2)^{1/2} \quad (11)$$

The complete equation for calculating the total static first

hyperpolarizability magnitude of Gaussian output is given as follows [58]:

$$\beta_{\text{tot}} = \left[(\beta_{xxx} + \beta_{xyy} + \beta_{xzz})^2 + (\beta_{yyy} + \beta_{yzz} + \beta_{yxx})^2 + (\beta_{zzz} + \beta_{zxx} + \beta_{zyy})^2 \right]^{1/2} \quad (12)$$

The thermodynamic parameters namely heat capacity, entropy, rotational constants, vibration and vibrational zero point energies of the compounds have also been computed at 298.15 K and 1.00 atm pressure by the DFT-B3LYP level using 6-31G(d, p) basis sets.

On the basis of vibrational analysis at B3LYP/6-31G (d, p) level, the standard statistical thermodynamic functions: heat capacity ($C_{m,p}$), entropy (S_m°), and enthalpy changes (ΔH_m°), for the title compounds were determined at [100–1000 K].

3. Result and discussion

3.1. Chemistry

The aminophosphonic acids were generally obtained by hydrolysis of esters obtained via the Kabachnik–Fields reaction [59] of a carbonyl compound, a dialkylphosphite, and an amine. The Kabachnik–Fields reaction can be efficiently activated by microwave irradiation [60]; nevertheless there are often secondary reactions during the subsequent hydrolysis of the phosphonate. The Irani–Moedritzer [61] synthesis is less general than the Kabachnik–Fields reaction, but it has the advantage of giving the aminophosphonic acid directly without a hydrolysis step. The Irani–Moedritzer reaction times are in general long, so the use of microwave irradiation for assisting the reaction is of interest. We describe this reaction in aqueous medium without organic solvent. Water is an inexpensive, nonflammable, nontoxic solvent. The Irani–Moedritzer reaction can be compared with a Mannich reaction and takes place by the addition of phosphorous acid to the iminium salt formed by reaction of an aqueous solution of formaldehyde with the amine in acidic medium. We obtained various aminomethylenephosphonic acids by refluxing three aminophenol isomers (ortho, meta and para aminophenol) with phosphorous acid and formaldehyde in hydrochloric media (Scheme 1).

The α -aminophosphonic acids (pAPac, mAPac and oAPac) used in this study were synthesized via Irani–Moedritzer reaction by treatment of the formaldehyde with the primary amine (Ortho-, Meta- and Para-aminophenol) and phosphorous acid in strong acidic medium (concentrated hydrochloric acid) under reflux. After filtration and evaporation, the α -aminophosphonic acids were isolated in almost quantitative yields. The results showed that the α -Aminophosphonic acids (pAPac, mAPac and oAPac) are synthesized in good yields (73–88%). Thin layer chromatography (TLC) was employed to monitor reaction progress and to determine the purity of the products. All the title compounds (pAPac, mAPac and oAPac) readily dissolve in polar solvents and melted in the range of 134–161 °C. The structures of the title compounds were established by their spectroscopic data. The structures of the obtained compounds were identified and characterized by elemental analysis, FT-IR, and by ^1H NMR, ^{13}C NMR and ^{31}P NMR spectroscopy. The percentages of carbon, hydrogen and nitrogen were determined by using CHN analyzer. The found and calculated data is in good agreement with the proposed molecular formulas. The presence of α -aminophosphonic acids was confirmed by FTIR measurement: All the compounds showed absorption bands of the saturation carbon (sp^3) at 2930–2290 cm^{-1} . The α -aminophosphonic acids display characteristic bonds for phosphonic group (P–O–H) at

3691–3641 cm^{-1} . The peak at 1645–1604 is due to (P(O)–OH) stretching and the absorption bands at 1200 cm^{-1} and 757 cm^{-1} are assigned to the stretching modes of (P=O) and (P–O–H) respectively. The strong peak at 1378 cm^{-1} is ascribed to the (P–CH₂) bending that could be taken advantage for confirming the formation of a bond between phosphorus acid and methanal. The peaks at 1510 and 1604 cm^{-1} are assigned to the vibrations of aromatic ring. The broad absorption band from 3500 to 3600 cm^{-1} arises from stretching (–OH) of phenol group. NMR spectral characteristics of α -aminophosphonic acids are an important tool for determination of structure and identification of new compounds. The structure of these compounds was confirmed on the basis of their spectroscopic characteristics. In the ^1H NMR spectrum of (pAPac), the methylene protons resonate as singlet at 1.96 ppm. The other consecutive signals correspond to the phosphonic group resonate as singlet at 4.56 ppm. The aromatic protons resonate as multiplet at 5.7–6.2 ppm. The phenol proton resonates as singlet at 6.68 ppm. On the other hand the methylene carbon appeared as singlet at 46.42 ppm in the ^{13}C NMR, the aromatics carbon showed resonance at 116 and 156.6 ppm. The ^1H NMR spectrum of (mAPac) shows a multiplet in the region 5.60–6.07 ppm for the aromatic protons. The protons of the methylene group (N–CH₂) appeared as a singlet at 0.987 ppm while the protons of the phosphonic group (P–OH) appear as a singlet at 4.83 ppm. The phenolic protons appeared at the region 6.7 ppm. The ^{13}C NMR shows signals at 116–140 ppm for aromatics carbons. The methylene carbon appeared as singlet at 30.10 ppm which confirms the structure of the product. The ^1H NMR spectrum of compound (oAPac) demonstrated a singlet at 4.25 ppm due to phosphonic protons, the singlet at 1.75 ppm was assigned to the methylene protons. The aromatic protons appeared as a multiplet at 5.7–6.64 ppm. The phenolic proton appeared as singlet at 6.8 ppm. The ^{13}C NMR spectrum exhibited the following signals: methylene carbon at 46.52 ppm and the aromatic carbons at 116.4–156 ppm. The ^{31}P NMR spectroscopy is the most precise method for determining the structure of the phosphorus-containing compounds. Chemical shifts for ^{31}P of the three α -aminophosphonic acids (pAPac, mAPac and oAPac) synthesized depend on imbalance of σ -bonds caused by the difference in electronegativity of the atoms and by the effect of the free electron pairs, degree of occupation of phosphorus *d*-orbitals, and deviation from geometric symmetry [61]. The phosphorus atom of the three α -aminophosphonic acids in the ^{31}P NMR spectrum appears at 1.017–1.081 ppm. From these results, we confirm the successful synthesis of α -aminophosphonic acids (pAPac, mAPac and oAPac) with high purity.

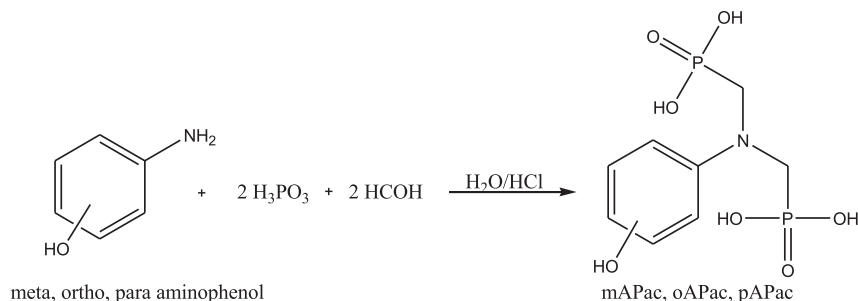
3.2. Analytical data

3.2.1. [(4-Hydroxy-phenyl)-phosphonomethyl-amino]-methylphosphonic acid (pAPac)

Brown solid; yield 88%; M.P.157 °C; FTIR: See Table 4; ^1H NMR δ ppm: 1.96 (s, 4H, CH₂), 4.5 (s, 1H, P(O)–(OH)₂), 5.7–6.2 (m, 4H, Ar–H), 6.68 (s, 1H, Ar–OH); ^{13}C NMR δ ppm: 46.42 (s, 2C, –CH₂), 116 (s, 2C, –C_{Ar}), 156.6 (s, 2C, –C_{Ar}); ^{31}P NMR δ ppm: 1.017 (s, 2P, –P(O)OH); Anal. Calcd. for C₈H₁₃NO₇P₂: C, 32.31; H, 4.39; N, 4.72. Found: C, 32.34; H, 4.41; N, 4.67.

3.2.2. [(3-Hydroxy-phenyl)-phosphonomethyl-amino]-methylphosphonic acid (mAPac)

Brown solid; yield 78%; M.P.148 °C; FTIR: See Table 4; ^1H NMR δ ppm: 2 (s, 4H, CH₂), 3.38 (s, 1H, P(O)–(OH)₂), 5 (s, 1H, Ar–OH), 6.05–6.91 (m, 4H, Ar–H); ^{13}C NMR δ ppm: 57.7 (s, 2C, –CH₂), 100.7–130.6 (s, 6C, –C_{Ar}); ^{31}P NMR δ ppm: 1.081 (s, 2P, –P(O)OH); Anal. Calcd. for C₈H₁₃NO₇P₂: C, 32.31; H, 4.39; N, 4.72. Found: C, 32.30; H, 4.43; N, 4.68.



Scheme 1. Synthesis of mAPac, oAPac and pAPac.

3.2.3. *[(2-Hydroxy-phenyl)-phosphonomethyl-amino]-methyl)-phosphonic acid (oAPac)*

Brown solid; yield 73%; M.P.134 °C; FTIR: See Table 4; ^1H NMR δ ppm: 1.96 (s, 4H, CH_2), 4.5 (s, 1H, $\text{P}(\text{O})-(\text{OH})_2$), 5.7–6.2 (m, 4H, Ar–H), 6.68 (s, 1H, Ar–OH); ^{13}C NMR δ ppm: 46.42 (s, 2C, $-\text{CH}_2$), 116 (s, 2C, $-\text{C}_{\text{Ar}}$), 156.6 (s, 2C, $-\text{C}_{\text{Ar}}$); ^{31}P NMR δ ppm: 1.067 (s, 2P, $-\text{P}(\text{O})\text{OH}$); Anal. Calcd. for $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_7\text{P}_2$: C, 32.31; H, 4.39; N, 4.72. Found: C, 32.29; H, 4.38; N, 4.74.

3.3. Molecular geometry

The optimized molecular structures with numbering scheme of the three molecules are shown in Fig. 1. The 87 fundamental modes of vibrations of each compound are distributed into the irreducible representation as $3\text{N}-6_{\text{vib}} = 87$. All vibrations are active in IR. All the frequencies are assigned in terms of fundamental, overtone and combination bands. The optimized geometrical parameters (bond length and bond angles) by DFT/B3LYP with 6-31G (d, p) as the basis set are tabulated in Tables 1–3.

As all the atoms of aromatic nucleus and amino-methylenephosphonic groups are situated in the molecular plane, the molecules were built using the Gaussview program package

then optimized in steps. The optimized geometry of both molecules under study is confirmed to be located at the local true minima on potential energy surface, because of absence of imaginary wave-number in the vibrational spectra. Substitution with methylenephosphonic group alters the bond length and bond angle. Substitution of methylenephosphonic group in aminophenol in the ortho position overestimated the C1–C2 bond length and more so in para substitution. Substitution at meta position underestimates the bond length value. When methylenephosphonic group is in the ortho position, the C–C bonds attached to the substituted position are considerably overestimated while the other C–C bonds have negligible variations. The same trend is also seen the meta and para substitutions. Substitution in the meta position overestimates the C–H bond length to a value $0.9729 \text{ \AA} - 0.152 \text{ \AA}$. The C–H bond lengths in ortho positions elongate to a value $1.068 \text{ \AA} - 0.317 \text{ \AA}$. The same bond lengths in the para positions are observed as $1.066 \text{ \AA} - 0.307 \text{ \AA}$. There are not many variations in all the C–C bond lengths due to the substitutions in all three positions. The N10–C6, N10–C6, N13–C6 bond lengths for oAPac, mAPac and pAPac isomers are found to be $1.46 \text{ \AA}$, $1.44 \text{ \AA}$ and $1.46 \text{ \AA}$, respectively. The N–H bond length for all the three substitutions has more or less the same value with Meta position having comparatively highest bond

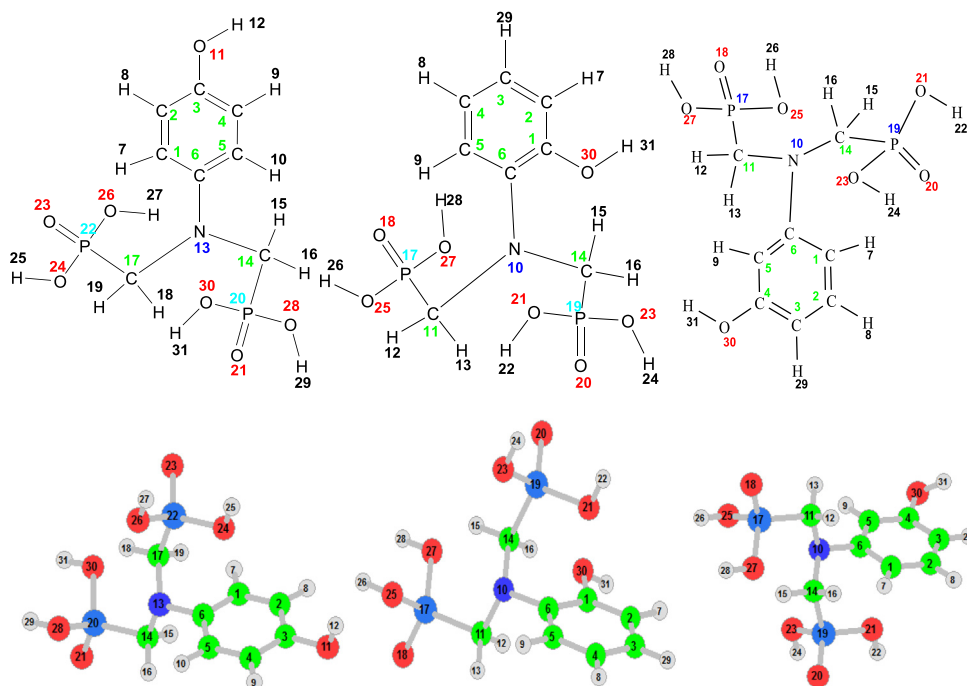


Fig. 1. Molecular structure of pAPac, mAPac and oAPac along with numbering of atom.

length. O–H phenolic bond length exhibits more or less the same value for all substitutions with para position having comparatively highest bond length. From the values of the H–O–C angles it is observed that when the amine group is substituted in the meta position it bends more towards the substituted position ($H31-O30-C4 = 171.37^\circ$) and this bending becomes less pronounced when the substitution is in the para ($H12-O11-C3 = 112.45^\circ$) and ortho positions ($C1-O30-H31 = 14.08^\circ$). Angle H–C–N bends towards the OH group less in the ortho position ($H16-C14-N10 = 42.20^\circ$) than in meta ($H16-C14-N10 = 52.76^\circ$) and para ($H16-C14-N13 = 130.66^\circ$) because of the proximity of the OH group (hydrogen bonding). Angle ($H24-O23-P19 = 89.58^\circ$) in ortho position near to the OH bends much less than in meta ($H22-O21-P19 = 116.66^\circ$) and para ($H31-O30-P20 = 116.89^\circ$) presumably due to the hydrogen bonding. Similarly, the angle C–C–O near the phosphonic OH group, in meta and para, also the bending is more. The details of the bond lengths are listed in the [Tables 1–3](#).

3.4. Vibrational analysis

The observed FT-IR spectra along with the theoretical infrared spectra of pAPac, mAPac and oAPac are shown in [Fig. 1](#). The observed and calculated frequencies using DFT/B3LYP with 6-31G (d, p) basis set along with their probable assignments of pAPac, mAPac and oAPac are summarized in [Table 5](#). A few of the discrepancies is observed between the experimental and computed data of vibrational frequencies and their assignments have also been discussed. The goal of the vibrational analysis is to find vibrational modes connected with specific molecular structures of calculated compounds. Vibrational frequencies were calculated by using B3LYP/6-31G. [Table 4](#) represents the calculated vibrational frequencies and assignments of pAPac, mAPac and oAPac. The title

compounds with 31 atom gives (3N-6) i.e. 87 vibrational levels in the range $600-4000\text{ cm}^{-1}$ at B3LYP/6-31G.

The assignments for these 87 vibrational levels have been proposed and show some structure spectra correlation. Out of these 87 vibrational modes 30 are stretching modes 29 are bending modes and 28 are torsional modes. These methods are proposed as a tool to be applied in the structural characterization of the phosphonic acid class of organic material. As a general remark, we must emphasize that extensive overlapping of absorption bands complicates greatly the assignment of the IR spectra. Therefore, we present here the attempt to provide more detailed description of the main vibrational bands using DFT vibrational analysis along with experimental data. The presence of water molecule and an extensive hydrogen bonding in aminophosphonic derivatives mAPac, oAPac and pAPac influences drastically their IR spectra. Our initial calculations using gas phase DFT calculations showed that these effects cannot be properly described by this method. Good agreement between the experimental and calculated frequencies is accomplished for compounds mAPac, oAPac and pAPac ([Table 4](#) and [Fig. 2](#)), in the $1650-400\text{ cm}^{-1}$ region. Analysis of the calculated vibrational modes allows tentative assignment and description of the observed bands in the IR spectra. Due to the complexity of the studied structures, all the reported frequencies correspond to complex vibrational motions of several parts in the molecule. Low frequencies (below 700 cm^{-1}) are not included in these tables due to their very complex mode compositions (see [Fig. 3](#)).

• C–H vibrations

The aromatic C–H stretching vibrations were normally found between 3100 and 3000 cm^{-1} [62]. Accordingly, in the titles compound, asymmetric and symmetric stretching vibrations were observed at 2980 cm^{-1} and 2901 cm^{-1} in the FT-IR spectrum. The

Table 1
Optimized geometric data for oAPac using B3LYP/6-31G (d, p).

Bond	Bond length	Vib	Bond	Bond angle	Vib	Bond	Bond dihydal	Vib
C3–H29	1.068007	STRE	H24–O23–P19	89.5 8	BEND	H29–C3–H8–C4	–180.00	TORS
C3–C4	0.792628	STRE	H22–O21–P19	112.31	BEND	O23–P19–O30–C6	0.00	TORS
P19–O23	0.507867	STRE	H7–C2–C3	69.18	BEND	H22–O21–P19–O30	–180.00	TORS
O21–H22	0.898837	STRE	H8–C4–C3	69.18	BEND	H12–C11–N10–O30	0.00	TORS
C11–H12	0.317788	STRE	H9–C5–C4	142.80	BEND	O21–P19–H24–O23	–180.00	TORS
C14–H16	0.317788	STRE	H13–C11–N10	131.77	BEND	C5–C6–H31–O30	–180.00	TORS
C1–C6	0.792629	STRE	H16–C14–N10	42.20	BEND	H13–C11–N10–O30	0.00	TORS
P19–O21	1.706815	STRE	H12–C 11–N10	89.58	BEND	O25–P17–C11–N10	0.00	TORS
C5–C6	0.904748	STRE	H12–C11–H13	42.20	BEND	C14–P19–H24–O23	0.00	TORS
C1–O30	0.923213	STRE	H15–C14–H16	158.11	BEND	C11–N10–H16–C14	0.00	TORS
O30–H31	0.493328	STRE	C3–C4–C5	142.80	BEND	H26–O25–O27–P17	–180.00	TORS
C5–H9	0.605189	STRE	C5–C6–C1	69.18	BEND	P19–O30–H31–C6	–180.00	TORS
C11–H13	0.898765	STRE	C4–C5–C6	148.02	BEND	H24–O23–P19–O30	–180.00	TORS
C2–H7	0.60519	STRE	C2–C3–C4	69.18	BEND	H28–O27–O25–P17	–180.00	TORS
C4–H8	0.690795	STRE	C27–P17–O11	115.92	BEND	H15–C14–H16–N10	0.00	TORS
C2–C3	0.904748	STRE	C25–P17–O11	158.11	BEND	O27–O25–P17–C 11	0.00	TORS
P17–O25	0.507867	STRE	O30–H31–C1	150.81	BEND	O18–P17–H–26025	–180.00	TORS
N10–C14	1.234752	STRE	N10–C14–P19	131.77	BEND	P17–C11–N10–O30	–180.00	TORS
P19–C14	1.704045	STRE	C14–P19–O20	131.77	BEND	C14–P19–O30–H16	0.00	OUT
N10–C11	1.376344	STRE	H26–O25–P17	158.11	BEND	C2–C5–C1–H7	0.00	OUT
O25–H26	0.958212	STRE	O18–P17–O27	131.77	BEND	C5–C6–O30–H9	0.00	OUT
P17–C14	1.704045	STRE	O21–P19–O20	115.92	BEND	C4–C5–C1–H8	0.00	OUT
O23–H24	0.898837	STRE	C11–N10–C14	131.77	BEND	C3–C1–C2–C4	0.00	OUT
O27–H28	0.958211	STRE	C6–N10–C14	115.92	BEND	C2–C1–C5–C4	0.00	OUT
C2–C1	1.398789	STRE	H13–C11–P17	115.92	BEND	C4–O30–C1–C5	0.00	OUT
C14–H15	1.068007	STRE	C1–O30–H31	14.08	BEND	N10–O30–O23–C14	0.00	OUT
C4–C5	1.398789	STRE	P17–C11– N10	112.31	BEND	O20–P19–O23–H24	0.00	OUT
C6–N10	1.467262	STRE				O30–C6–C1–H31	0.00	OUT
P17–O18	1.408926	STRE						
P19–O20	1.263983	STRE						
P17–O27	1.436344	STRE						

Table 2Optimized geometric data for **mAPac** using B3LYP/6-31G (d, p).

Bond	Bond length	Vib	Bond	Bond angle	Vib	Bond	Bond dihydral	Vib
C11–H13	0.972915	STRE	H28–O27–P17	117.78	BEND	H13–C11–N10–C6	0.00	TORS
P19–O23	0.244282	STRE	H26–O25–P17	170.53	BEND	H12–C11–N10–C6	0.00	TORS
C11–H12	0.152855	STRE	H22–O21–P19	116.66	BEND	H16–C14–N10–C6	0.00	TORS
C14–H16	0.152855	STRE	H7–C1–C6	83.5	BEND	O25–P17–C11–N10	0.00	TORS
P17–O25	0.244282	STRE	C2–C1–H7	147.10	BEND	H22–O21–P19–C14	–180.00	TORS
C14–P19	1.686215	STRE	H9–C5–C4	129.4	BEND	C–N–C–P19	0.00	TORS
C5–H9	0.573501	STRE	H8–C2–C1	129.4	BEND	H31–O30–C4–C5	–180.00	TORS
O21–H22	0.889433	STRE	H13–C11–N10	125.56	BEND	O21–P19–H16–C14	–180.00	TORS
N10–C11	1.361943	STRE	H12–C11–N10	72.81	BEND	H7–C1–C6–N10	0.00	TORS
N10–C14	1.336621	STRE	H15–C14–N10	117.78	BEND	H26–O25–17P–C11	–180.00	TORS
N10–C6	1.441129	STRE	H16–C14–N10	52.76	BEND	C5–C6–H7–C1	0.00	TORS
C3–C4	0.751126	STRE	H12–C11–H13	52.76	BEND	H28–O27–O25–P17	–180.00	TORS
C2–H8	0.573502	STRE	H15–C14–H16	170.53	BEND	H29–C3–H8–C2	–180.00	TORS
O30–H31	0.833427	STRE	C2–C1–C6	129.4	BEND	H15–C14–H16–P19	–180.00	TORS
O30–C4	1.090341	STRE	C3–C4–C5	129.4	BEND	O18–O25–H26–P17	0.00	TORS
P19–O21	1.676416	STRE	C2–C3–C4	83.50	BEND	O27–O25–H26–P17	–180.00	TORS
C1–H7	0.815851	STRE	C4–C5–C6	147.1	BEND	C1–C6–N10–C14	0.00	TORS
P19–O20	1.368264	STRE	C3–C2–C1	147.10	BEND	C14–O23–H24–P19	0.00	TORS
O25–H26	0.941147	STRE	O18–P17–C11	116.66	BEND	C2–C1–H7–C6	–180.00	TORS
C5–C6	1.068536	STRE	O27–P17–C11	117.78	BEND	P17–C11–N10–C6	–180.00	TORS
O27–H28	0.941146	STRE	O25–P17–C11	170.53	BEND	O30–C5–C3–C4	0.00	OUT
C3–H29	1.048986	STRE	N10–C14–P19	125.56	BEND	C11–C6–C14–N10	0.00	OUT
C14–H15	1.048986	STRE	C6–N10–C11	116.66	BEND	C5–C2–C6–H9	0.00	OUT
P17–O27	1.554846	STRE	C6–N10–C14	117.78	BEND	C2–C3–C5–H8	0.00	OUT
O23–H24	0.889433	STRE	H13–C11–P17	117.78	BEND	C3–C5–C2–C4	0.00	OUT
P17–O18	1.394185	STRE	H31–O30–C4	171.37	BEND	C4–C5–C1–C2	0.00	OUT
C1–C6	0.751125	STRE	P17–C11–N10	116.66	BEND	N10–P19–O23–C14	0.00	OUT
P19–O23	0.244282	STRE	O30–C4–C3	83.5	BEND	O20–P19–O23–H24	0.00	OUT
C2–C1	1.373877	STRE	C5–C6–N10	147.1	BEND			
P17–C11	1.784255	STRE	C1–C6–N10	129.4	BEND			
C4–C5	1.373878	STRE						

Table 3Optimized geometric data for **pAPac** using B3LYP/6-31G (d, p).

Bond	Bond length	Vib	Bond	Bond angle	Vib	Bond	Bond dihydral	Vib
P22–O26	0.492083	STRE	H29–O28–P20	153.80	BEND	P22–O26–H27–O23	–180.00	TORS
C1–C6	0.763333	STRE	H25–O24–P22	112.45	BEND	H12–O11–C3–C4	–180.00	TORS
O11–H12	0.906383	STRE	H31–O30–P20	116.89	BEND	C5–C6–N13–C17	–180.00	TORS
C5–C6	0.911886	STRE	H10–C5–C6	67.29	BEND	H15–C14–N13–C6	0.00	TORS
C14–H15	0.307912	STRE	H7–C1–C6	67.29	BEND	H19–C17–N13–C6	0.00	TORS
C17–H19	0.307913	STRE	H9–C4–C5	149.73	BEND	C17–P22–H27–O26	0.00	TORS
P22–C17	1.718352	STRE	H7–C1–C2	149.73	BEND	O24–P22–H27–O26	–180.00	TORS
P22–O24	1.704615	STRE	H8–C2–C1	142.98	BEND	C6–N13–C17–P22	0.00	TORS
N13–C6	1.465371	STRE	H15–C14–N13	93.75	BEND	H25–O24–P22–C17	–180.00	TORS
O24–H25	0.906384	STRE	H19–C17–N13	36.91	BEND	H16–C14–N13–C6	0.00	TORS
C5–H10	0.582822	STRE	H16–C14–N13	130.66	BEND	O28–P20–C14–N13	0.00	TORS
C14–H16	0.894411	STRE	H18–C17–N13	116.89	BEND	C14–N13–H19–C17	0.00	TORS
C2–H8	0.58282	STRE	H16–C14–H15	36.91	BEND	H29–O28–P20–C14	–180.00	TORS
C4–H9	0.696247	STRE	H18–C17–H19	153.8	BEND	H31–O30–O28–P20	–180.00	TORS
N13–C17	1.228771	STRE	C1–C6–C5	67.29	BEND	H18–C17–H19–N13	0.00	TORS
P20–O28	0.492083	STRE	C3–C2–C1	149.73	BEND	O30–O28–H29–P20	–180.00	TORS
P22–O23	1.25786	STRE	C2–C1–C6	142.97	BEND	O11–C3–H9–C4	–180.00	TORS
C1–H7	0.696245	STRE	C2–C3–C4	67.29	BEND	O21–20P–H29–O28	–180.00	TORS
N13–C14	1.387899	STRE	C4–C5–C6	149.73	BEND	P20–C14–N13–C6	–180.00	TORS
C3–C4	0.763332	STRE	O28–P20–C14	153.80	BEND	C5–C6–C4–H10	0.00	OUT
O28–H29	0.956977	STRE	C17–P22–O23	130.66	BEND	C2–C4–C3–H8	0.00	OUT
O26–H27	0.906384	STRE	H12–O11–C3	112.45	BEND	C4–C5–C3–H9	0.00	OUT
C3–C2	0.911886	STRE	N13–C17–P22	130.66	BEND	C3–C5–C2–C4	0.00	OUT
O30–H31	0.956977	STRE	P22–O26–H27	93.75	BEND	C1–C5–C4–H7	0.00	OUT
C17–H18	1.06663	STRE	C14–N13–C17	130.66	BEND	C4–C5–C1–C2	0.00	OUT
C4–C5	1.396987	STRE	O24–P22–O23	116.89	BEND	C2–C5–C6–C1	0.00	OUT
C2–C1	1.396986	STRE	O21–P20–O30	130.66	BEND	C1–C5–N13–C6	0.00	OUT
O11–C3	1.425496	STRE	O23–P22–O26	36.91	BEND	N13–P22–O26–C17	0.00	OUT
P20–O21	1.420756	STRE	C5–C6–N13	149.73	BEND			
P20–C14	1.814269	STRE	C1–C6–N13	142.97				
P20–O30	1.429387	STRE	O30–P20–C14	116.89				

in-plane bending and out-of-plane bending vibrations of the aromatic C–H group have also been identified for the titles compound and they are presented in Table 4. In the aliphatic region, the spectral positions of the strong asymmetric and symmetric stretch modes of the (CH₂) at 2918 and 2850 cm^{–1}, respectively, indicate an

ordered arrangement on the surface.

- C–C vibrations

The bands between 1650 and 1400 cm^{–1} in benzene derivatives

Table 4

Selected comparison of some experimental wavenumbers (cm^{-1}) with theoretical harmonic frequencies, ω (cm^{-1}) and infrared intensities, A^{IR} (km/mol) of the **mAPac**, **oAPac** and **pAPac** molecules.

Assignments	mAPac				oAPac				pAPac			
	Calculated frequencies (cm^{-1})			Exp. (cm^{-1})	Calculated frequencies (cm^{-1})			Exp. (cm^{-1})	Calculated frequencies (cm^{-1})			Exp. (cm^{-1})
	Unscaled	Scaled	A^{IR}		Unscaled	Scaled	A^{IR}		Unscaled	Scaled	A^{IR}	
vsO–H _{phos}	3938.38	3811.96	177.2	3681	3941.1	3814.61	162.33	3691	3941.44	3814.91	195.09	3692
vsO–H _{phos}	3936.99	3810.61	105.2	3673	3939	3812.57	282.93	3680	3937.43	3811.03	205.97	3676
vasO–H _{phos}	3932.2	3805.98	33.93	3664	3935.4	3809.04	74.7	3660	3936.39	3810.03	181.02	3660
vasO–H _{phos}	3920.96	3795.1	47.82	3658	3928.4	3802.28	113.72	3645	3927.9	3801.81	84.04	3641
vsO–H _{phenyl}	3910.79	3785.25	64.53	3642	3908.8	3783.36	112.43	3630	3907.56	3782.12	113.82	3629
vsC–H, β (H–C–H),	3364.31	3256.32	59.85	2970	3363	3255	5.2	2981	3363.45	3255.48	7.52	2984
vsC–H, β (H–C–N), ρ (H–C–N–C)	3363.07	3255.12	21.6	2965	3361.7	3253.79	11.58	2970	3361	3253.111	85.81	2963
vasC–H, β (H–C–C), ρ (C–C–H–C), $\rho_{\text{out}}(\text{C–C–H–C})$	3354.96	3247.27	25.78	2898	3353.7	3246.04	20.07	2918	3357.89	3250.101	18.71	2907
vasC–H, ρ (H–C–H–C)	3342.97	3235.66	6.92	2892	3351.5	3243.88	204.48	2898	3353.52	3245.87	57.34	2769
v C=C, v P(O)OH, β (C–C–H), ρ (C–C–H–C)	1629.37	1577.07	46.29	1603	1628.1	1575.85	1.43	1597	1618.37	1566.42	0.55	1648
γ C–H, β (H–C–N), ρ (O–P–H–C)	1460.83	1413.94	45.4	1402	1462.4	1415.43	71.65	1433	1461.89	1414.96	92.21	1471
α C–H, β (H–C–N), β (H–C–H)	1426.62	1380.83	9.45	1357	1420.5	1374.87	15.25	1362	1422.47	1376.8	14.82	1392
ω C–H, β (H–C–H), ρ (H–C–H–P)	1375.07	1330.93	7.18	1353	1385.7	1341.25	12.09	1314	1374.15	1330.03	12.15	1374
vC–O, β (H–C–H), ρ (H–C–N–C), ρ (H–O–C–C)	1321.9	1279.47	10.7	1294	1320.3	1277.88	17.92	1280	1305.42	1263.52	8.9	1272
α C–H, vC–N, β (H–O–C), β (C–C–N), β (C–C–H), β (C–C–H–C), $\rho_{\text{out}}(\text{C–C–H–C})$	1297.12	1255.48	23.61	1251	1294.7	1253.09	17.7	1286	1296.27	1254.65	2.08	1249
α C–H, β (H–C–N), ρ (H–C–N–C)	1272.15	1231.31	26.18	1227	1280.5	1239.43	23.72	1233	1278.11	1237.08	28.22	1228
γ C–H, v P=O, γ P–C–H	1222.00	1182.77	123.7	1202	1222.1	1182.82	83.26	1198	1224.71	1185.39	4.29	1197
α C–H, β (H–C–H), ρ (H–C–N–C)	1198.82	1160.34	80.83	–	1191.3	1153.01	236.31	1118	1190.39	1152.17	204.42	1168
ω C–H, β (H10–C1–C2), β (H–C–H), β (H–O–C)	1140.84	1104.22	138	1101	1145.5	1108.7	59.05	1093	1143.88	1107.16	68.14	1100
γ C–H, δ C–H, β (C–N–C), ρ (H–C–N–C), ρ (O–P–C–N)	1133.37	1096.99	59.07	1074	1139.6	1103.01	7.09	1046	1134.79	1098.36	92.14	1077
v N–Caliph, ρ (C–O–H–P), δ (=CH) ip/Ph,	1035.53	1002.29	0.96	1026	1036.9	1003.64	15.02	1039	1070.95	1036.57	16.8	1049
v(N–Caliph), β (H–C–C), β (C–O–H), β (C–C–C)	1011.52	979.05	0.88	968	1030.3	997.19	33.93	986	1023.13	990.28	47.81	985
ρ (O–P–C–N), ρ (H–O–P–C), ρ (C–C–H–C)												
ω C–H, β (H–C–C), ρ (C–C–H–C), ρ (C–C–H–C)	826.88	800.337	15.69	799	817.28	791.04	16.43	889	821.6	795.22	31.98	830
δ C–H, γ (C–P), β (H–C–C), β (O–P–C), β (H–O–P), ρ (O–P–C–N)	786.78	761.524	34.44	768	794.61	769.1	79.43	741	817.46	791.219	6.91	814
δ C–H, v(C–P), β (H–O–P), β (H–C–H), ρ (O–P–C–N), ρ (H–C–N–C)	672.12	650.545	143.9	667	667.07	645.65	83.68	696	705.3	682.65	188.5	737

v, stretching; γ , rocking; α , scissoring; δ , twisting; ω , wagging; β : in plane bending; ρ : torsion, ρ_{out} outplane.

were assigned to C–C stretching modes [63]. Accordingly, in the present study, the carbon–carbon vibrations of the title compound were observed at 1584 and 1714 cm^{-1} in the FT-IR spectrum. The ring C–C and C=C stretching vibrations [64], known as semi-circular stretching usually occur in the regions 1380–1280 and 1625–1430 cm^{-1} , respectively. The C–C stretching vibrations of mAPac, oAPac and pAPac are observed at 1301 and 1155 cm^{-1} in the FT-IR spectrum. In accordance with above calculated data in our present study, the bands for C=C stretching vibrations are observed at 1622, 1501, and 1488 cm^{-1} in FT-IR spectrum. These observed frequencies show that the substitutions in the ring to some extent about the ring mode of vibrations. The comparisons of the theoretically computed values are found to be in good agreement with the theoretical values obtained by B3LYP/6-31G (d, p) method.

• P=O, P–C, P–OH vibrations

Compounds containing R–PO₃H₂ groups can be characterized based on their P=O stretching, v(P=O), P–O(H) stretching, v(P–O), and P–C stretching, v(P–C) vibrations. However, in the case of compounds with long alkyl chains or strong ring deformation vibrations these characteristic above-mentioned bands can be easily

obscured. Additionally, in the presence of the strong hydrogen bonds that are often encountered in these compounds, v(P=O) and v(P–O) can be broadened and down-shifted below expected regions. The modes associated with this group are seen in the IR spectra as medium to strong absorptions, but it is necessary to stress that their exact frequencies are often uncertain because of the complexity of the modes, that appear in these regions. However, with the help of DFT calculations and comparison with the FT-IR spectra the assignment of the observed FT-IR bands is possible. This procedure allows extracting from the FT-IR spectra characteristic modes associated with the –PO₃H₂ groups. The –PO₃H₂ group gives rise to several vibrational bands. The stretch mode of the (P=O) at 1227 cm^{-1} , the asymmetric and symmetric stretch modes of the (P–O) at 1078 and 1004 cm^{-1} , and the deformation mode of the (P–O–H) feature clearly present at 956 cm^{-1} . Thus, the P=O and P–O stretchings are observed at 1257 cm^{-1} and in the range of 941–760 cm^{-1} , respectively. On the other hand, v(P–O) is observed at 810 cm^{-1} .

• C–N vibrations

To identify the C–N stretching frequency is a rather difficult task from other vibrations. Silverstein et al. [65]. Assigned C–N

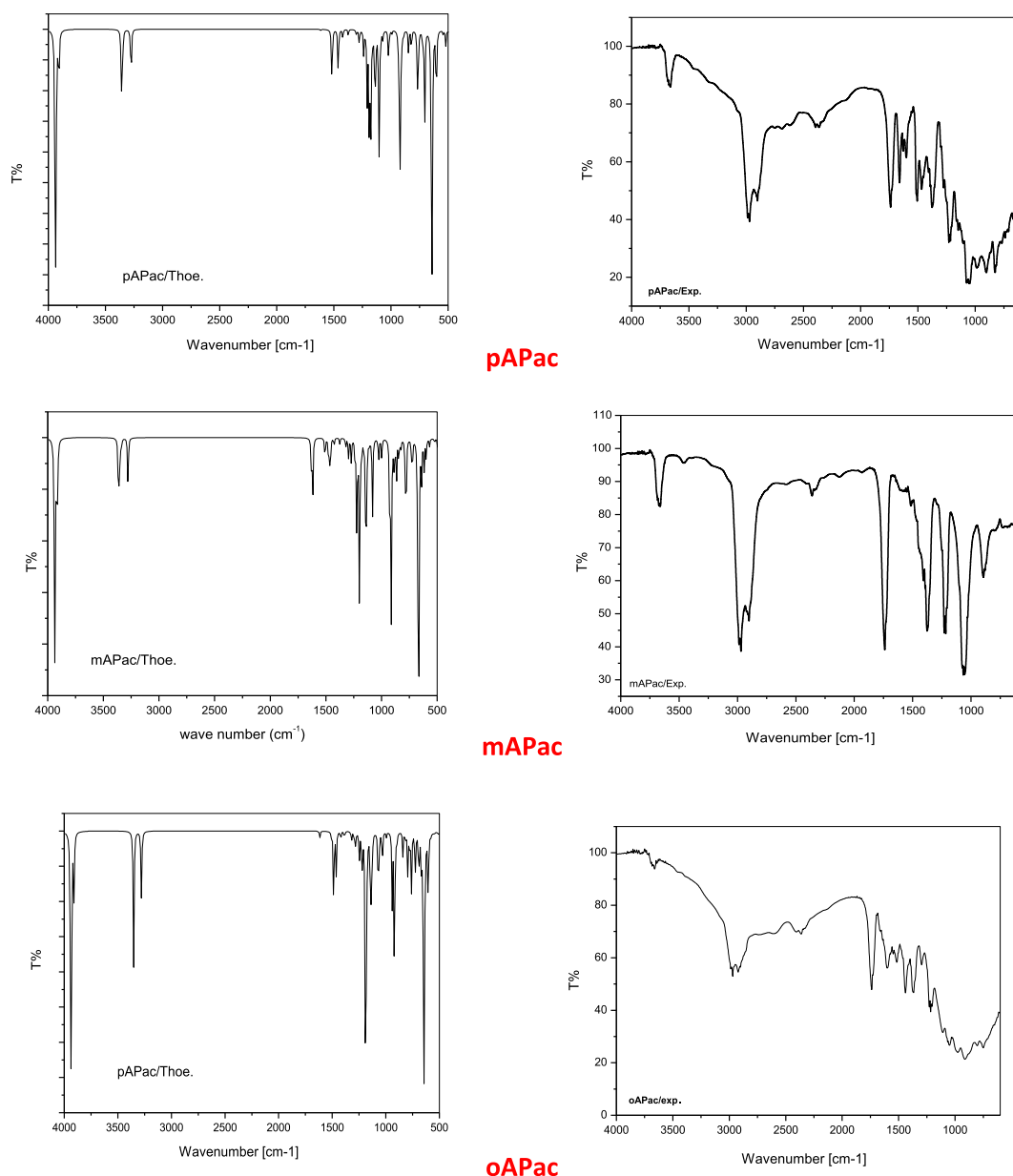


Fig. 2. Theoretical and experimental FT-IR spectrum of **pAPac**, **mAPac** and **oAPac**.

stretching absorption in the region $1382\text{--}1266\text{ cm}^{-1}$. In mAPac, oAPac and pAPac, the C–N stretching bands are found to be present at 1307 and 1382 cm^{-1} . The C–N in-plane bending vibrations are found to be at 432 and 431 cm^{-1} during computation by B3LYP/6-31G(d, p) and B3LYP/6-31G (d, p), respectively while the experimentally assigned value is 430 cm^{-1} .

- O–H and C–O vibrations

Hydrogen bonding alters the frequencies of the stretching and bending vibration. The O–H stretching bands move to lower frequencies usually with increased intensity and band broadening in the hydrogen bonded species. Hydrogen bonding if present in five or six member ring system would reduce the O–H stretching band to $3200\text{--}3550\text{ cm}^{-1}$ region. In the present study, for mAPac, oAPac and pAPac, the stretching vibration of the hydroxyl group is observed at 3900 cm^{-1} and 3800 cm^{-1} in the FT-IR spectrum. The

bending vibrations of the alcohol group are also identified and listed in Table 4. The strong band observed in the region $1350\text{--}1270\text{ cm}^{-1}$ may be due to C–O stretching vibrations for mAPac, oAPac and pAPac. The comparison of the theoretically computed values are found to be in good agreement with the theoretical values obtained by B3LYP/6-31G (d, p) method.

3.5. Mulliken atomic charges

The Mulliken atomic charges calculated by methods B3LYP/6-31G (d, p) method are collected in Table 5. It is worthy to mention that C4/C6, C1/C6 and C3/C6 atoms of the mAPac, oAPac and pAPac molecules, respectively, exhibit positive charge while the other carbon atoms exhibit negative charges. Oxygen has a maximum negative charge value between (-0.546949) and (-0.616407) in the OH group for phenolic and phosphonic groups. The maximum positive atomic is obtained for P which is

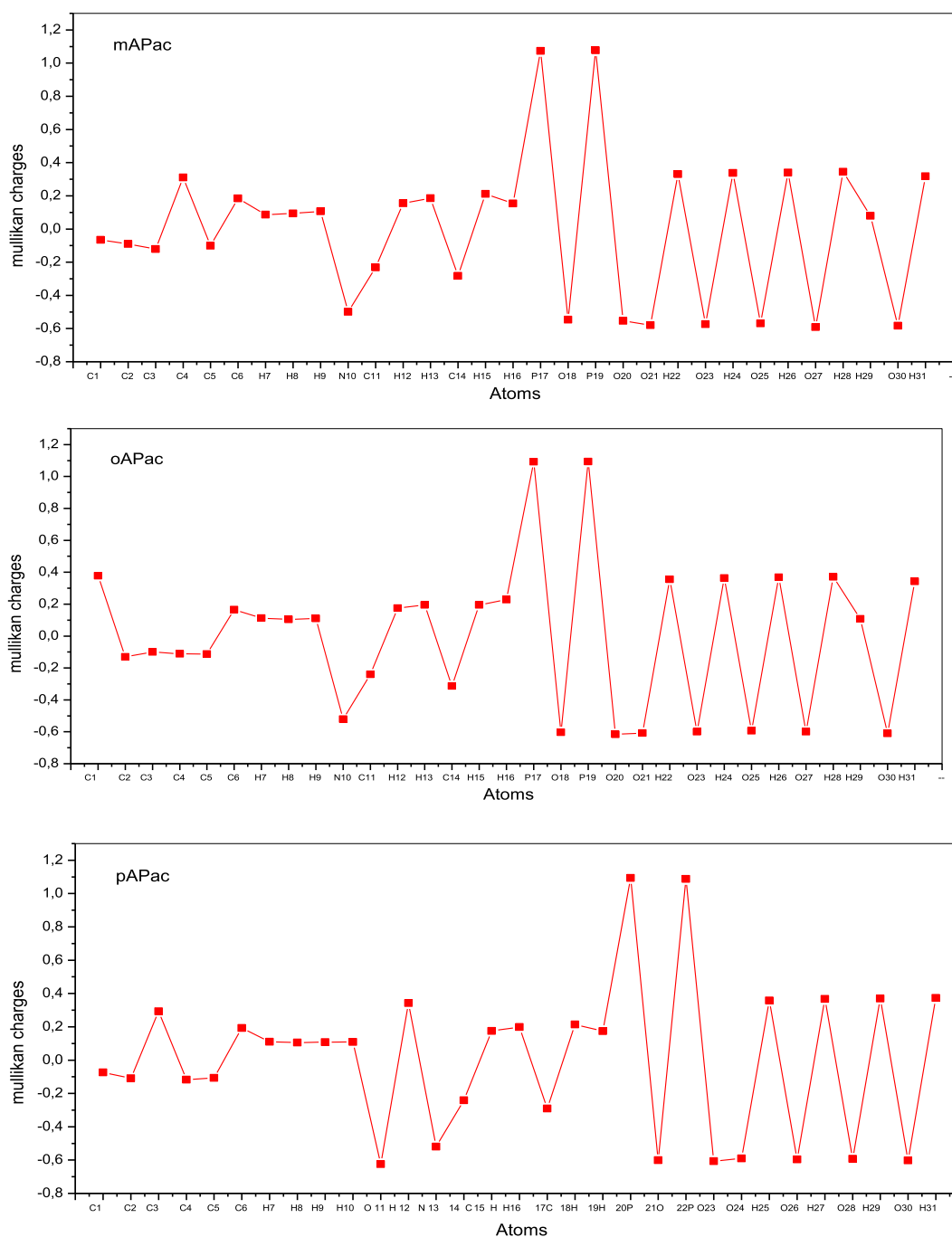


Fig. 3. Mulliken atomic charges distribution calculated by B3LYP/6-31G(d,p) of mAPac, oAPac and pAPac.

phosphorus present in the phosphonic functional group. The charge on H18 in the functional group has the maximum magnitude of 0.214269 among the hydrogen atoms present in the pAPac molecule at 6-31G (d,p). However all the hydrogen atoms exhibit a net positive charge in 6-31G (d,p) basis set. The presence of large negative charge on O and N atom and net positive charge on H atom may suggest the formation of intermolecular interaction in solid forms [66].

3.6. Molecular electrostatic potential (MEP) maps

MEP for title molecules is calculated by B3LYP/6-31G(d, p)

method as shown in Fig. 4. The color code of these maps is in the range between -1.919 a.u. (Deepest red (in web version)) to 1.919 a.u. (deepest blue (in web version)), -1.094 a.u. to 1.094 a.u. and -1.093 a.u. to 1.093 a.u. mAPac (a), oAPac (b) and pAPac (c), respectively. The positive (blue (in web version)) regions of MEP are related to electrophilic reactivity and the negative (green (in web version)) regions to nucleophilic reactivity shown in Fig. 4. In MEP map, the maximum negative electrostatic potential is noted over O₂, O₃ atoms. The results of the MEP show that negative potential are presented at electronegative oxygen atoms, whereas positive potential are present at hydrogen atoms. Molecular electrostatic potential map can be confirmed with the finding of the Fukui

Table 5
Mulliken atomic charges calculated by B3LYP/6-31G (d, p) of mAPac, oAPac and pAPac.

Atom	mAPac	Atom	oAPac	Atom	pAPac
C1	−0.065899	C1	0.377481	C1	−0.073228
C2	−0.090678	C2	−0.130153	C2	−0.109289
C3	−0.121001	C3	−0.099828	C3	0.292834
C4	0.310492	C4	−0.111706	C4	−0.116952
C5	−0.100285	C5	−0.112394	C5	−0.106983
C6	0.184095	C6	0.165884	C6	0.192699
H7	0.086645	H7	0.112195	H7	0.11000
H8	0.093656	H8	0.104121	H8	0.106044
H9	0.106178	H9	0.109841	H9	0.107736
N10	−0.499343	N10	−0.520714	H10	0.109053
C11	−0.231965	C11	−0.239528	O11	−0.623819
H12	0.155222	H12	0.175333	H12	0.342532
H13	0.185715	H13	0.194650	N13	−0.519696
C14	−0.282459	C14	−0.312739	C14	−0.240616
H15	0.211108	H15	0.194945	H15	0.175311
H16	0.153503	H16	0.228101	16H	0.199128
P17	1.073409	P17	1.092504	C17	−0.290936
O18	−0.546949	O18	−0.60326	H18	0.214269
P19	1.076757	P19	1.093500	H19	0.173388
O20	−0.553940	O20	−0.616407	P20	1.093179
O21	−0.579129	O21	−0.607241	O21	−0.601221
H22	0.330274	H22	0.355569	P22	1.087211
O23	−0.573631	O23	−0.599629	O23	−0.607068
H24	0.337737	H24	0.363640	O24	−0.590124
O25	−0.568923	O25	−0.594116	H25	0.357731
H26	0.340583	H26	0.3687490	O26	−0.596502
O27	−0.590785	O27	−0.6000793	H27	0.366984
H28	0.345508	H28	0.3708720	O28	−0.592762
H29	0.079193	H29	0.1078850	H29	0.369525
O30	−0.582864	O30	−0.6104822	O30	−0.601557
H31	0.317778	H31	0.3430063	H31	0.373128

descriptors.

3.7. HOMO-LUMO energy gap and related molecular properties

The atomic orbital compositions of the frontier molecule orbital are sketched in Fig. 5. The isomers with a larger E_{HOMO} were oAPac and pAPac with -0.22451 and -0.23225eV , respectively. On the other hand, smaller energy of the LUMO indicated larger electron affinity, as represented by mAPac. HOMOs and LUMOs showed the same activity centers in all isomers. The HOMO was mainly delocalized on the bonds of the OH-substituted phenyl ring, the phenyl ring and the N–C bond. The greatest contributions to the HOMO were from the atoms C1–C6 in the aromatic ring containing the OH group, C11 and C14 in the methylene groups, N10 of the amino group, and O30 of the hydroxyl group, according to their coefficients (Table 6). Clearly, the greatest contribution to the HOMO was from the oxygen atom of the phosphonic groups in all isomers. On the other hand, LUMO was main delocalized on the atoms the aromatic ring. The great contributions to LUMO were those of the C1–C6 for mAPac and pAPac, and N10 of the amino group, C11 and C14 in the methylene groups also contributed to LUMO for oAPac (Table 6).

3.8. Chemical reactivity

- Hardness/softness

Table 6 contains the computed chemical hardness values for all compounds. The results indicate that compound pAPac is most stable and harder than others and stability order is: pAPac (0.10967 eV) $\approx$ oAPac (0.10568 eV) $>$ mAPac (0.071025 eV). In addition, The results (Table 6) indicate that compound mAPac, with smaller LUMO/HOMO gap, is most softer, less stable and more

reactive than oAPac and pAPac

- Vertical ionization potential (VIP) and vertical electron affinity

In the present study, the ionization potential of mAPac, oAPac and pAPac are 0.31999eV , 0.22451eV and 0.23225eV , respectively as shown in Table 6, which clearly indicates that the pAPac and oAPac are very stable.

- Electronegativity/electrophilicity

The values of μ for all compounds are presented in Table 6. The greater the electronic chemical potential, the less stable or more reactive is the compound. The trend in electronic chemical potential is mAPac (-1.00415 eV) $>$ oAPac (-2.10384 eV) $\approx$ pAPac (-2.03948 eV). The electrophilicity values for compounds mAPac, oAPac and pAPac, respectively, are presented in Table 6. The compound oAPac and pAPac are found to be most stable and strongest nucleophile whereas mAPac is the strongest electrophile.

- Dipole moment, polarizability and first order hyperpolarizability calculations

The values of static mean polarizabilities, anisotropy of polarizabilities and total first hyperpolarizabilities of the studied compounds calculated at the same level of theory and the same basis set for the title molecules, can provide a reasonable comparison of these quantities, in the absence of experimental data. The total intrinsic hyperpolarizability β_{TOTAL} of pAPac isomer is fairly larger as compared to the other two counterparts (Table 7).

3.9. Thermodynamic properties

The thermodynamic parameters are presented in Table 8. The global minimum energy obtained for structure optimization of pAPac, mAPac and oAPac has been calculated to -1576.79072 , -1576.75634 and -1576.77884a.u. , respectively. The thermodynamic data provide helpful information for the further study on the title compound, when these may be used as a reactant to take part in a new reaction. These standard thermodynamic functions can be used as reference thermodynamic values to calculate the changes of entropies (ΔS_{T}), changes of enthalpies (ΔH_{T}) and changes of Gibbs free energies (ΔG_{T}) of the reaction. There is no much deviation in the thermodynamic properties calculated from these methods. On the basis of vibrational analysis at B3LYP/6-31G(d, p) level, the standard statistical thermodynamic functions: heat capacity ($C_{\text{m,p}}^{\circ}$), entropy (S_{m}°), and enthalpy changes ($\Delta H_{\text{m}}^{\circ}$), for the title compounds were obtained from the theoretical harmonic frequencies and listed in Table 9. From Table 9, it can be observed that these thermodynamic functions are increasing with temperature ranging from 100 to 1000 K due to the fact that the molecular vibrational intensities increase with temperature [67]. The correlation equations between heat capacities, entropies, enthalpy changes and temperatures were fitted by quadratic formulas:

- For mAPac

$$S_{\text{m}}^{\circ} = 234,31256 + 1,13222T - 3,0766 \cdot 10^{-4}T^2 \quad (R^2 = 0.99998)$$

$$C_{\text{p,m}}^{\circ} = 18,53023 + 1,02928T - 5,05486 \cdot 10^{-4}T^2 \quad (R^2 = 0.99827)$$

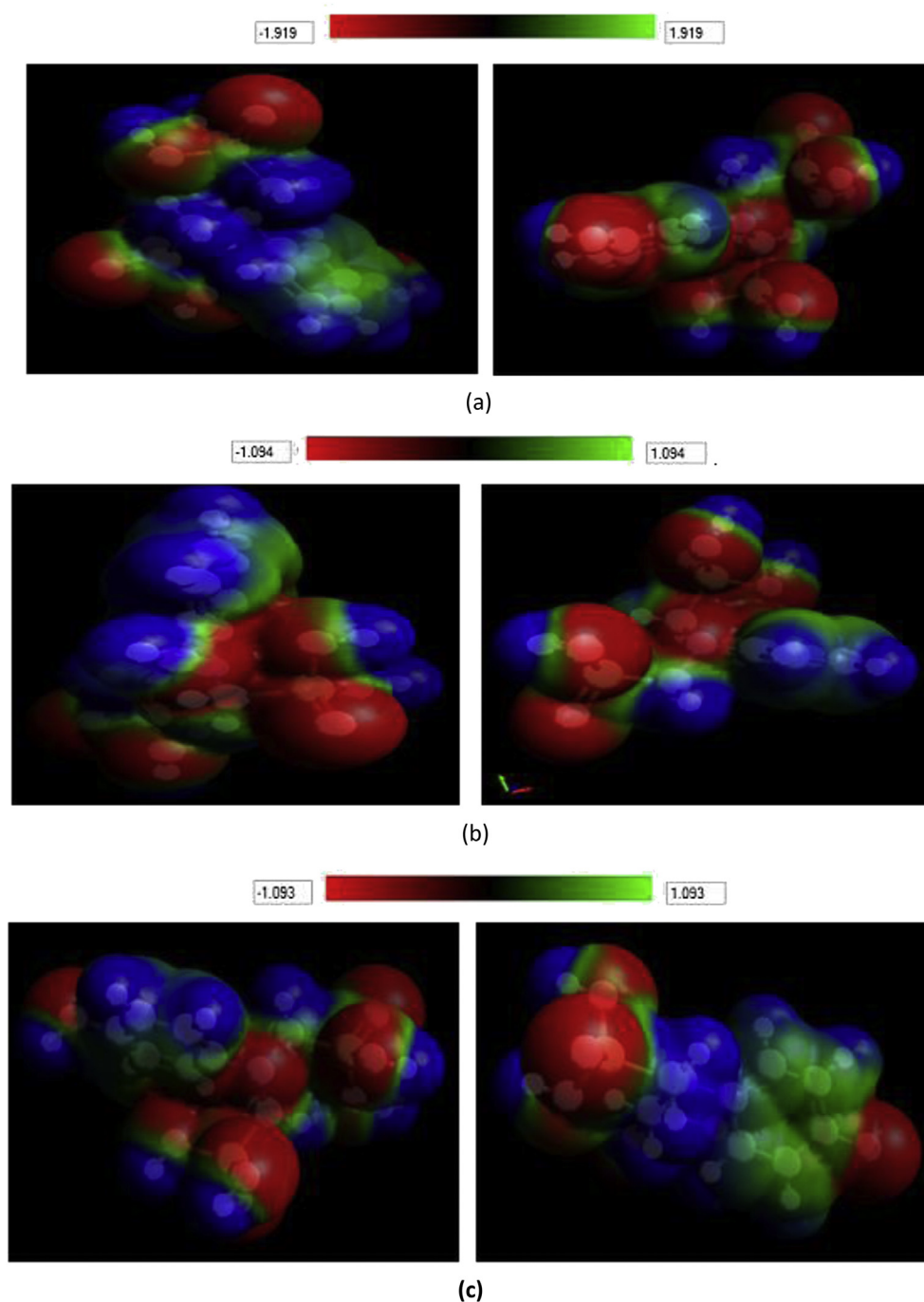


Fig. 4. Molecular Electrostatic Potential of **mAPac** (a), **oAPac** (b) and **pAPac** (c).

$$\Delta H^\circ = -16,09952 + 0,15181T + 2,3257 \cdot 10^{-4}T^2$$

$$(R^2 = 0.99908)$$

• For **oAPac**

$$S_m^\circ = 246,15728 + 1,12742T$$

$$- 3,0481 \cdot 10^{-4}T^2 \quad (R^2 = 0.99998)$$

$$C_{p,m}^\circ = 18,59004 + 1,0255T$$

$$- 5,01745 \cdot 10^{-4}T^2 \quad (R^2 = 0.9984)$$

$$\Delta H^\circ = -15,73854 + 0,15057T + 2,33093 \cdot 10^{-4}T^2$$

$$(R^2 = 0.99908)$$

• For **pAPac**

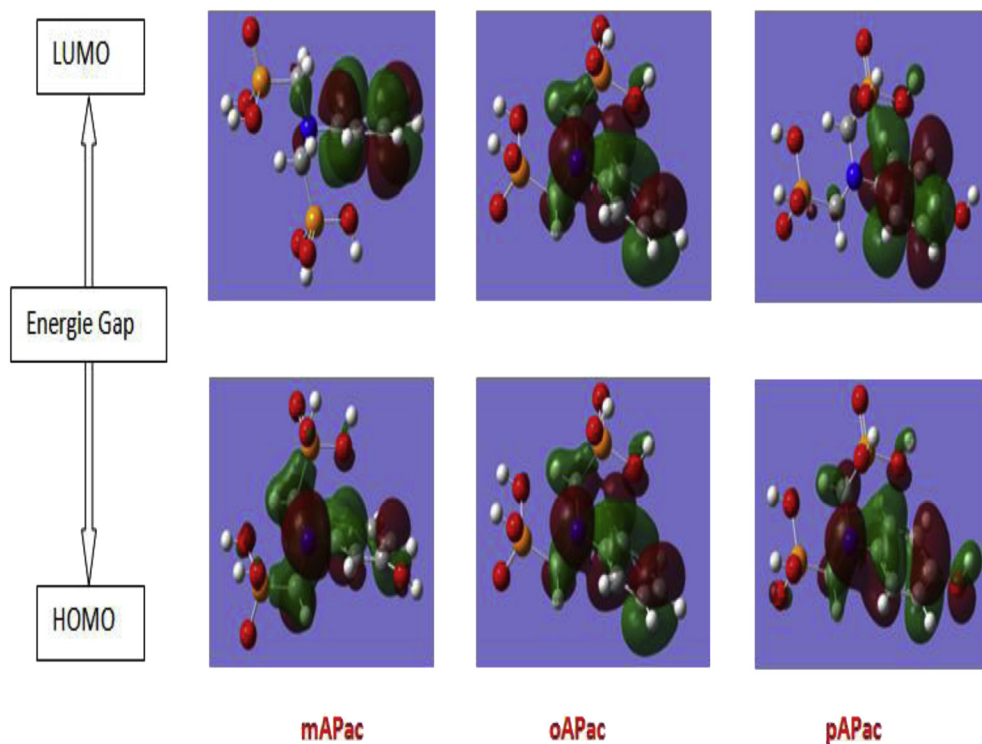


Fig. 5. Atomic orbital composition of the frontier molecule for **mAPac**, **oAPac** and **pAPac**.

Table 6

Comparison of HOMO, LUMO, energy gaps (HOMO–LUMO) and related molecular properties of **mAPac**, **oAPac** and **pAPac** (eV).

Molecular energy	B3LYP/6-31G(d, p)		
	mAPac	oAPac	pAPac
E_{LUMO}	−0.17794	−0.01315	−0.01291
E_{HOMO}	−0.31999	−0.22451	−0.23225
Energy gap (Δ)	0.14205	0.21136	0.21934
Ionization potential (I)	0.31999	0.22451	0.23225
Electron affinity (A)	0.17794	0.01315	0.01291
Global hardness (η)	0.07102	0.10568	0.10967
Global softness (σ)	7.03977	4.73126	4.55913
Chemical potential (μ)	−1.00415	−2.1038	−2.03948
Electronegativity (χ)	0.24896	0.11883	0.12258
Global electrophilicity (ω)	0.43635	0.06680	0.06850

$A = -E_{\text{LUMO}}$, $I = -E_{\text{HOMO}}$, $\eta = 1/2(E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}})$, $\mu = 1/2(E_{\text{HOMO}} + E_{\text{LUMO}})$, $\omega = \mu^2/2\eta$, $\sigma = 1/2\eta$.

$$S_m^\circ = 237,22895 + 1,13553T \\ - 3,09817.10^{-4}T^2 \quad (R^2 = 0.99998)$$

$$C_{p,m}^\circ = 19,45479 + 1,02767T \\ - 5,04654.10^{-4}T^2 \quad (R^2 = 0.99828)$$

$$\Delta H^\circ = -16,0437 + 0,1525T + 2,32245.10^{-4}T^2 \\ (R^2 = 0.99909)$$

The corresponding fitting equations are as follows and the correlation graphics from those shows in Figs. 6–8. All the thermodynamic data supply helpful information for the further study on the mAPac, oAPac and pAPac. All thermodynamic calculations were

Table 7

The B3LYP/6-31G (d,p) calculated electric dipole moments (Debye), polarizability (in a.u.), β components and β_{tot} value of **mAPac**, **oAPac** and **pAPac**.

Parameters	mAPac	oAPac	pAPac
μ_x	2.6174	3.9358	2.0497
μ_y	0.0615	−1.2768	2.4779
μ_z	0.634	0.9842	2.9942
μ_{tot}	2.6938	4.2531	4.3939
α_{xx}	−94.6348	−98.349	−98.618
α_{yy}	−130.0688	−128.5653	−136.7073
α_{zz}	−117.4523	−108.3636	−114.8732
$\langle\alpha\rangle$	−114.0519	−111.7593	−116.7328
$\Delta\alpha$	21.9964	18.8508	23.40808
β_{xxx}	−2.6113	12.0406	−39.7927
β_{xxy}	48.1408	100.2274	146.4142
β_{xyy}	77.3883	28.4447	40.7512
β_{yyy}	−25.8796	−12.9892	15.5488
β_{xxz}	29.5875	32.4841	57.7719
β_{xyz}	29.3361	29.5958	13.4553
β_{yyz}	46.6792	49.5103	64.8758
β_{xzz}	−8.3855	22.8746	7.5526
β_{yzz}	24.158	4.5709	8.0324
β_{zzz}	9.3629	−23.9124	7.2445
β_{TOTAL}	128.425	161.518259	261.534

done in gas phase and they could not be used in solution.

4. Conclusion

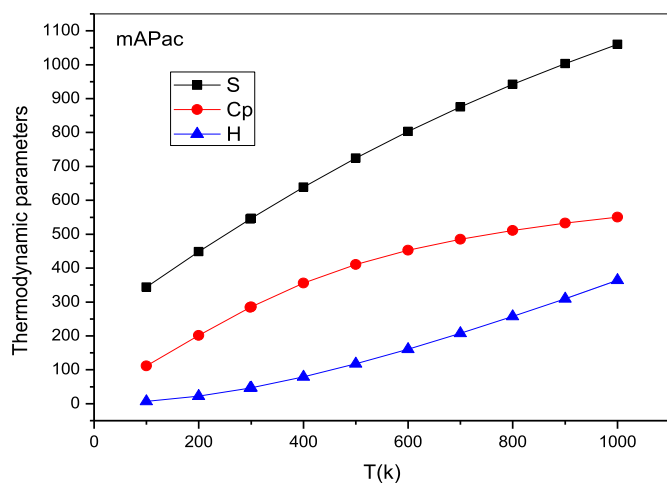
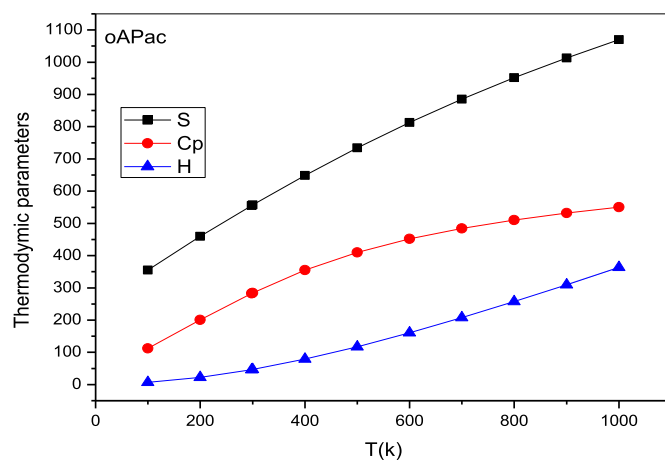
In this study, three α -aminophosphonic acids were successively synthesized and characterized using various spectroscopic methods and elemental analysis. The structure of the three α -aminophosphonic acids was optimized by DFT methods using the basis sets 6–31 G (d, p). Using the optimized geometry, the geometrical parameters, vibrational frequencies, frontier orbital

Table 8Calculated thermodynamic parameters of **pAPac**, **mAPac** and **oAPac** employing B3LYP/6-31G (d, p) method.

	mAPac	oAPac	pAPac
SCF energy (a.u.)	−1576.75634	−1576.77884	−1576.79072
Total energy (thermal), E total (kcal. mol ^{−1})			
TOTAL	150.788	150.977	150.721
Electronic	0.000	0.000	0.000
Translational	0.889	0.889	0.889
Rotational	0.889	0.889	0.889
Vibrational	149.01	149.199	148.943
Heat capacity at const. volume, C _v (cal. mol ^{−1} K ^{−1})			
TOTAL	65.872	65.602	65.998
Electronic	0.000	0.000	0.000
Translational	2.981	2.981	2.981
Rotational	2.981	2.981	2.981
Vibrational	59.911	59.640	60.037
Entropy, S (cal. mol ^{−1} K ^{−1})			
TOTAL	130.183	132.718	131.094
Electronic	0.000	0.000	0.000
Translational	42.963	42.963	42.963
Rotational	33.994	33.678	34.020
Vibrational	53.226	56.077	54.111
Vibrational energy, E _{vib} (kcal. mol ^{−1})	149.01		
Zero-point vibrational energy, E ₀ (kcal mol ^{−1})	140.29465	140.47206	140.16995
Rotational constants (GHz)			
A	0.4422407	0.4871643	0.4843607
B	0.2494768	0.2721775	0.2328536
C	0.1899396	0.217278	0.1809694

Table 9Thermodynamic properties at different temperatures at the B3LYP/6-311++G(d,p) level of **mAPac**, **oAPac** and **pAPac**.

T (K)	S _m (J/mol.K)			C _{p,m} (J/mol.K)			ΔH° (kJ/mol)		
	mAPac	oAPac	pAPac	mAPac	oAPac	pAPac	mAPac	oAPac	pAPac
100	343.57	354.99	346.64	111.51	112.08	112.22	6.8	7.02	6.91
200	448.65	459.73	452.2	201.58	200.4	202.32	22.48	22.64	22.66
298.15	544.79	555.4	548.61	283.92	282.79	284.45	46.38	46.43	46.62
300	546.56	557.16	550.37	285.37	284.24	285.89	46.91	46.95	47.15
400	638.68	648.99	642.62	355.87	354.96	356.23	79.1	79.05	79.39
500	724.26	734.39	728.28	410.75	410.03	411.04	117.56	117.42	117.87
600	803.02	813.03	807.08	452.58	452.01	452.83	160.82	160.61	161.16
700	875.32	885.25	879.42	485.01	484.55	485.23	207.76	207.51	208.13
800	941.84	951.71	945.96	510.99	510.61	511.18	257.6	257.31	257.99
900	1003.3	1013.13	1007.45	532.47	532.14	532.62	309.81	309.48	310.21
1000	1060.37	1070.17	1064.53	550.66	550.38	550.79	363.99	363.63	364.41

**Fig. 6.** Correlation graph of thermodynamic functions for mAPac.**Fig. 7.** Correlation graph of thermodynamic functions for oAPac.

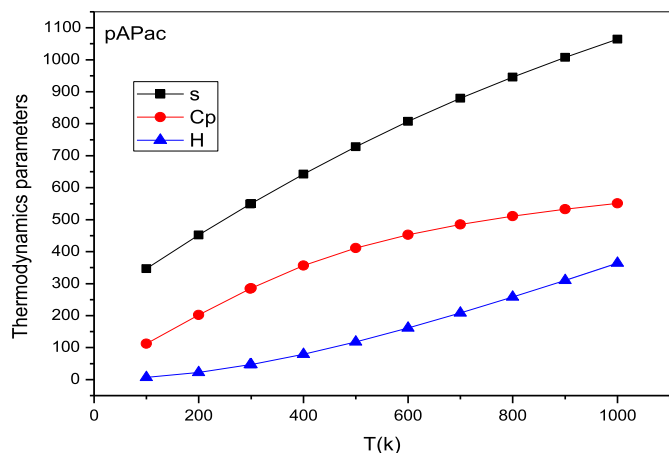


Fig. 8. Correlation graph of thermodynamic functions for pAPac.

band gap, MESP surfaces, etc. of the titles compound have been calculated and have been found to agree well with experimentally reported values. The results indicates that compound mAPac, with smaller LUMO/HOMO gap, is softer, less stable, strongest electrophile and more reactive than oAPac and pAPac. The thermodynamic data provide helpful information for the further study on the titles compound. The correlations between the statistical thermodynamics and temperature are also obtained. It is seen that the heat capacities, entropies and enthalpies increase with the increasing temperature owing to the intensities of the molecular vibrations increase with increasing temperature.

Acknowledgment

Authors are thankful to the LEMMC-Sétif laboratory.

References

- [1] P. Kafarski, B. Lejczak, in: Chemistry, Biological Activity, V.P. Kukhar, H.R. Hudson (Eds.), Aminophosphonic and Aminophosphinic Acids, vol. 407–442, John Wiley & Sons, Chichester, 2000.
- [2] M. Ordóñez, J.L. Viveros-Ceballos, C. Catiavela, A. Arizpe, Curr. Org. Synth. 310–341 (2012) 9.
- [3] M. Ordóñez, F.J. Sayago, C. Catiavela, Tetrahedron 6369–6412 (2012) 68.
- [4] Z.H. Kudzin, M.H. Kudzin, J. Drabowicz, C.V. Stevens, Curr. Org. Chem. 2015–2071 (2011) 15.
- [5] F. Palacios, C. Alonso, J.M. de los Santos, Chem. Rev. 899–932 (2005) 105.
- [6] S.C. Fields, et al, Tetrahedron 12237–12273 (1999) 55.
- [7] (a) O. Abderrahim, M.A. Didi, B. Moreau, D. Villemin, Solv. Extr. Ion Exch. 943 (2006) 24; (b) N.E. Belkhouche, M.A. Didi, R. Romero, J.A. Jonsson, D. Villemin, J. Membr. Sci. 398 (2006) 284.
- [8] C.J. Morin, M. Carli, N. Mofaddel, R. Al Rifai, P. Jaffrès, D. Villemin, P.L. Desbène, Chromatographia 139–143 (2005).
- [9] (a) K.D. Demadis, S.D. Katarachia, M.K. Koutmos, Inorg. Chem. Comm. 254 (2005) 8; (b) K.D. Demadis, M. Papadaki, R.G. Raptis, H. Zhao, J. Solid State Chem. 679 (2008) 181; (c) H. Amar, J. Benzakour, A. Derja, D. Villemin, B. Moreau, J. Electroanal. Chem. 131 (2003) 558; (d) H. Amar, T. Braisaz, D. Villemin, B. Moreau, Mater. Chem. Phys. 1 (2008) 110.
- [10] J. Sopkova de Oliveria Santos, V. Montouillot, F. Fayon, C. Fernandez, L. Delain-Bioton, D. Villemin, P.A. Jaffrès, New J. Chem. 1244 (2004) 28.
- [11] (a) A. Turner, P.A. Jaffrès, E.J. MacLean, D. Villemin, V. McKee, G.B. Hix, J. Chem. Soc. Dalton Trans. 1314 (2003); (b) D. Kong, J. Zon, J. McBee Clearfield, Inorg. Chem. 977 (2006) 45.
- [12] D. Villemin, B. Moreau, F. Simeon, G. Maheut, C. Fernandez, V. Montouillout, V. Caignaert, P.A. Jaffrès, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 2060 (2001).
- [13] P.H. Mutin, G. Guerrero, A.C.R. Vioux, C. R. Chim. 1153 (2003) 6.
- [14] T. Georgelin, B. Moreau, N. Bar, D. Villemin, V. Cabuil, O. Horner, Sens. Actuators 451 (2008) 134.
- [15] J. Beck, S. Gharbi, A. Herteg-Ferneae, L. Vercheval, C. Bebrone, P. Lassaux, A. Zervosen, J. Marchand-Brynaert, Eur. J. Org. Chem. 85 (2009).
- [16] K. Moedritzer, R. Irani, J. Org. Chem. 1603 (1966) 31.
- [17] W. Kohn, L.J. Sham, Phys. Rev. 1133–1138 (1965) 140.
- [18] A.D. Becke, J. Chem. Phys. 648–5652 (1993) 98.
- [19] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, Phys. Rev. 785–789 (1998) 37.
- [20] B. Miehlich, A. Savin, A. Stoll, H. Preuss, Chem. Phys. Lett. 200–206 (1989) 157.
- [21] M.J. Frisch et al., Gaussian, Inc., Wallingford CT, (2009).
- [22] A. Frisch, A.B. Nielson, A.J. Holder, GAUSSVIEW User Manual, Gaussian Inc., Pittsburgh, PA, 2000.
- [23] A.P. Scott, L. Radom, J. Phys. Chem. 16503–16513 (1996) 100.
- [24] M.H. Jamroz, Vibrational Energy Distribution Analysis, VEDA 4 program, Warsaw (, 2004).
- [25] R.I. Dennington, T. Keith, J. Millam, K. Eppinnett, W. Hovell, Gauss View Version 3.09, 2003.
- [26] I. Sidir, Y.G. Sidir, M. Kumalar, E. Tasal, J. Mol. Struct. 964 (2010) 134.
- [27] K. Jug, Z.B. Maksic, Part 3, in: Z.B. Maksic (Ed.), Theoretical Model of Chemical Bonding, Springer, Berlin, 1991, p. 29, p. 233.
- [28] S. Fliszar, Charge Distributions and Chemical Effects, Springer, New York, (1983).
- [29] A. Vektariene, R. Janciene, in: 13th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-13), 2009.
- [30] K. Fukui, T. Yonezawa, H. Shingu, J. Chem. Phys. 722 (1952) 20.
- [31] D.F.V. Lewis, C. Ioannidis, D.V. Parke, Xenobiotica 401–408 (1994) 24.
- [32] L. Padmaja, C. Ravikumar, D. Sajan, I. Hubert Joe, V.S. Jayakumar, G.R. Pettit, O. Fauriskov-Nielsen, J. Raman Spectrosc. 419–428 (2009) 40.
- [33] C. Ravikumar, I. Hubert Joe, V.S. Jayakumar, Chem. Phys. Lett. 552–558 (2008) 460.
- [34] J.I. Aihara, Phys. Chem. 3121–3125 (2000) 2.
- [35] R. Reddy, P. Kalyani, B.R. Rao, P. Manikyamba, 47A, Ind. J. Chem. 236–239 (2008).
- [36] A. Vektariene, G. Vektaris, J. Svoboda, in: 11th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry (ECSOC-11) 1–30, 2007.
- [37] A.G. Vektaris, J. Svoboda, Arkivoc(vii) 311–329 (2009).
- [38] H. Xu, K.C. Zheng, H. Deng, L.J. Lin, Q.L. Zhang, L.N. Ji, New J. Chem. 1255–1263 (2003) 27.
- [39] J.F. Janak, Phys. Rev. B 7165–7168 (1978) 18.
- [40] R.G. Pearson, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 8440–8441 (1986) 83.
- [41] R.G. Pearson, J. Chem. Sci. 369–377 (2005) 117.
- [42] R.G. Parr, L. Szentpaly, S. Liu, J. Am. Chem. Soc. 1922–1924 (1999) 121.
- [43] P. Geerlings, F. de Proft, W. Langenaeker, Chem. Rev. 1793–1873 (2003) 103.
- [44] P.K. Chattarji, B. Maiti, J. Am. Chem. Soc. 2705–2710 (9) (2003) 125.
- [45] P.G. Parr, R.G. Pearson, J. Am. Chem. Soc. 7512–7516 (1983) 105.
- [46] K.D. Sen, D.M.P. Mingos, Springer. (1993).
- [47] F. De Proft, P. Geerlings, Chem. Rev. 1451–1464 (2001) 101.
- [48] A.B. Sawant, C.H. Gill, R.S. Nirwan, Indian J. Pure Appl. Phys. 38–44 (1) (2012) 50.
- [49] A. Vektariene, G. Vektaris, J. Svoboda, Arkivoc 311–319 (2009) 7.
- [50] S. Liu, J. Chem. Sci. 477–483 (5) (2005) 117.
- [51] D.A. Kleinman, Phys. Rev. 1977–1979 (1962) 126.
- [52] J. Pipek, P.Z. Mezey, J. Chem. Phys. 4916–4926 (1989) 90.
- [53] A.D. Buckingham, Adv. Chem. Phys. 107–142 (1967) 12.
- [54] C.R. Zhang, H.S. Chen, G.H. Wang, Chem. Res. Chin. 640 (2004). U20.
- [55] Y. Sun, X. Chen, L. Sun, X. Guo, W. Lu, Chem. Phys. Lett. 397 (2003) 38.
- [56] O. Christiansen, J. Gauss, J.F. Stanton, Chem. Phys. Lett. 147 (1999) 305.
- [57] H. Soscun, O. Castellano, Y. Bermudez, C.T. Mendoza, A. Marcano, Y. Alvarado, J. Mol. Struct. (Theochem) 19 (2002) 592.
- [58] R. Zhang, B. Du, G. Sun, Y.X. Sun, Spectrochim. Acta Part A. 1115–1124 (2010) 75.
- [59] (a) M.I. Kabachnik, T.Ya. Medved, Dokl. Akad. Nauk SSSR 689, 1952, p. 83; (b) E.K. Fields, J. Am. Chem. Soc. 1528 (1952) 74; (c) D. Redmore, in: E.J. Griffith, M. Grayson (Eds.), Topics in Phosphorus Chemistry, John Wiley & Sons, New York, 1976; (d) R.A. Cherkasov, V.I. Galkin, Russ. Chem. Rev. 857 (1998) 67; (e) S.C. Fields, Tetrahedron 12237 (1999) 55; (f) K. Moonen, I. Laureyn, C.V. Stevens, Chem. Rev. 6177 (2004) 104.
- [60] F. Simeon, J.F. Saint-Clair, D. Villemin, in: Proceedings of the First International Conference on Microwave Chemistry 7–11, Czech Republic, Prague, 1998, p. 186. Sept.
- [61] K. Moonen, I. Laureyn, C.V. Stevens, Chem. Rev. 6177 (2004) 104.
- [62] R. Zwarich, J. Smolarch, L. Goodman, J. Mol. Spectrosc. 336 (1971) 38.
- [63] G. Varsanyi, Vibrational Spectra of Benzene Derivatives, Academic Press, New York, 1969.
- [64] V. Krishnakumar, R. John Xavier, J. Indian Pure Appl. Phys. 95 (2003) 41.
- [65] M. Silverstein, Clayton G. Basseler, C. Morill, Spectrometric Identification of Organic Compounds, Wiley, New York, 1981.
- [66] L.X. Hong, L.X. Ru, Z.X. Zhou, Comput. Theor. Chem. 27 (2011) 969.
- [67] J. Bevan Ott, J. Boerio-Goates, Calculations from Statistical Thermodynamics, Academic Press, 2000.

Synthesis, Antibacterial and Antifungal Screening of Three new of Alpha-aminophosphonic acids

Hellal Abdelkader*, Chafaa Salah, Chafai Nadjib

Abstract—Due to the medicinal importance of α -aminophosphonic acid derivatives, the biological property of three synthesized α -aminophosphonic acids derivatives were screened in vitro against some Gram-positive and Gram-negative pathogenic bacteria and some pathogenic fungi. The results obtained are compared with those of the starting compounds. In this study, three compounds ([[(4-Hydroxyphenyl) phosphonomethyl-amino]-methyl]-phosphonic acid (S1), [[(3-Hydroxyphenyl) phosphonomethyl-amino]-methyl]-phosphonic acid (S2) And [[(2-Hydroxyphenyl) phosphonomethyl-amino]-methyl]-phosphonic acid (S3) have been synthesized from 2-aminophenol (2AP), 3-aminophenol (3AP) and 4-aminophenol (4AP). The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) were assessed by serial dilution technique. The synthesized compounds showed good antimicrobial and antifungal activity against all the tested organisms and the results are comparable to standard antibiotic chloramphenicol. The low MIC and MBC values and high sensitivity of pathogenic microorganisms to the compounds led to conclude that the α -aminophosphonic acids derivatives have potential antimicrobial and antifungal properties

Index Terms— α -aminophosphonic acid, Antibacterial Activity, Antifungal Activity, MIC, MBC.

1 INTRODUCTION

ONE of the main causes of morbidity and mortality in immunocompromised patients in the developing countries is mainly due to the frequent life threatening infective diseases originated from various pathogenic microorganisms. A large number of drugs have been discovered so far to combat such situation. But none of these drugs could completely destroy such microorganisms in some cases. It is mainly because these organisms are developing resistance towards such drugs. As a result, the drugs already in use are gradually losing their effectiveness. The discovery of novel antibiotics which are much more effective against such microorganisms is essential. α -aminophosphonates are an important class of compounds since they are considered as structural analogues of the corresponding α -amino acids, and their utilities as enzyme inhibitors, antibiotics and pharmacological agents [1]. Aminophosphonates are widely used as imaging agents and as antitumor, antihypertensive and antibacterial agents [2].

α -aminophosphonates applications are significant in agriculture as plant regulators, herbicides [3], pesticides and in medicine as anticancer agents [4], enzyme inhibitors [5], peptide mimics [6], antibiotics and pharmacological agents [7]. These compounds have already been found to act as antibacterial agents, neuroactive compounds, with some of them already commercialized [8]. Synthesis of α -aminophosphonic acids has been a focus of considerable attention in synthetic organic chemistry as well as in me-

dicinal chemistry [9-13]. The aminophosphonic acids are generally obtained by hydrolysis of esters via Kabachnik-Fields reaction [14]. This reaction can be activated by microwave irradiation [15], nevertheless there are often secondary reactions during the hydrolysis [14]. The synthesis of Irani-Moedritzer [16] is less general than the Kabachnik-Fields reaction, but it has the advantage of obtaining the aminophosphonic acid without a step of hydrolysis. In this context, these biological data prompted to investigate the biological activity of synthesized [[(2-Hydroxyphenyl) phosphonomethyl-amino]-methyl]-phosphonic acid (S1), [[(3-Hydroxyphenyl) phosphonomethyl-amino]-methyl]-phosphonic acid (S2) And [[(4-Hydroxyphenyl) phosphonomethyl-amino]-methyl]-phosphonic acid (S3). The results obtained are compared with those of the starting products (scheme 1).

2 Materials and methods

2.1 Chemistry

2.1.1 Chemicals and Materials

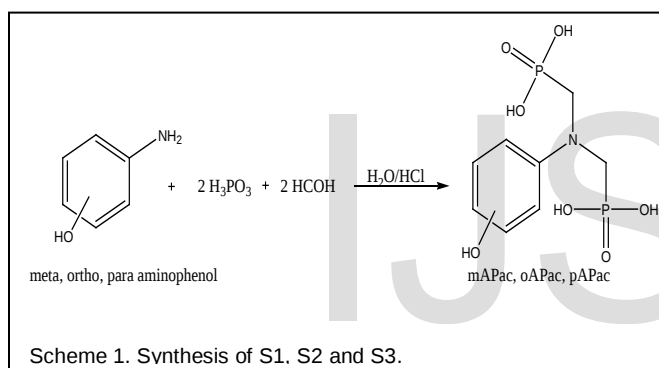
All chemicals used throughout the research were purchased from Aldrich, and used without further purification. Solvents were distilled from the appropriate drying agents and stored under nitrogen atmosphere. Melting points were determined on a digital apparatus Kofler Banc. All reactions were monitored using thin-layer chromatography (TLC) carried out on 0.25-mm E Merck silica gel plates (60F-254) and the spots were visualized by UV light. Infrared spectra were recorded on FT/IR JASCO 300 E (4000-400 cm^{-1}). NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 300 apparatus operating at 300 MHz with TMS as the internal standard and D_2O as solvent. Chemical shifts are given in parts per million (ppm). Multiplicities are shown as the abbreviations: s (singlet), brs (broad singlet),

- Hellal Abdelkader is currently pursuing Magister degree program in Faculty of Technology, Departement of Ingeneering Process in Farhat Abbas Sétif1, Algeria, PH-0774835272. E-mail: haekphbarm@yahoo.fr
- Chafaa Salah is currently pursuing Professor degree program in Faculty of Technology, Departement of Ingeneering Process in Farhat Abbas Sétif1, Algeria, PH-0659280909.. E-mail: S.chafaa@yahoo.fr
(This information is optional; change it according to your need.)

d (doublet), t (triplet), m (multiplet). ^{31}P NMR chemical shifts were referenced to external H_3PO_4 (85% w/w). The percentages of carbon, hydrogen and nitrogen were determined by Elemental analyses using Perkin Elmer 2400 CHN Elemental Analyzer.

2.1.2 General procedure for the synthesis of α -amino-phosphonic acids (S1, S2, S3):

The α -aminophosphonic acids were synthesized according to the method explained by Irani- Moedritzer [16]. In a three-neck flask, a mixture of 0.1 mol of H_3PO_3 50% and 0.2 mol of Ortho-, Para- or Meta-aminophenol was dissolved into 100 ml water and 50 mL of hydrochloric acid. The mixture was allowed to be refluxed for 3h at 110°C while 0.4 mol of paraformaldehyde 37% solution was added drop wise to the reaction mixture. After adding, the mixture was kept at this temperature for an additional two hours. Completion of the reaction was monitored by TLC analysis. After completion of the reaction, solvent was removed in a rotaevaporator. The crude product was obtained, and the further pure product was received by recrystallization in ethanol (Scheme 1).



2.2 Biological activity

2.2.1 Microorganisms

Antimicrobial activity, Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Antifungal activity were determined against four gram-positive bacteria (*Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacillus megaterium* (ATCC 14581), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), and *Enterobacter aerogenes* (ATCC13048), four gram-negative bacteria (*Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC 23564) and *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) and against three fungi (*Candida albicans* (ATCC 90028), *Aspergillus fumigatus* (ATCC 204305) and *Aspergillus flavus* (ATCC 204304)). All the organisms were collected from the Microbiology Laboratory of Ain Defla Hospital and Khemis Miliana University.

2.2.1 Preparation of inoculums

Suspension of organism was prepared as per McFarland nephelometer standard. A 24 hour old culture was used for the preparation of bacterial suspension. Suspension of organism was made in a sterile isotonic solution of sodium chloride (0.9% w/v) and the turbidity was adjusted so that it contained approximately

1.5×10^8 cells/ml. It was obtained by adjusting the optical density of the bacterial suspension to that of a solution of 0.05 ml of 1.175% of barium chloride and 9.95 ml of 1% sulphuric acid.

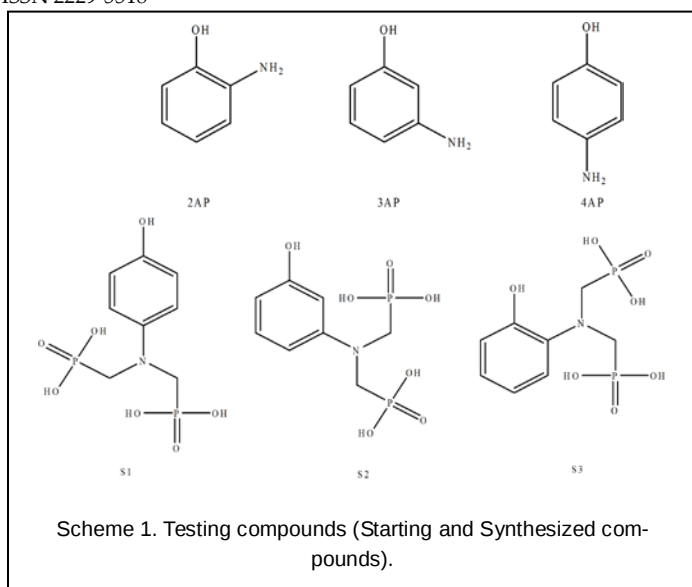
2.2.2 Antimicrobial screening

Newly synthesized compounds (S1-S3) and starting compounds (2AP, 3AP and 4AP) were screened *in vitro* for their antimicrobial activity against four gram-negative and four gram-positive bacterial strains using disc diffusion method [17, 18]. Briefly, three calculated amount of the compounds S1, S2 and S3 were dissolved in DMSO in three different vials for getting solutions having concentrations of 50 $\mu\text{g/ml}$, 75 $\mu\text{g/ml}$ and 100 $\mu\text{g/ml}$ respectively. They were then applied on filter paper disc. Standard chloramphenicol (100 $\mu\text{g/ml}$) was used as positive control and DMSO as negative control. Both experimental and control discs were placed in petridishes seeded with organism in nutrient agar medium. The petridishes were kept in a refrigerator at 4°C for 24 hours to ensure diffusion of the test materials. Finally, they were incubated at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 hours and all experiments were done as triplicates. The antibacterial activity was determined by measuring the diameter of zone of inhibition in mm.

2.2.3 Determination of MIC and MBC

Each bacteria has a level of antibiotic which will inhibit growth but not kill the organisms. This is called the minimum inhibitory concentration (MIC). Related to this, a higher antibiotic concentration will kill the organisms. This is called the minimum bactericidal concentration (MBC). By understanding the concepts in determining antibiotic concentrations compared to the MIC and MBC, we can make rational decisions in determining how successful antibiotic treatment is likely to be [19]. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of S1, S2, S3, 2AP, 3AP and 4AP were determined by serial dilution technique against the above mentioned pathogenic bacteria [19, 20].

S1, S2, S3, 2AP, 3AP and 4AP (Scheme 2) were used from a concentration of 0.25 $\mu\text{g/ml}$ to 256 $\mu\text{g/ml}$. A control test-tube containing only medium (nutrient broth medium) was used to confirm the sterility of the medium. Bacterial suspension (10 μl) containing 10^7 cells/ml was inoculated into all tubes. All of the test tubes were incubated at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ and observed for bacterial growth for 24 hours for MIC and 96 hours (4 days) for MBC determinations after inoculation for 24 hours, the test tube with no visible growth of the microorganism was taken to represent the MIC value of the sample in $\mu\text{g/ml}$. MBC, in which no viable organism occurred was determined by keeping the test tubes which was used for MIC determination for four days. After four days, bacterial growth was observed and MBC was determined at lowest concentrations where no bacterial growth was observed.



2.2.4 Evaluation of bactericidal and bacteriostatic capacity

The action of an antibacterial on the bacterial strains can be characterized with two parameters such as Minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum bactericidal concentration (MBC). According to the ratio MBC/MIC, we appreciated antibacterial activity. If the ratio $MBC/MIC \leq 4$, the effect was considered as bactericidal but if the ratio $MBC/MIC > 4$, the effect was defined as bacteriostatic [21, 22].

2.2.5 Antifungal activity

For antifungal screening, each sample was tested at concentrations of 100, 200, 400 $\mu\text{g/ml}$. The experimental protocol was almost same as antibacterial screening except the plates were incubated at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 48h and Nystatin disc was used as positive control. All experiments were done in triplicates.

2.2.6 Statistical analysis

The experimental results have been expressed as the mean $\pm$ SEM (Standard Error of Mean). Statistical analysis was performing with Origin 6.0 software;

3. Results and Discussion

3.1. Chemistry

The α -aminophosphonic acids (**S1-S3**) used in this study were synthesized via Irani-Moedritzer reaction by treatment of the formaldehyde with the primary amine (Ortho-, Meta- and Para-aminophenol) and phosphorous acid in strong acidic medium (concentrated hydrochloric acid) under reflux. After filtration and evaporation, the α -aminophosphonic acids were isolated in almost quantitative yields. The results showed that the α -Aminophosphonic acids (**S1-S3**) are synthesized in good yields (73-88%). Thin layer chromatography (TLC) was employed to monitor reaction progress and to determine the purity of the products. All the title compounds (**S1-S3**) readily dissolve in polar solvents and melted in the range of $134-161^\circ\text{C}$. The structures of the title compounds **S1-S3** were established by their spectroscopical data. The structures of the obtained compounds

were identified and characterized by elemental analysis, FT-IR, and by ^1H NMR, ^{13}C NMR and ^{31}P NMR spectroscopy. The percentages of carbon, hydrogen and nitrogen were determined by using CHN analyzer. The found and calculated data is in good agreement with the proposed molecular formulae. The presence of α -aminophosphonic acids was confirmed by FTIR measurement: All the compounds (**S1-S3**) showed absorption bands of the saturation carbon (sp^3) at $2930-2290\text{ cm}^{-1}$. The α -aminophosphonic acids display characteristic bonds for phosphonic group ($\text{P}-\text{O}-\text{H}$) at $3300-3400\text{ cm}^{-1}$. The peak at 1645 cm^{-1} is due to ($\text{P}(\text{O})-\text{OH}$) stretching and the absorption bands at 1256 cm^{-1} and 957 cm^{-1} are assigned to the stretching modes of ($\text{P}=\text{O}$) and ($\text{P}-\text{O}-\text{H}$) respectively. The strong peak at 1378 cm^{-1} is ascribed to the ($\text{P}-\text{CH}_2$) bending that could be taken advantage for confirming the formation of a bond between phosphorus acid and methanal. The peaks at 1510 and 1604 cm^{-1} are assigned to the vibrations of aromatic ring. The broad absorption band from $3500-3600\text{ cm}^{-1}$ arises from stretching ($-\text{OH}$) of phenol group. NMR spectral characteristics of α -aminophosphonic acids are an important tool for determination of structure and identification of new compounds. The structure of these compounds was confirmed on the basis of their spectroscopic characteristics. In the ^1H NMR spectrum of (**S1**), the methylene protons resonate as singlet at 1.96ppm . The other consecutive signals correspond to the phosphonic group resonate as singlet at 4.56ppm . The aromatic protons resonate as multiplet at $5.7-6.2\text{ppm}$. The phenol proton resonates as singlet at 6.68ppm . On the other hand the methylene carbon appeared as singlet at 46.42 ppm in the ^{13}C NMR, the aromatics carbon showed resonance at 116 and 156.6ppm . The ^1H NMR spectrum of (**S2**) shows a multiplet in the region $5.60-6.07\text{ ppm}$ for the aromatic protons. The protons of the methylene group ($\text{N}-\text{CH}_2$) appeared as a singlet at 0.987 ppm while the proton of the phosphonic group ($\text{P}-\text{OH}$) appears as a singlet at 4.83 ppm . The phenolic protons appeared at the region 6.7 ppm . The ^{13}C NMR shows signals at $116-140\text{ppm}$ for aromatics carbons. The methylene carbon appeared as singlet at 30.10 ppm which confirms the structure of the product. The ^1H NMR spectrum of compound (**S3**) demonstrated a singlet at 4.25ppm due to phosphonic protons, the singlet at 1.75ppm was assigned to the methylene protons. The aromatic protons appeared as a multiplet at $5.7-6.64\text{ppm}$. The phenolic proton appeared as singlet at 6.8ppm . The ^{13}C NMR spectrum exhibited the following signals: methylene carbon at 46.52ppm and the aromatic carbons at $116.4-156\text{ppm}$. The ^{31}P -NMR spectroscopy is the most precise method for determining the structure of the phosphorus-containing compounds. Chemical shifts for ^{31}P of the three α -aminophosphonic acids (**S1-S3**) synthesized depend on imbalance of σ -bonds caused by the difference in electronegativity of the atoms and by the effect of the free electron pairs, degree of occupation of phosphorus d -orbitals, and deviation from geometric symmetry [23]. The phosphorus atom of the three α -aminophosphonic acids (**S1-S3**) in the ^{31}P NMR spectrum appears at $1.017-1.081\text{ppm}$. From these results, we confirm the successful synthesis of α -aminophosphonic acids (**S1-S3**) with high purity.

3.2 Biological assay

3.2.1 Antibacterial activity

All the compounds were screened against Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria at three concentrations, 50, 75 and 100µg/ml by the disc diffusion method and the results were compared with the standard drug. Standard antibiotics (Chloramphenicol) were used as positive control and DMSO used as negative control. The results for the antibacterial activity of S1, S2, S3; 2AP, 3AP and 4AP as well as the standard and DMSO have been presented in Table 1. DMSO had no effect on the bacteria in the concentrations studied. All these compounds showed higher zone of inhibition when tested with higher doses (Table 1). A poor activity was shown by 2AP, 3AP and 4AP against Gram positive bacteria and Gram negative bacteria compared to the reference compound and the synthesized compounds (S1, S2 and S3). The synthesized compound presenting the strongest antimicrobial activity than the

starting products and broadest range of action were, in descending order, S3, S2, S1, 2AP, 3AP and 4AP. For the S1, S2, S3 products, The highest activity (diameter of zone of inhibition >27mm) was demonstrated by all compounds against all tested bacteria at high concentration (100µg/ml), while the lowest activity (diameter of zone of inhibition <16mm) was demonstrated by the products at low concentration (50µg/ml) against *gram-negative bacteria*. The good activity of the newly synthesized compounds is attributed to the presence of pharmacologically active aminophosphonic groups attached to phenyl group at 2, 3 and 4th position. When the substitution of these groups is replaced by hydrogen, a sharp decrease in activity against most of strains was observed. Compounds **S1, S2, S3** exhibited better activity compared to that of standard Chloramphenicol against all the bacterial strain. Further the result showed that Gram- positive exhibited better activity than Gram-negative organism.

TABLE 1
ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF 4AP, 3AP, 2AP, S1, S2, S3 AND CHLORAMPHENICOL.

	Testing or- ganisms	S1 4AP				S2 3AP			S3 2AP		Standard (+ Ctrl)
		50 µg/ml	75 µg/ml	100 µg/ml	50 µg/ml	75 µg/ml	100 µg/ml	50 µg/ml	75 µg/ml	100 µg/ml	100 µg/ml
Gram-Positive	<i>B. subtilis</i>	16.6±0.4	19.9±0,4	25.6±0,4	14.6±0.4	19.8±0,8	32.6±0,4	16.9±0.4	22.9±0,4	35.0±0.0	32.8±0.0
		R	11.0±0.8	16.3±0.0	10.4±0.0	12.6±0.0	20.4±0.5	R	12.9±0.2	17.4±0.0	
	<i>B.megaterium</i>	15.3±0.7	20.6±0,5	25.6±0.3	16.0±0.9	18.6±0,7	29.6±0.3	15.1±0.7	21.6±0,0	34.0±0.5	34.5±0.9
		R	13.4±0.7	14.1±0.0	06.2±0.8	11.4±0.6	19.4±0.6	R	13.4±0.6	19.4±0.1	
	<i>S.aureus</i>	15.0±0.0	16.3±0,4	24.3±0.4	17.0±0.1	22.3±0,1	33.3±0.4	17.0±0.0	23.0±0,4	32.6±0.2	30.1±0.0
		R	12.7±0.0	16.4±0.7	R	11.9±0.8	19.4±0.0	R	11.5±0.6	18.4±0.4	
Gram-Negative	<i>E. aerogenes</i>	15.0±0.0	18.0±0,4	20.0±0.0	15.5±0.0	17.6±0,3	25.0±0.0	14.0±0.9	18.0±0,4	30.0±0.0	29.7±0.8
		08.4±0	09.0±0.1	14.0±0.8	R	13.4±0.9	16.4±0.1	R	14.8±0.5	20.4±0.8	
	<i>E. coli</i>	14.0±0.0	19.9±0,4	25.0±0.0	14.0±0.8	17.9±0,5	31.0±0.7	14.0±0.9	19.9±0,4	34.0±0.0	30.8±0.0
		R	09.4±0.6	14.7±0.0	09.0±0.1	11.0±0.7	18.4±0.8	R	10.4±0.8	21.4±0.6	
	<i>P. aeruginosa</i>	12.3±0.7	17.0±0,2	23.0±0.5	12.3±0.0	19.6±0,9	25.0±0.5	13.3±1.2	19.6±0,5	30.3±0.8	29.5±0.9
		R	12.8±0.5	15.9±0.8	R	10.4±0.8	17.4±0.0	R	11.2±0.0	22.4±0.1	
	<i>S. typhi</i>	11.0±0.0	16.3±0,3	24.0±0.6	13.0±0.6	19.3±0,7	29.0±0.0	11.0±0.4	19.3±0,4	32.7±0.6	28.9±0.0
		R	11.0±0.9	13.2±0.7	08.9±0.6	10.1±0.3	15.4±0.9	R	10.4±0.3	19.0±0.8	
	<i>K. pneu- moniae</i>	10.3±0.7	15.0±0,0	22.0±0.0	12.3±0.7	22.0±0,0	27.0±0.9	11.3±0.7	23.0±0,4	33.6±0.9	29.7±0.0
		R	10.3±0.5	15.4±0.7	R	11.2±0.1	15.4±0.6	R	11.9±0.7	22.7±0.0	
	DMSO (- Ctrl)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

R= Resistance.

(- Ctrl) Negative control.

(+ Ctrl) Positive control.

MIC and MBC values of these compounds against pathogenic bacteria are shown in Table 2. For the synthesized compounds, MIC values ranged between 8 and 32µg/ml against gram-positive and gram-negative, and MBC values,

between 32 and 256 µg/ml. Almost as a rule, MBC values were several folds higher than those of MIC, suggesting a better inhibitory than bactericidal activity. The exception was the case of the starting compounds where the MICs

against all tested strains were lowest values. 2AP, 3AP and 4AP presented higher MIC and MBC values than the other evaluated. These compounds showed weak to moderate activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria (MIC between 32 and 256 µg/ml and MBC between 64 and 256 µg/ml). Antibacterial potency of S1, S2 and S3 against these bacteria expressed in MIC indicated the syn-

thesized products are more effective against gram-positive at lower concentration than that against gram-negative bacteria. The strong antibacterial activity of S3 was confirmed by the lowest MIC and MBC values (8-16 µg/ml and 16-128 µg/ml respectively) observed against all tested microorganisms.

TABLE 2
MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION MIC AND MBC OF S1, S2, S3, 4AP, 2AP AND 3AP.

Testing organisms	S1 4AP			S2 3AP			S3 2AP		
	MIC	MBC	MBC/MIC (Effect)	MIC	MBC	MBC/MIC (Effect)	MIC	MBC	MBC/MIC (Effect)
<i>Bacillus subtilis</i>	8	32	4 (+)	16	32	2(+)	8	16	2(+)
	16	128	8(-)	32	256	8(-)	32	256	4(+)
<i>Bacillus megaterium</i>	16	64	4(+)	16	128	4(+)	8	16	2(+)
	32	256	8(+)	32	128	4(+)	16	128	4(+)
<i>Staphylococcus aureus</i>	32	128	4(+)	16	128	4(+)	8	32	8(-)
	64	256	4(+)	16	256	16(-)	32	64	2(+)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	16	32	2(+)	32	128	4(-)	16	128	8(-)
	32	256	8(-)	64	256	4(+)	64	128	4(+)
<i>Escherichia coli</i>	16	32	2(+)	32	128	4(+)	8	32	4(+)
	64	128	2(+)	128	256	2(+)	64	256	4(+)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32	128	4(+)	16	128	4(+)	16	32	2(+)
	64	128	4(+)	32	128	8(-)	32	128	4(+)
<i>Salmonella typhimurium</i>	32	64	2(+)	32	128	4(+)	16	128	4(+)
	64	256	4(+)	64	256	4(+)	32	64	2(+)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16	128	4(+)	32	128	4(+)	16	128	4(+)
	32	128	4(+)	64	128	4(+)	32	256	8(-)

(+): bactericidal effect, (-) bacteriostatic effect

The MIC values of S1 were found to be between 8-32 µg/ml and the MBC values for S1 were 32-128 µg/ml. On the other hand the MIC and MBC values of S2 and S3 were also found to be between 8-32 and 64-128 µg/ml in Table 2. The bactericidal and bacteriostatic effect of the tested compounds was determined using the ratio MBC/MIC. Antimicrobial substances are considered as bacteriostatic agents when the ration MBC/MIC>4 and bactericidal agents when the ration MBC/MIC≤4. The summary of the microcide and the microbiostatic effects were given in Table 2. In the present study, S1, S2, S3 and standard showed the ratio MBC/MIC≤4, suggesting that these compounds act as bactericidal agents on these strains. Most Starting products showed MBC/MIC ratio of more than 4, which may be classified as bacteriostatic agents.

3.2.2 Antifungal activity

Antifungal activity of the compounds were also determined at three different doses (100, 200, 400 µg/ml) against three pathogenic fungi such as *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus*. At lower doses all these organisms were almost insensitive to the starting compounds but at higher doses the compounds showed mild to moderate antifungal activities which are given in Table 3. For the synthesized products, Compound S3 showed highest activity against *Aspergillus fumigatus* (zone of inhibition 30.0 ± 0.5 mm at 400 µg/ml) whereas S1 and S2 were effective to same extent against *Aspergillus flavus* (zone of inhibition 29 ± 0.3 mm at 400 µg/ml) and *Aspergillus fumigatus* (zone of inhibition 28±3 mm at 400 µg/ml) respectively.

TABLE 3
ANTIFUNGAL ACTIVITY OF S1, S2, S3, 4AP, 2AP, 3AP AND NYSTATIN.

Testing organisms	S1 4AP			S2 3AP			S3 2AP			Standard
	100 µg/ml	200 µg/ml	400 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml	400 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml	400 µg/ml	400 µg/ml
<i>Candida albicans</i>	12.9±0,9	17.9±0,4	26.6±0,4	14.6±0.4	19.8±0,8	25.6±0,4	10.9±0.4	20.0±0,4	27.0±0.0	27.8±0.0
	R	10.0±0.8	12.3±0.0	R	12.6±0.0	15.4±0.5	R	12.9±0.2	16.4±0.0	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	11.9±0,0	16.6±0,5	25.6±0.3	16.0±0.9	18.6±0,7	25.6±0.3	15.1±0.7	19.6±0,0	30.0±0.5	26.5±0.9
	R	09.4±0.7	10.1±0.0	R	10.4±0.6	13.4±0.6	R	11.4±0.6	17.4±0.1	
<i>Aspergillus flavus</i>	11.8±0,9	14.3±0,4	29.3±0.4	17.0±0.1	22.3±0,1	28.3±0.4	17.0±0.0	20.0±0,4	22.6±0.2	24.9±0.0
	R	08.7±0.0	11.4±0.7	R	10.9±0.8	13.4±0.0	R	11.5±0.6	16.4±0.4	

R= Resistance

4 CONCLUSION

In this paper three novel aminophosphonic acids derivatives containing aminophenol side groups were synthesized and evaluated their antimicrobial and antifungal activities. The structure of the obtained compounds was confirmed by different spectral methods and elemental analysis. Testing *in vitro* of these new compounds for their biological activity against several type strains, it was noticed that [(4-Hydroxyphenyl) phosphonomethyl-amino]-methyl]-phosphonic acid (S3) showed the best antibacterial and antifungal actions on both gram negative and gram positive bacterial species. It is clear that the synthesized compounds have broad spectrum of antimicrobial activity than the starting compounds. The results obtained indicate that the synthesized compounds (S1, S2 and S3) could be potential chemotherapeutics and also further pharmacological investigation is needed in this area. Further experiments are required to investigate the actual mechanism of bioactivities and their probable effects on animal model.

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to thank the Department of Chemistry and Engineering Process, University Khemis Milliana, and Hospital of Khemis Milliana for kindly providing laboratory facilities to carry out the work..

REFERENCES

- [1] M.R. Saidi, N. Azizi, Synlett, 2002, 1347.
- [2] X. J. Mu, M. Y. Lei, L. P. Zou, W. Zhang, Tetrahedron Lett, 2006, 47, 1125.
- [3] P. Kafarski, B. Lejczak, P. Mastalerz, Beitr. Wirk. Forsch. H25, Chem. Abstr., 1985, 103, 174532.
- [4] P. Kafarski, B. Lejczak, Curr. Med. Chem. Anticancer Agents, 2001, 1(3), 301.
- [5] M. C. Allen, W. Fuhrer, B. Tuck, R. Wade, J. M. Wood, J. Med. Chem., 1989, 32, 1652.

- [6] P. Kafarski, B. Lejczak, Phosphorus, Sulfur, Silicon, Relat. Elem., 1991, 115, 63193.
- [7] F.R. Atherton, C.H. Hassall, R.W. Lambert, J. Med. Chem., 1986, 29, 29.
- [8] Atherton, F. R.; Hassall, C. H.; Lambert, R. W. J. Med. Chem. 1987, 30, 1603.
- [9] M.I. Kabachnik, T.Y. Medve, Dokl. Akad. Nauk SSSR, 1952, 83, 689; Chem. Abstr. 1953, 47, 2724b.
- [10] E.K. Fields, J. Am. Chem. Soc. 1952, 74, 1528.
- [11] D. Redmore, Topics in Phosphorus Chemistry; Griffith, E. J., Grayson, M., Eds.; John Wiley & Sons: New York, 1976.
- [12] R.A. Cherkasov, V.I. Galkin, Russ. Chem. Rev., 1998, 67, 857.
- [13] S.C. Fields, Tetrahedron, 1999, 55, 12237.
- [14] K. Moonen, I. Laureyn, C.V. Stevens, Chem. Rev., 2004, 104, 6177.
- [15] D. Villemin, Proceedings of the First International Conference on Microwave Chemistry, Prague, Czech Republic, 1998.
- [16] K. Moedritzer, R. Irani, J. Org. Chem. 1996, 31, 1603.
- [17] K.R. Cruickshank, Medical Microbiology, A Guide to Diagnosis and Control of Infection, 2nd Ed. E.S. Livingston Ltd., Edinburgh and London, 1968.
- [18] A.W. Beuer, M. M. Kirby, J.C. Sherries and A. Truck, Am J Clin Pathol., 1969, 45, 493.
- [19] J.R. Starke, Chapter 32: Infective Endocarditis. R.D. Feigin, J.D. Cherry (eds). Textbook of Pediatric Infectious Diseases, 4th edition. 1998, Philadelphia: W.B. Saunders, pp. 315-338.
- [20] K.I. Waki, S. Koya-Miyata, K. Kohno, S. Ushio and tinctorium Lour: Extract against oral pathogenic bacteria. Nat. Med., 53: 72-79.
- [21] P. Berche, J.L. Gaillard, M. Simonet: In Nosocomial Infections Caused by Bacteria and Their Prevention in Bacteriology. Edited by Flammarion Medicine Sciences. 1988, 64-71.
- [22] D. Gatsing, V. Tchakoute, D. Ngamga, J.R. Kuate, J.D.D. Tamokou. In vitro antibacterial activity of crinum purpurascens herb. Leaf extract against the Salmonella species causing typhoid fever and its toxicology evaluation. Iran. J. Med. Sci. 2009. 34 : 126-136.
- [23] K. Moonen, I. Laureyn, C.V. Stevens, Chem. Rev., 2004, 104, 6177.

قمنا في العمل موضوع المذكورة بتحضير ثلاث أحماض أمينوفوسفونيك انطلاقا من ثلاث مركبات أمينوفينول بواسطة تفاعل إيراني-مودريتزر. الاحماض المحصل عليها خضعت من جهة لدراسات نظرية بغية معرفة خصائصها البنوية و الترموديناميكية, و كذا مدى فعاليتها الكيميائية كما تم ايضا استغلال بعض البرامج المخصصة لدراسة إمكانية صلاحية أحماض الامينوفوسفونيك لان تكون أدوية. من جهة أخرى وبغية استغلال و إعطاء قيم للأحماض المحضرة, تم تجريبيها من ناحية الفعالية المضادة للأكسدة و مضادات البكتيريا و كذا الفطريات. النتائج العملية جد متطابقة مع الدراسات النظرية, وهذا ما يجعلنا نتفاعل بشأن صلاحيتها الدوائية.

الكلمات المفتاحية: أمينوفينول, أمينوفوسفونيك, تفاعل إيراني-مودريتزر, مضاد الأكسدة, مضاد البكتيريا, مضاد الفطريات.

RESUMÉ

Notre travail de thèse a pour objectif la synthèse et la caractérisation spectroscopiques de trois acides α -aminophosphoniques dérivés d'aminophénols via la réaction d'Irani-Moedridzer. Les acides obtenus ont subi, dans un premier temps, une étude théorique approfondie à l'aide de logiciel Gaussian 09 par la méthode DFT afin de connaître les propriétés géométrique, de réactivité chimique et thermodynamiques. Une autre étude théorique basée sur l'exploitation des logiciels de prédiction des propriétés QSAR a été effectué pour voir si nos produits seront candidats d'être médicaments. Dans un deuxième temps, et afin d'exploiter et valoriser nos molécules, on fait des tests, in vitro, en vue d'évaluer leurs pouvoir antioxydant, antibactérienne et antifongique. Les résultats des tests de l'activité biologique effectuée sur les molécules synthétisées et les études théoriques sont semblables et très encourageants, donc on peut dire que ces produits sont biologiquement actifs et peuvent être utilisés ultérieurement dans d'autres applications.

Mots clés : Aminophénols, Acides aminophosphoniques, Réaction d'Irani-Moedriter, Antioxydant, Antibactérien, Antifongique.

Abstract :

Our thesis aims at the synthesis and spectroscopic characterization of three α -aminophosphonic acids derived from aminophenols via the reaction of Irani-Moedridzer. The acids obtained underwent, at first, a thorough theoretical study using Gaussian 09 program by DFT method to know the geometric properties, chemical reactivity and thermodynamic. Another theoretical study based on the exploitation of property prediction software QSAR was conducted to see whether our product candidates will be drugs. Secondly, and in order to exploit and develop our molecules, we did tests in vitro to evaluate their antioxidant, antibacterial and antifungal. The results of biological activity tests performed on the synthesized molecules and theoretical studies are similar and very encouraging, so we can say that these products are biologically active and can be used later in other applications.

Keywords: Aminophenols, aminophosphonic acids, Irani-Moedriter reaction, Antioxidant, Antibacterial, Antifongic.