

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche**  
**scientifique**

**UNIVERSITE FERHAT ABBAS-SETIF-1**

**FACULTE DES SCIENCES**

**DEPARTEMENT DE CHIMIE**

**THESE DE DOCTORAT LMD**

**DOMAINE :** Sciences de la matière

**FILIERE :** Chimie

**SPECIALITE:** Chimie Pharmaceutique

**Présentée par :**

*M<sup>me</sup> HADDADI Ines*

**Thème**

**Synthèse, caractérisation et évaluation des activités  
biologiques d'une série de phosphonates alpha-aminés**

**Devant le jury composé de:**

<i>Membre de jury</i>	<i>Grade</i>	<i>domociliation</i>	<i>Qualité</i>
<i>Mr. KABOUB Lekhmici</i>	<i>Professeur</i>	<i>Univ. Sétif 1</i>	<i>Président</i>
<i>Mr. HELLAL Abdelkader</i>	<i>Professeur</i>	<i>Univ. Sétif 1</i>	<i>Directeur de thèse</i>
<i>Mme EL KOLLI MERBAH Meriem</i>	<i>Professeur</i>	<i>Univ. Sétif 1</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>Mr. TOUAFRI Lasnoui</i>	<i>M.C.A.</i>	<i>Univ. Khemis Miliana</i>	<i>Examineur</i>
<i>Mr LARBI BOUAMRANE Omar</i>	<i>M.C.A.</i>	<i>Univ. Tipaza</i>	<i>Examineur</i>

**Année universitaire 2023-2024**



# Remerciements

---

Ces quelques lignes vont me permettre de remercier toutes les personnes qui m'ont beaucoup apporté aussi bien au niveau scientifique que personnel, et sans qui mon travail n'aurait pu aboutir. La difficulté tient dans le fait de n'oublier personne. C'est pourquoi, je remercie par avance ceux dont le nom n'apparaît pas dans cette page et qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre.

Mes premiers remerciements vont tout naturellement à Monsieur **HELLAL Abdelkader**, mon Directeur de thèse, celui qui m'a permis d'approfondir mes connaissances dans un des vastes domaines de la Science. Je tiens à le remercier vivement de m'avoir accompagné tout au long de ce parcours, de m'avoir guidé et enseigné les réflexes du bon chercheur en m'apprenant à poser les bonnes questions et y répondre avec le maximum de rigueur. Comme je tiens aussi à le remercier pour son aide précieuse lors de la préparation et la rédaction de mes travaux. Ses qualités scientifiques et humaines, son écoute, sa patience, son optimisme et son extraordinaire force de travail font de lui un exemple dont j'espère pouvoir m'inspirer dans ma vie professionnelle.

Je tiens à remercier vivement les membres du jury : Monsieur **KABOUB Lekhmici**, Professeur à l'université de Sétif-1 , pour avoir accepté de présider ce jury de thèse. Monsieur **TOUAFRI Lasnoui**, M.C.A à l'université de Khemis Miliana, ainsi que Monsieur **LARBI BOUAMRANE Omar** M.C.A à l'université de Tipaza, qui malgré leurs charges, ils ont consacré un temps précieux pour examiner cette thèse.

Je souhaiterais remercier chaleureusement le docteur **CHAFAI Nadjib**, directeur de laboratoire d'Electrochimie des Matériaux Moléculaire et des Complexes (LEMMC) à l'université de Sétif-1, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Au cours des quatre années passées, j'ai pu apprécier sa gentillesse, sa disponibilité et ses encouragements régulièrement renouvelés.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur **BENSOUICI Chaouki** pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, et tous les membres du centre de recherche en Biotechnologie à Constantine. 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.

Je remercie tous les membres du laboratoire, anciens et nouveaux, pour leur patience et leur aide, avec qui j'ai eu des échanges fructueux.

## Remerciements

---

Enfin, je tiens également à remercier ma famille : ma mère, mon père, ma sœur : Imene et surtout mon mari qui ont tous su me faire confiance et me soutenir en toutes circonstances, j'exprime ma sincère gratitude envers tous ceux et celles qui m'ont accompagné de près ou de loin à la concrétisation de cette thèse.

# Sommaire

## Introduction générale

### *Chapitre I : Recherche bibliographique sur les composés organophosphorés et les phosphonates*

I .1. Introduction	09
I .2. Les composés organophosphorés	09
I .3. Principales classes des composés organophosphorés.	
I .4. Les phosphonates	11
I .4.1. Synthèse des phosphonates	13
I .5. Les Bisphosphonates	15
I .6. Les $\alpha$ -aminophosphonates	16
I .6.1. Synthèse des esters $\alpha$ -aminophosphonates	17
I .6.2. Réaction de Kabachnik Fields	17
I .6.3. Réaction de Pudovik	20
I .6.4. Synthèse des acides $\alpha$ -aminophosphoniques	20
I .6.5. Réaction de Schwarzenbach	23
I .7. Les $\alpha$ -hydroxyphosphonates	23
I .8. Les alkyles phosphonates et les aryles phosphonates	24
I .9. Les nucléosides phosphonates	25
I .10. Champs d'applications des phosphonates	25
I .10.1. Dans la biologie et la médecine	25
I .10.2. Application des phosphonates en industrie	28
I .10.3. Dans l'agriculture	29
I .11. Caractéristiques biologiques des $\alpha$ -aminophosphonates	30
I .11.1. $\alpha$ -aminophosphonates comme agents anti-tumoraux	30
I .11.2. $\alpha$ -aminophosphonates comme agents anti-bactériens	31
I .11.3. $\alpha$ -aminophosphonates comme inhibiteurs de la transcriptase inverse du virus HIV	32
I .12. Conclusion	32

### *Chapitre II : Synthèse, Caractérisation ,étude théorique et biologique*

<b>II.1. Synthèses et caractérisation physicochimiques</b>	39
II.1.1. Produits chimiques et matériels	39
II.1.2. Synthèse de l'acide $\alpha$ -aminophosphonique MTA	39
II.1.2.1. Synthèse classique à reflux ( conventionnelle)	40
II.1.2.2. Synthèse sous micro-ondes	40
II.1.3. Synthèse de l'ester $\alpha$ -aminophosphonate MTE	41
II.1.3.1. Synthèse classique à reflux	41
II.1.3.2. Synthèse sous micro-ondes	42

II.1.4. Synthèse de l' ester $\alpha$ -aminophosphonate 5MC	42
II.1.4.1. Synthèse classique à reflux	42
II.1.4.2. Synthèse sous micro-ondes	42
II.1.5. Caractérisation des molécules synthétisés	43
II.1.5.1. Point de fusion	43
II.1.5.2. Solubilité	43
II.1.5.3. Analyse par chromatographie sur couches minces CCM	43
II.1.5.4. Spectroscopie UV-visible (UV-vis)	44
II.1.5.5. Spectroscopie Infra-rouge (IR)	44
II.1.5.6. Spectroscopie RMN (résonance magnétique nucléaire)	45
<b>II.2. Etude théorique par la méthode de DFT</b>	<b>46</b>
II.2.1. La théorie de la fonctionnelle de densité DFT	46
II.2.2. Logiciel de calcul ( GAUSSIAN 09)	46
II.2.3. Les orbitales frontières	47
II.2.4. Notions chimiques et indices de réactivité issus de la DFT	47
<b>II.3. Evaluation biologique</b>	<b>49</b>
II.3.1. Activité antioxydante	49
II.3.1.1. Activité de piégeage des radicaux libres DPPH	49
II.3.1.2. Essai du pouvoir antioxydant par réduction du cuivre (CUPRAC)	49
II.3.1.3. Activité du piégeage de l'ABTS	50
II.3.1.4. Activité de blanchissement du $\beta$ -carotène	50
II.3.1.5. Activité du pouvoir réducteur (FRAP)	51
II.3.1.6. Activité de réduction par la formation du complexe $Fe^{+2}$ - phénantroline	51
II.3.2. Activités antimicrobienne et antifongique	52
II.3.3. Activité enzymatique	52
II.3.3.1. Activité acétylcholinestérase (AChE)	52
II.3.3.2. Inhibition de l'alpha amylase	53

## *Chapitre III : Résultats et discussions*

<b>III.1. Synthèses et caractérisation physicochimiques</b>	<b>58</b>
III.1.1. Synthèses	58
III.1.1.1. Mécanismes proposés pour la synthèse de MTA	59
III.1.1.2. Mécanismes proposés pour la synthèse de MTE et 5MC	62
III.1.2. Caractérisations	65
III.1.2.1. Caractérisation physico-chimiques	65
III.1.2.2. Analyse élémentaire	67
III.1.2.3. Analyses spectrophotométriques	67
<b>III.2. Calculs théoriques par la méthode de DFT</b>	<b>76</b>
III.2.1. Optimisation géométrique	76
III.2.2. Analyse des charges Mulliken	79
III.2.3. Moments dipolaires	82
III.2.4. Analyse des orbitales moléculaires	84
III.2.5. Comparaison entre les indices de réactivité de chaque molécule	87
<b>III.3. Evaluation des activités biologiques</b>	<b>90</b>
III.3.1. Activité antioxydante	90
III.3.1.1. Activité de piégeage des radicaux libres DPPH	90
III.3.1.2. Activité du piégeage de l'ABTS	91
III.3.2. Activités antimicrobienne et antifongique	92

## ***Conclusion générale***

## Liste des Figures

<b>Figure. I.1.</b> Caractéristiques biologiques de certains dérivés d' $\alpha$ -aminophosphonates	02
<b>Figure. I.2.</b> Structure générale des phosphonates et des acidesphosphoniques.	04
<b>Figure. I.3.</b> Acide 2-aminoéthane phosphonique.	05
<b>Figure. I.4.</b> Structure commune des bisphosphonates.	08
<b>Figure. I.5.</b> Structure de Étidronate disodique.	08
<b>Figure. I.6.</b> Structures des esters et acides $\alpha$ -aminophosphoniques.	10
<b>Figure. I.7.</b> Structure générale d'un acide diphosphonique.	16
<b>Figure. I.8.</b> Structure générale des $\alpha$ -hydroxyphosphonates.	17
<b>Figure. I.9.</b> Structures chimiques des alkyles-phosphonates et des aryles phosphonates.	18
<b>Figure. I.10.</b> Quelques exemples de nucléosides phosphonates.	18
<b>Figure. I.11.</b> Structure de L'acide alendronique.	19
<b>Figure. I.12.</b> La structure chimique de La fosfomycine.	19
<b>Figure. I.13.</b> Structure chimique L'Adefovir dipivoxil.	21
<b>Figure. I.14.</b> La structure anti-corrosion des quinoléines phosphonates.	21
<b>Figure. I.15.</b> Squelette de glyphosate (Roundup®).	22
<b>Figure. I.16.</b> Structure de <i>N, N-bis (phosphonomethyl) glycine</i> .	22
<b>Figure .I.17.</b> Dimethyl-2, 2, 2-trichloro-1-hydroxyethylphosphonate.	23
<b>Figure. I.18.</b> Structures de quelques $\alpha$ -aminophosphonates ayant une action anti-tumorale.	24
<b>Figure. I.19.</b> Structures d' $\alpha$ -aminophosphonates possédant une action antibactérienne.	24
<b>Figure. I.20.</b> Diverses structures d' $\alpha$ -aminophosphonates ayant une activité inhibitrice des proteases.	25
<b>Figure II.1.</b> Mécanisme réactionnel du test FRAP(Gülçin, 2012).	41
<b>Figure II.2.</b> Formation du complexe amylose-iod en cas d'absence d' $\alpha$ -amylase.	44
<b>Figure. III.1.</b> Spectres UV-vis des produits MTA, MTE et 5MC.	58
<b>Figure. III.2.</b> Spectres FTIR des produits MTA, MTE et 5MC.	59
<b>Figure. III.3.</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H du produit MTA.	61
<b>Figure. III.4.</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H du produit MTE.	62
<b>Figure. III.5.</b> Spectre RMN <sup>1</sup> H du produit 5MC.	62
<b>Figure. III.6.</b> Spectre RMN <sup>31</sup> P du produit MTA.	64
<b>Figure. III.7.</b> Spectre RMN <sup>31</sup> P du produit MTE.	65
<b>Figure. III.8.</b> Spectre RMN <sup>31</sup> P du produit 5MC.	65
<b>Figure. III.9.</b> Structures optimisées de MTA ,MTE et 5MC.	67
<b>Figure. III.10.</b> Orientation et intensité du moment dipolaire de MTE, MTA et 5MC.	72
<b>Figure.III.11.</b> Les orbitales moléculaires de MTA.	73
<b>Figure.III.12.</b> Les orbitales moléculaires de MTE.	74
<b>Figure .III.13.</b> Les orbitales moléculaires de 5MC.	74
<b>Figure .III.14.</b> Evolution du pourcentage d'inhibition (%) du MTE, MTA et de l'acide ascorbique par le test DPPH.	79
<b>Figure .III.15.</b> Evolution du pourcentage d'inhibition (%) du MTE, MTA et de l'acide ascorbique par le test ABTS.	80

## Liste des schémas

<b>Schéma I.1.</b> Réaction catalysée par la PEP mutase.	05
<b>Schéma I.2.</b> Procédés de synthèse des phosphonates.	07
<b>Schéma I.3.</b> Synthèse de BPs à partir d'un acide carboxylique.	09
<b>Schéma I.4.</b> Synthèse de BPs à base de nitrile.	09
<b>Schéma I.5.</b> Procédés de synthèse d' $\alpha$ -aminophosphonates.	10
<b>Schéma I.6.</b> Schéma global de la réaction Kabachnik - Fields.	11
<b>Schéma I.7.</b> chemins possibles pour la réaction de Kabachnik–Fields [37,38].	11
<b>Schéma I.8.</b> Le mécanisme " $\alpha$ -hydroxyphosphonate" suggéré pour la réaction de Kabachnik -Fields.	12
<b>Schéma I.9.</b> La réaction de Pudovik.	13
<b>Schéma I.10.</b> La réaction de Moedritzer-Irani.	13
<b>Schéma I.11.</b> Mécanisme de la réaction de Moedritzer-Irani.	15
<b>Schéma I.12.</b> Réaction de Schwarzenbach.	16
<b>Schéma I.13.</b> Synthèse des $\alpha$ -hydroxyphosphonates.	17
<b>Schéma II.1.</b> Synthèse de l'acide $\alpha$ -aminophosphonique ( MTA).	33
<b>Schéma II.2.</b> Synthèse de l'ester $\alpha$ -aminophosphonate (MTE).	34
<b>Schéma II.3.</b> Synthèse de l'ester $\alpha$ -aminophosphonate (5MC).	34
<b>Schéma III.1.</b> Synthèse de l'acide $\alpha$ -aminophosphonique (MTA) et des esters $\alpha$ -aminophosphonates(MTE) et (5MC).	48
<b>Schéma III.2.</b> Dénomination de MTA, MTE, et 5MC selon IUPAC.	49
<b>Schéma III.3.</b> Voies principales de la réaction de «Irani-Moedritzer.	50
<b>Schéma III.4.</b> Mécanisme réactionnel de la synthèse de MTA selon la voie 1.	51
<b>Schéma III.5.</b> Mécanisme réactionnel de la synthèse de MTA selon la voie 2.	52
<b>Schéma III.6.</b> Mécanisme réactionnel de la synthèse de MTE selon la voie1.	53
<b>Schéma III.7.</b> Mécanisme réactionnel de la synthèse de MTE selon la voie2.	54

## Liste des tableaux

<b>Tableau I.1.</b> Principaux types de composés organophosphoré	04
<b>Tableau I.2.</b> Nomenclature des plus courants des composés organophosphorés trivalents	04
<b>Tableau III.1.</b> Rendements des produits synthétisés.	55
<b>Tableau III.2.</b> Aspects et points de fusion des produits synthétisés.	56
<b>Tableau III.3.</b> Les rapports frontaux des produits synthétisés.	56
<b>Tableau III.4.</b> Solubilités des produits synthétisés.	57
<b>Tableau III.5.</b> Valeurs trouvées et calculées des éléments (C, H et N) des produits synthétisés	57
<b>Tableau III.6.</b> Attribution des bandes d'absorption des produits synthétisés MTA, MTE et 5MC.	60
<b>Tableau III.7.</b> Interprétation des spectres RMN <sup>1</sup> H de MTA, MTE et 5MC.	63
<b>Tableau III.8.</b> Paramètres géométriques optimisés pour MTE , MTA et 5MC (longueurs de quelques liaisons).	68
<b>Tableau III.9.</b> Paramètres géométriques optimisés pour MTE , MTA et 5MC (quelques angles).	68
<b>Tableau III.10.</b> Distribution des charges Mulliken sur les atomes de MTA , MTE et 5MC.	70
<b>Tableau III.11.</b> Calculs par B3LYP/6-31G (d,p) des moments dipolaires électriques (Debye) de MTA , MTE et 5MC.	72
<b>Tableau III.12.</b> Energies de HOMO, LUMO, écarts énergétiques (HOMO/LUMO) et Indices de réactivité des molécules MTA , MTE et 5MC.	75
<b>Tableau III.13.</b> Pourcentage d'inhibition et valeurs IC <sub>50</sub> de MTA, MTE et acide ascorbique par l'essai ABTS et l'essai DPPH	79
<b>Tableau III.14.</b> Valeurs IC <sub>50</sub> , A <sub>0.50</sub> de 5MC par les différents essais de l'activité anti-oxydante.	80
<b>Tableau III.15.</b> Activité antibactérienne du MTA et du MTE.	81
<b>Tableau III.16.</b> Zone d'inhibition en (mm) formée sur les différent champignons par le MTA et le MTE.	82
<b>Tableau III.17.</b> Coefficients de partage calculés (log P) des molécules MTA, MTE, Ampicilline et Nystatin.	83
<b>Tableau III.18.</b> Inhibitions des enzymes AChE et BuChE par MTA et MTE synthétisés.	83
<b>Tableau III.19.</b> Inhibitions des enzymes AChE, $\alpha$ -Glucosidase et $\alpha$ -Amylase par le produit 5MC.	84

## Abréviations

**AA** : Acide Ascorbique  
**ABTS** : 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid  
**AChE** : Acetylcholinesterase  
**AcOET** : Acétate d'éthyle  
**ADN** : Acide Désoxyribonucléique.  
**ARN** : Acide ribonucléique.  
**ATP** : Adénosine triphosphate  
**A<sub>0.50</sub>** : la concentration de l'absorbance 0.5  
**BChE** : Butyrylcholinestérase  
**BHA** : Butylated hydroxyanisole  
**BHT** : Butylated hydroxytoluene  
**Bis(Pom) PME A** : Adefovir dipivoxil  
**BPs** : biphosphonates  
**CCM** : Chromatographie sur Couches Minces  
**ChE** : Cholinestérase  
**CUPRAC** : CUPric Reducing Antioxidant Capacity  
**°C**: Degré Celsius  
**DCM** : Dichloromethane  
**DFT** : Density Functional Theory  
**DMF** : Diméthylformamide  
**DMSO** : Diméthylsulfoxyde  
**DPPH** : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl  
**DTNB** : 5,5'-dithiobis- (2-nitrobenzoic acid)  
**EtOH** : Ethanol  
**FRAP** : Ferric Reducing Antioxidant Power  
**FTIR** : Fourier-transform infrared spectroscopy  
**GABA** : Acide gamma-aminobutyrique  
**HF** : Fluorure d'hydrogène  
**HOMO** : Orbitale Moléculaire Haute Occupée  
**IC<sub>50</sub>** : Concentration inhibitrice médiane  
**IR** : Infra-Rouge  
**IUPAC** : International Union of Pure and Applied Chemistry  
**LUMO** : Orbitale Moléculaire Basse Occupée  
**MAS** : Microwave assisted synthesis  
**MeOH** : Methanol  
**MO** : Micro-ondes  
**MT** : m-Toluidine  
**MTA** : Acide  $\alpha$ -amino phosphonique synthétisé à partir de m-Toluidine  
**MTE** : Ester  $\alpha$ -amino phosphonate synthétisé à partir de m-Toluidine  
**MW** : Microwave  
**NA** : N'a pas d'activité  
**NT** : Non testé

**OF** : Orbitale frontière  
**OM** : Orbitale moléculaire  
**OP** : Organophosphoré  
**PEP** : Phosphoenolpyruvate  
**pH** : Power of hydrogen  
**PTP** : Protéine tyrosine phosphatase  
**Post HF** : post-Hartree-Fock  
**R** : Rendement  
**Rf** : Rapport frontal  
**RMN** : Résonance magnétique nucléaire  
**RSA** : Relation Structure-Activité  
**SIDA** : Syndrome d'Immuno-Déficience Acquise  
**SOAM** : Synthèse organique assistée par micro-ondes  
**TEP** : Triethyl phosphite  
**Tf** : Température de fusion  
**TMS** : Tetramethylsilane  
**UV** : Ultra-Violet  
**UV-Vis** : Ultra-Violet Visible  
**V** : Volume  
**VHB** : Virus de l'Hépatite B  
**VIH** : Virus de l'immunodéficience humaine  
**5MC** : Ester  $\alpha$ -amino phosphonate synthétisé à partir de 2-amino-5-methylphenol  
**ℓ** : Longueur  
**%** : Pourcentage  
 **$\alpha$**  : Alpha  
 **$\mu$**  : Moment dipolaire  
 **$\chi$**  : Electronegativité  
 **$\lambda_{max}$**  : Longueur d'onde maximale  
 **$\eta$**  : Dureté

# *Introduction générale*

La synthèse de nouvelles molécules à intérêt biologique présente un objectif pour les chimistes organiciens [1]. Dans ce contexte, plusieurs investigations portent sur les modifications structurales que l'on peut apporter à des molécules modèles telles que les médicaments synthétiques et les biomolécules naturelles, plusieurs recherches ont été consacrées à la synthèse et au développement de nouvelles molécules capables de s'hybrider sélectivement ou bien d'interférer avec les processus biologiques, ces dernières s'articulent essentiellement autour de la chimie des hétéroatomes, notamment celle du phosphore .

Le phosphore est un élément chimique essentiel à presque toutes les réactions chimiques à l'intérieur des cellules, il est principalement obtenu à partir de la roche phosphatée ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) [2]. 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 principalement dans son état d'oxydation le plus élevé et se présente sous forme de phosphates de calcium, de sodium ou de potassium [3]. Le phosphore est un élément chimique du groupe  $V_A$  de la troisième période du tableau périodique symbolisé par P. C'est un non-métal multivalent appartenant au groupe de l'azote (groupe 15). Il est très réactif et s'oxyde spontanément au contact de l'oxygène atmosphérique émettant de la lumière. La chimie du phosphore est utilisée dans plusieurs domaines notamment dans l'inhibition de la corrosion, dans la catalyse, traitement des eaux, l'industrie agroalimentaire et dans l'industrie pharmaceutique particulièrement comme médicaments efficaces contre le cancer et les maladies inflammatoires [4].

Le champ d'application des composés organophosphorés est très large, il couvre des domaines allant de la synthèse des pesticides et des insecticides, en passant par des produits agrochimiques jusqu'en pharmacie et en médecine. Parmi ces composés organophosphorés, on trouve les phosphonates, qui possèdent des propriétés chimiques et biologiques intéressantes, ce qui leur confèrent des applications biologiques et médicales. L'importance de ces composés se présente dans le fait que la liaison P-O soit remplacée par une liaison P-C plus stable empêchant ainsi leur hydrolyse par les phosphatases.

Les phosphonates et leurs dérivés sont des composés contenant le phosphore et considérés parmi les composés organiques les plus abordées dans les différents domaines de recherches et industries. Ces composés trouvent des applications dans les domaines de l'agriculture, de la médecine et de l'industrie chimique [5].

Les tendances des chercheurs, au cours des dernières années, ont été orientées vers les dérivés des phosphonates qui sont les esters aminophosphonates et les acides  $\alpha$ -aminophosphoniques. Ces derniers sont une classe importante de composés biologiquement actifs, qui ont reçu une attention croissante et sont considérés comme des analogues phosphorés des acides aminés [6]. Ils ont attiré beaucoup d'attention en raison de leur faible toxicité et haute activité biologique. L'unité phosphonique a été établie en tant que bio-isostère d'un fragment carboxylique. Cette caractéristique explique la variété des activités biologiques [7-10]. Ils sont considérés comme cible importante dans le développement d'antibiotiques, d'espèces antivirales, d'antihypertenseurs et d'agents anti tumoraux en raison de leur effet inhibiteur des récepteurs GABA, des inhibiteurs d'enzymes et des anti-métabolites [11-16].

Les  $\alpha$ -aminophosphonates occupent une place importante et révèlent des propriétés biologiques diverses et intéressantes: herbicides [17], pesticides [18], antibactériens [19,20], antifongiques [21] bactéricides [22-24], antioxydants [25], inhibiteurs de diverses enzymes, y compris la protéase du VIH, la collagénase humaine [26] et la synthase [27], la rénine [28] et les PTPases [29,30]. Les acides  $\alpha$ -aminophosphoniques sont considérés comme des anti-viraux [31], des agents anti-tumoraux [32], et peuvent même être des imitateurs de peptides [33], hypothétiques agents radioprotecteurs [34]. Ils ont également plusieurs applications dans l'industrie agricole [35,36] et en électrochimie comme agents anti-corrosifs [37,38]. Ils peuvent être utilisés comme agents complexants [39], et dans l'inhibition du tartre [40].

Un grand nombre de méthodes de synthèse de divers  $\alpha$ -aminophosphonates ont été publiés depuis la première synthèse par Fields [41]. L'une de ces réactions est la réaction Moedritzer-Irani, puisqu'elle a été rapportée pour la première fois par ces auteurs en 1966 [42], qui utilise l'acide phosphoreux, le formaldéhyde et une amine pour produire un acide biphosphonique couplé à l'atome d'azote de l'amine [43,44]. Lorsqu'une amine primaire est utilisée, la réaction produit un acide bis-phosphonique car l'amine secondaire qui est générée *in situ* est plus réactive que l'amine primaire de départ [45].

Cependant, la voie la plus remarquable de synthèse des  $\alpha$ -aminophosphonates est la réaction de Kabachnik-Fields [46,47] qui est une procédure à trois composants à un pot utilisant du composé carbonyle, une amine et un dialkyle /trialkyle phosphite.

Compte-tenu de l'immense importance de ces composés, l'objectif de ce travail est la synthèse de deux dérivés phosphonates, selon le procédé *d'Irani-Moedritzer* pour former un

acide  $\alpha$ -aminophosphonique et selon le procédé de Kabachnik-Fields pour former un ester  $\alpha$ -aminophosphonate. Les synthèses seront réalisées selon deux procédés :

- Un procédé classique sous reflux. Cependant, ces procédés souffrent d'inconvénients tels que le temps de réaction prolongé et l'utilisation de sources de phosphore coûteuses et dangereuses.
- Un procédé à l'aide de micro-ondes. Les micro-ondes ouvrent de nouvelles opportunités au chimiste synthétique sous la forme de nouvelles réactions difficiles à utiliser avec le chauffage conventionnel. L'intérêt de la synthèse organique assistée par micro-ondes (SOAM) s'est accru ces dernières années [48]. Les temps de réaction courts fournis par la synthèse micro-ondes la rendent idéale pour le dépistage de réaction rapide et l'optimisation des conditions de réaction.

Pour faire une comparaison entre ces deux techniques de synthèse, on a décidé d'utiliser une fois la méthode conventionnelle à reflux et une autre fois la SOAM, dans la synthèse d'un acide aminophosphonique (MTA) et un ester aminophosphonate (MTE) à partir de la 3-Toluidine (MT) et un ester aminophosphonate (5M) à partir de 2-amino-5-methylphenol.

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit est subdivisé en trois chapitres :

- **Le premier chapitre:** consiste en une étude bibliographique sur les phosphonates, en illustrant leurs types, classification, méthodes de synthèse, applications dans différents domaines et leurs propriétés biologiques.
- **Le deuxième chapitre:** est consacré en une présentation générale des différentes méthodes, matériels et logiciels utilisés pour réaliser le travail désiré.
- **Le troisième chapitre:** présente les résultats de synthèse, de caractérisation et de l'étude théorique par la méthode de DFT des produits obtenus via les réactions de Kabachnik-Fields et *Irani-Moedritzer*, ainsi que les résultats d'évaluation des activités biologiques.

Enfin, une conclusion générale qui récapitule l'essentiel du travail réalisé et des perspectives utiles pour la continuation de cette étude.

### Références

- [1] Suslick, K. S. *Scientific American*. 1989, 260, 80.
- [2] L.D. Quin, *A Guide to Organophosphorus Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., New York, (a) Chapter 2, (b) Chapter 10, (c) Chapter 11. (2000).
- [3] R. Van Wazer, Phosphorus and its compounds, *Interscience Publishers*, 93, (1961).
- [4] E. Breuer, the Chemistry of Organophosphorus Compounds, vol. 4, John Wiley & Sons, New York, New Y., USA (1996).
- [5] J. B. Saito, H. Egami, T. J. Katsuki, *Am. Chem. Soc.* 2007, 129. (1978).
- [6] K.D. Treov, *Chemistry and application of H-phosphonates*; Elsevier: Amsterdam, (2006).
- [7] P. Kafarski, B. Lejczak, *Phosphorus, Sulfur, Silicon Relat. Elem.*, 63, 193, (1991).
- [8] V.P. Kukhar, H.R. Hudson, *Aminophosphonic and Aminophosphinic Acids: Chemistry and biological activity*, John Wiley: Chichester, (2000).
- [9] A.P. Kaplan, P.A. Bartlett, *Biochemistry*, 30, 8165, (1991).
- [10] N.S. Zefirov, E.D. Matveeva, *Catalytic Kabachnik-Fields reaction: New horizons for old reaction*. ARKIVOC, 1–17, (2008).
- [11] S.C. Fields, *Synthesis of natural products containing a C-P bond*. *Tetrahedron*, 55, 12237–12272, (1999).
- [12] P. Kafarski, B. Lejczak, *Aminophosphonic acids of potential medical importance*. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, 1, 301–312, (2001).
- [13] 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, *Synthesis of novel N-phosphonoalkyl dipeptide inhibitors of human collagenase*. *J. Med. Chem.* 37, 158–169, (1994).
- [14] W.S. Liu, C.J. Rogers, A.J. Fisher, M.D. Toney, *Aminophosphonate inhibitors of dialkylglycine decarboxylase: Structural basis for slow binding inhibition*. *Biochemistry*, 41, 12320–12328, (2002).
- [15] A. Mucha, P. Kafarski, L. Berlicki, *Remarkable potential of the  $\alpha$ -aminophosphonate/phosphinate structural motif in medicinal chemistry*. *J. Med. Chem.* 54, 5955–5980, (2011).
- [16] L.X. Xiao, K. Li, D.Q. Shi, *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, vol. 183, no. 12, pp. 3156–3165, (2008).
- [17] C. Fest, K.J. Schmidt, *The Chemistry of Organophosphorus Pesticides*, vol. 12, Springer, (1982).

## *Introduction générale*

---

- [18] F.R. Atherton, C.H. Hassall, R.W. Lambert, *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 29, no. 1, pp. 29–40, (1986).
- [20] R.F. Pratt, *Science*, vol. 246, no. 4932, pp. 917–919, (1989).
- [21] A. Hellal, S. Chafaa, N. Chafai, L. Touafri, *J. Mol. Struct.* 1134 217e225, (2017).
- [22] M. S.Bhatia, P.Pawanjit, *Experientia*, vol. 32, no. 9, p. 1111, (1976).
- [23] P.N. Manne, S.D. Deshmukh, N.G.V. Rao, H.G. Dodale, and S.N. Tikar, *Pestology*, vol. 34, p. 65, (2000).
- [24] D. Hendlin, E.O. Stapley, M. Jackson, *Science*, vol. 166, no. 3901, pp. 122–123, (1969).
- [25] A. Hellal, S. Chafaa, N. Chafai, *International Journal of Science and Engineering Research* 6, 1622-1627(2015).
- [26] C. De Risi, D. Perrone, A.Dondoni, G. P.Pollini, V.Bertolasi, *Eur. J. Org. Chem.*, 1904(2003).
- [27] B. Stowasser, K.H. Budt, L.Jain-Qi, A.Peyman, D.Ruppert, *Tetrahedron Lett.*, 33, 6625 (1992).
- [28] D. V. Patel, K.Reilly-Gauvin, D. E. Ryono, *Tetrahedron Lett.*, 31, 5587(1990).
- [29] T. R.Bruke, J. J. Brachi, C. George, G.Wolf, S. E.Shoelson, X.Yan, *J. Med. Chem.* (1995).
- [30] A.Peyman, K. H.Budt, J. S.Paning, B. Stowasser, D. Ruppert, *Tetrahedron Lett.*, 33, 4549. (1992).
- [31] J. Huang and R. Chen, *Heteroatom Chemistry*, vol. 11, pp. 480–492 (2000).
- [32] G. Lavielle, P. Hautefaye, C. Schaeffer, J.A. Boutin, C.A. Cudennec, and A. Pierré, *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 34, no. 7, pp. 1998–2003 (1991).
- [33] P. Kafarski and B. Lejczak, *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, vol. 63, no. 1-2, pp. 193–215, (1991).
- [34] L.K. Sal'keeva, M.T. Nurmaganbetova, O.Sh. Kurmanaliev, T.Kh. Gazizov, *Rus. J. Org. Chem.*, 38(5), 723 – 725 (2002).
- [35] N. E.Jacobsen, P. A. Bartlett, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 654. (1981).
- [36] (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).
- [37] N. Chafai, S. Chafaa, K. Benbouguerra, D. Daoud, A. Hellal, M. Mehri, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 70, 331-344,(2017).
- [38] K. Benbouguerra, S. Chafaa, N. Chafai, M. Mehri, O. Moumeni, A. Hellal, *Journal of Molecular Structure* 1157, 165-176,(2018).

## *Introduction générale*

---

- [39] E. Farkas, I. Sóvágó, “Metal Complexes of Amino Acids and Peptides”, in “Amino Acids Peptides and Proteins”, G. C. Barrett, J. S. Davies (Editors), Royal Society of Chemistry, Cambridge, 33, 295 – 364, (2002).
- [40] M.B.Tomson, G. Fu, M.A.Watson, A. Kan T., U. Rice, “SPE Oilfield Scale Symposium - Society of Petroleum Engineers Inc.”, Mechanisms of mineral scale inhibition, Aberdeen, United Kingdom, (2002).
- [41] R.Ghosh, S.Maiti, A.Chakraborty, D. K.Maiti, J. Mol. Catal. A.: Chemical, 210, 53 (2004). (b) A. Heydari, H. Hamadi, M. Pourayoubi, Catal. Commun., 8, 1224 (2007).
- [42] K. Moedritzer, R. R. Irani, J. Org. Chem., 31, 1603–1607(1966).
- [43] K. Moedritzer, R. R. Irani, Journal of Organic Chemistry, 31, 1603-1607(1965).
- [44] D. Redmore, Journal of Organic Chemistry 43, (5), 992-996(1978).
- [45] P.B. Iveson, M.P. Lowe, J. C. Lockhart, Polyhedron, 12, 2313–2323(1993).
- [46] (a) M. I.Kabachnik, T. Medved Ya. Dokl. Akad. Nauk SSSR 1952, 83, 689; Chem. Abstr., 47, 2724. (1953) (b) M. I. Kabachnik, T.Medved Ya. Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Chim. 1953, 1126; idem, ibid., 1024. (1954) (c) E.Fields J. Am. Chem. Soc., 74, 1528. (1952).
- [47] R. A.Cherkasov, V. I. Galkin, Russ. Chem. Rev., 67, 857; Chem. Abstr., 47, 2724b. (1998).
- [48] C.O. Kappe, D.Dallinger, The impact of microwave synthesis on drug discovery. Nat. Rev. Drug Discovery, 5: 51-63, (2006).

*Chapitre I : Recherche bibliographique sur les composés  
organophosphorés et les phosphonates*

## I.1. Introduction

Après l'hydrogène, le carbone, l'oxygène et l'azote, le phosphore représente le cinquième élément le plus répandu à l'échelle biologique. Toutefois, il est nettement moins répandu que les quatre précédents. Sans la présence de cet élément essentiel, aucune forme de vie n'est possible. Il est présent dans l'ADN, l'ARN, les molécules d'ATP et les membranes des cellules. Sous sa forme brute, le phosphore est un élément toxique, mais il assure un rôle biologique essentiel sous ses autres aspects ioniques ou organophosphorés. Le champ d'application des composés organophosphorés est très étendu, allant de la fabrication de pesticides et d'insecticides aux préparations pharmaceutiques et aux médicaments, en passant par les produits agrochimiques. Parmi ces dérivés organophosphorés, on peut distinguer les phosphonates, qui possèdent des propriétés chimiques et biologiques très appréciables, ce qui les rend aptes à des applications biologiques et pharmaceutiques. Leur principal intérêt réside dans le fait que la liaison P-O est remplacée par une liaison P-C beaucoup plus stable, ce qui évite leur hydrolyse par les phosphatases.

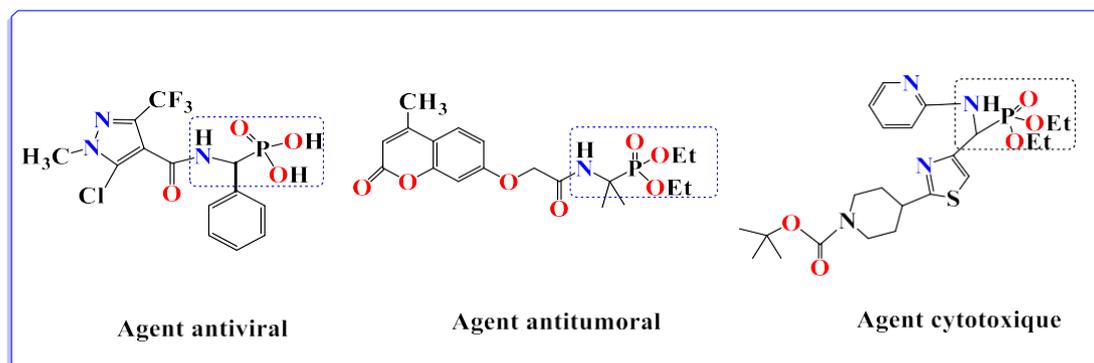


Figure I.1. Caractéristiques biologiques de certains dérivés d' $\alpha$ -aminophosphonates.

## I.2. Les composés organophosphorés

Il s'agit de substances organiques ayant au moins un atome de phosphore attaché directement à un atome de carbone. Cette catégorie de produits inclut un grand spectre de composés de synthèse servant de pesticides (parathion, malathion, chlorpyrifos, dichlorvos), dont certains sont des produits pharmaceutiques (échothiophate, métrifonate, cyclophosphamide), et d'autres qui sont des toxines de guerre dangereuses (agents G : tabun, sarin, soman, cyclohexyl-sarin, et agents V : VX, VR, VC). Ces substances constituent des agents irréversibles inhibant la cholinestérase (ChE) [1]. On peut distinguer deux sortes de ChE, l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE). L'AChE est largement impliquée dans la neurotransmission en hydrolysant son neuromédiateur,

l'acétylcholine. l'inhibition de cette dernière provoque son accumulation dans les synapses et donc un arrêt des transmissions cholinergiques centrales et secondaires. En cas d'intoxication aiguë par les OP, on observe des spasmes gastro-intestinaux, une hypersalivation et une dépression des organes cardiovasculaires et respiratoires, ce qui entraîne la mort. Les dommages causés au système nerveux central se traduisent par une crise d'épilepsie convulsive qui, si elle n'est pas stoppée rapidement, peut engendrer des conséquences neuropathologiques graves (nécrose cellulaire) dans de nombreuses zones du cerveau, y compris celles qui interviennent dans la mémoire et l'apprentissage [2]. Les substances biologiquement actives, comme l'ADN, qui jouent un rôle majeur dans la biochimie, ne sont pas des organophosphates à part entière : elles ne comportent pas de liaisons entre le carbone et le phosphore et ne sont que des mono-, di- et triphosphates. Le ténofovir est un composé organophosphoré au sens propre, alors que le monophosphate de désoxyadénosine ne l'est pas.

Les composés organophosphorés occupent une place de plus en plus importante dans la vie quotidienne moderne et offrent un vaste éventail d'applications scientifiques et industrielles. De nos jours, la chimie du phosphore constitue même une discipline indépendante. On trouve actuellement des composés organophosphorés dans les formulations de médicaments [3-4], les détergents [5-6], les dentifrices [4-5], les insecticides [5-7], les produits pétroliers [5-8], les plastifiants [5], les carburants [5], les flotteurs [5,9,10], les antioxydants [11-12] et les retardateurs de flamme [5].

### **I .3. Principales classes des composés organophosphorés :**

Les dérivés organophosphorés sont répartis en plusieurs groupes en fonction du degré d'oxydation du phosphore et de la qualité des substituants, en particulier la présence d'un oxygène ou d'un autre halogène : oxyde de phosphine, phosphinite, phosphonite, phosphite, phosphonate, phosphinate, phosphate...

Les sociétés American Chemical Society et Royal Chemical Society de Londres ont établi un système de dénomination couramment utilisé, selon lequel les dérivés des hydrures, oxyacides et oxydes de phosphore sont des composés organophosphorés.

Les substances concernées par cette nomenclature sont les acides suivants (**Tableau I.1**).

**Tableau I.1.** Principaux types de composés organophosphorés.

Nomenclature	Acides correspondants
Phosphines	H <sub>3</sub> P
Oxydes de phosphines	H <sub>3</sub> PO
Phosphoranes	H <sub>5</sub> P
Acides phosphoreux	P(OH) <sub>3</sub>
Acides phosphineux	PH <sub>2</sub> (OH)
Acides phosphiniques	H <sub>2</sub> (OH)P(O)
Acides phosphoriques	(OH) <sub>3</sub> P(O)
Pyrophosphates et esters pyrophosphoniques	(H <sub>2</sub> PO) <sub>2</sub> (O)
Acides phosphoniques	H(OH) <sub>2</sub> P(O)

Alors que les composés, comportant des Liaisons entre le Carbone et le Phosphore, sont assimilés à des produits de substitution provenant du remplacement de l'atome d'hydrogène d'une liaison H-P par un groupement alkyle ou aryle. (**Tableau I.2**).

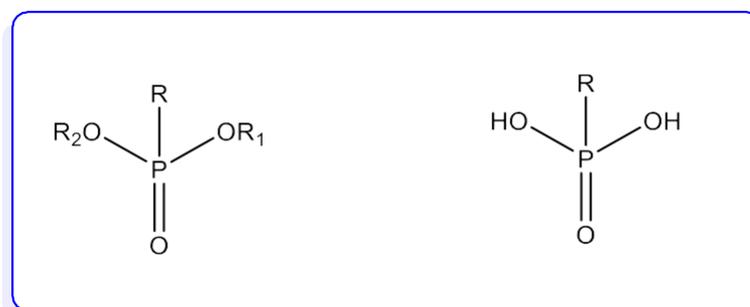
**Tableau I.2.** Nomenclature des plus courants des composés organophosphorés trivalents.

Composés	Formule générale	Exemples
Phosphines	PR <sub>3</sub>	Tributylphosphine
Phosphites	P(RO) <sub>3</sub>	Triethylphosphite
Phosphonites	RP(OR) <sub>2</sub>	Ethyl-diméthyl-phosphonite

Dans cette vaste catégorie d'organophosphates, notre intérêt s'est porté sur la famille des phosphonates et notamment sur les acides aminophosphoniques et leurs esters.

#### I.4. Les phosphonates

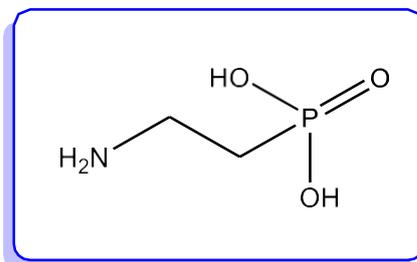
Les phosphonates et les acides phosphoniques sont des dérivés organophosphorés comportant le fragment C-PO (OH)<sub>2</sub> ou C-PO (OR)<sub>2</sub>, (où R = alkyle, aryle). (**Figure I.2**).



**Figure I.2.** Structure générale des phosphonates et des acides phosphoniques.

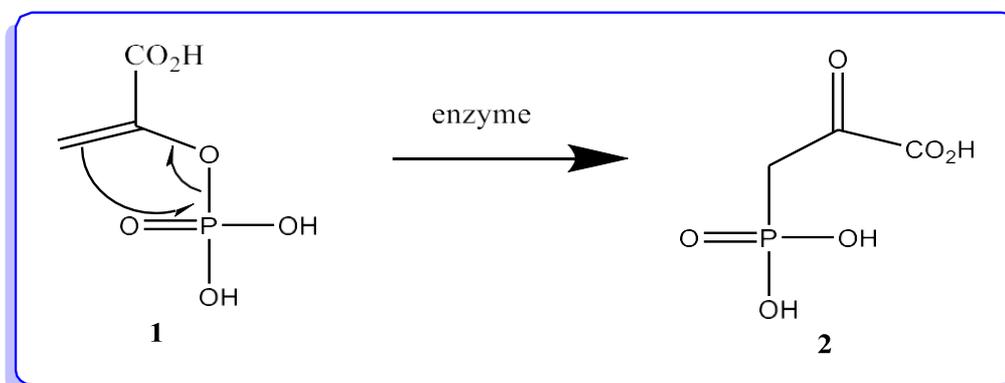
Les phosphonates représentent une importante catégorie de dérivés organophosphorés. Leur utilité dans de nombreuses utilisations est bien connue et leur rôle dans de nombreux

domaines ne fait que croître. Le premier phosphonate naturel découvert, l'acide 2-aminoéthane phosphonique (**Figure I.3**), a été identifié par Kandatsu et Horiguchi à partir de protozoaires de rumen de mouton en 1959[13].



**Figure I.3.** Acide 2-aminoéthane phosphonique.

Cela a entraîné la découverte rapide d'une variété de phosphonates naturels issus d'un ensemble de sources, y compris des champignons et des bactéries [14-17]. Bien que les mécanismes biologiques des phosphonates naturels ne sont pas complètement compris, des scientifiques de l'université de Harvard ont réussi à isoler une enzyme capable de former des liaisons C-P lors de la transformation des composés (1) en (2) dans le schéma I.1). Cette enzyme appelée phosphoénolpyruvate phosphonmutase (PEP mutase) est originaire de *Tetrahymena pyriformis*. La découverte de cette enzyme a jeté une lumière supplémentaire sur les processus liés à la biosynthèse des phosphonates [17,18].



**Schéma I.1.** Réaction catalysée par la PEP mutase.

Les domaines d'application dans lesquels les phosphonates ont été utilisés sont nombreux. Les utilisations industrielles sont innombrables, la fonctionnalité des phosphonates comme agents chélateurs et inhibiteurs de corrosion étant efficace [19-21].

Les phosphonates occupent aussi un rôle important en tant que ralentisseurs de flamme. Par exemple, le phosphonate ignifuge oligomère a été conçu pour le traitement des bois naturels, diminuant significativement les propriétés de combustion du bois protégé par rapport au bois non protégé [22].

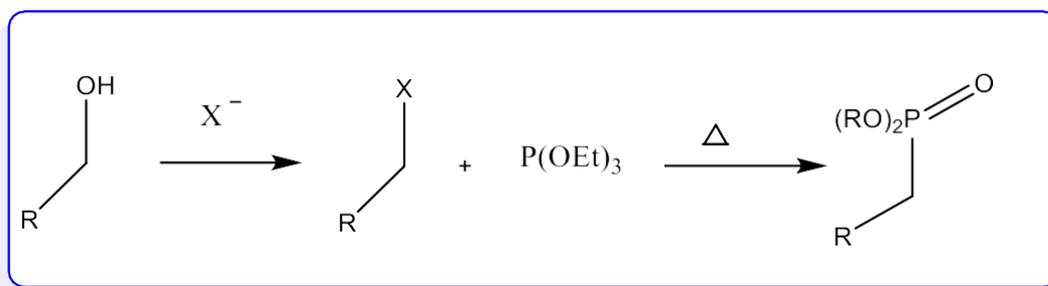
Outre leurs diverses applications dans le domaine industriel, les phosphonates jouent un rôle essentiel en tant que pesticides et herbicides. Les pesticides sont considérés comme "toute substance ou mélange de substances visant à prévenir, éliminer, éloigner ou limiter l'action de tout organisme nocif". [23]. La fonction phosphonate a été intégrée dans une série de médicaments médicalement efficaces. De plus, les nucléosides phosphonates acycliques ont révélé un pouvoir thérapeutique sur les espèces pathologiques [24]. Par exemple, le fumarate de ténofovir disoproxil est un agent thérapeutique autorisé pour le traitement du VIH chez l'homme et a démontré son utilité dans le cas du traitement de l'hépatite B (VHB) [25]. [25]. Outre les traitements antibiotiques et antiviraux que permettent les phosphonates, quelques-uns ont prouvé leur capacité à traiter les maladies cancéreuses [26] et les agents antiparasites [27,28].

#### **I.4.1. Synthèse des phosphonates**

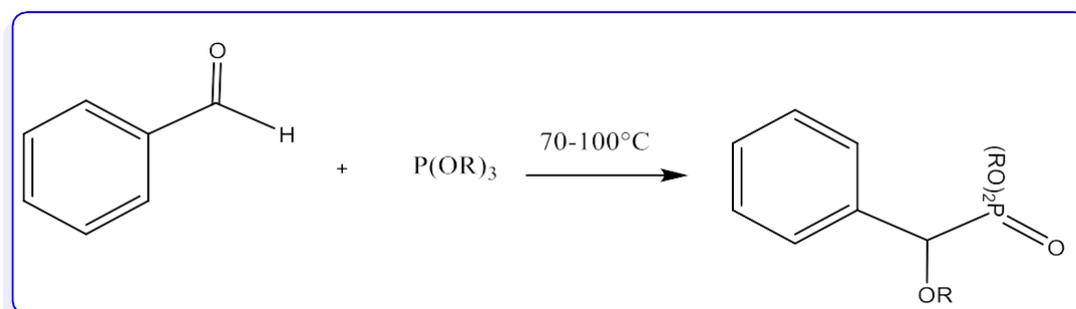
Avec la diversité des applications industrielles et synthétiques des phosphonates, un des problèmes étonnants que l'on rencontre dans cette chimie est le nombre relativement limité de méthodes permettant la synthèse des phosphonates.

La réaction de Michaelis-Arbuzov est la plus fréquemment employée pour la préparation des phosphonates, mais il existe d'autres méthodes importantes comme les procédures d'Abramov, de Pudovik et de Michaelis-Becker (**Schéma I.2**) [29]. Les réactions d'Abramov et de Pudovik conduisent à des  $\alpha$ -hydroxyphosphonates à partir de phosphite de dialkyle et d'un aldéhyde ou d'une cétone. Tandis que la réaction d'Abramov met en œuvre le triester du phosphite, la réaction de Pudovik implique l'attaque d'un phosphore anionique, puis une neutralisation. Par opposition aux procédés précédents, la réaction de Michaelis-Becker est une substitution nucléophile favorisée par une base sur un halogénure d'alkyle par un agent phosphoré anionique, qui aboutit finalement à un phosphonate d'alkyle.

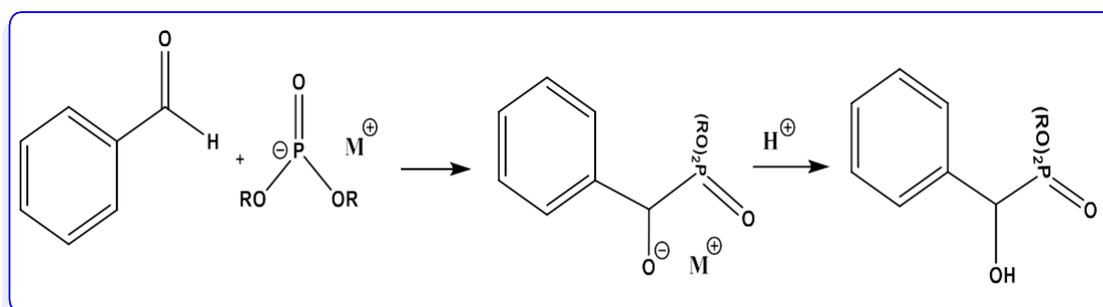
**Réaction de Michaelis-Arbuzov:**



**Réaction d'Abramov :**



**Réaction de Pudovik :**



**Réaction de Michaelis-Becker:**

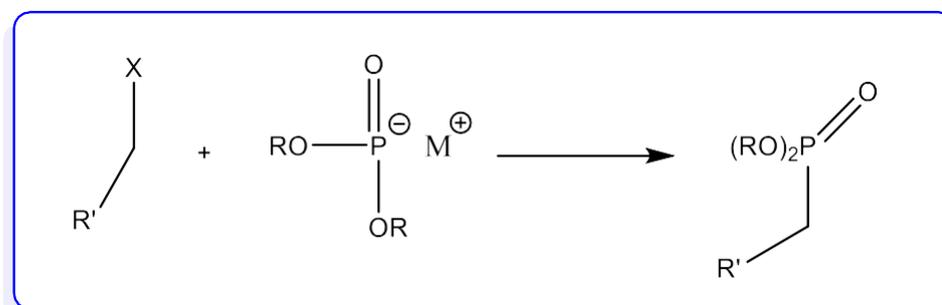
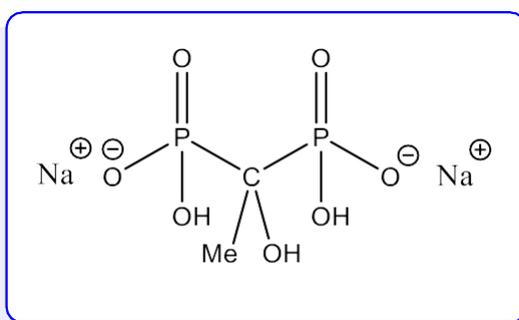


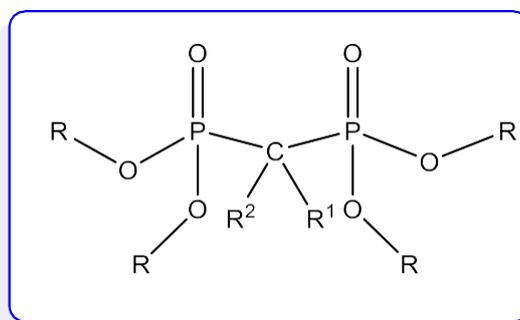
Schéma I.2. Procédés de synthèse des phosphonates.

## I.5. Les bisphosphonates

Les bisphosphonates (BP) font partie des dérivés organophosphorés de synthèse qui possèdent un squelette Structurel P–C–P (**Figure I.4**). Les premiers bisphosphonates sont apparus en 1897 [30]. L'etidronate (**Figure I.5**), le premier bisphosphonate à être employé sur le plan clinique chez l'homme, a été synthétisé pour la première fois il y a plus de cent ans [31]. Les bisphosphonates étaient initialement destinés à être utilisés comme inhibiteurs de corrosion et agents de coloration dans les secteurs du textile, de l'industrie pétrolière et des engrais. Les bisphosphonates sont en outre utilisés dans le traitement des pathologies osseuses (ostéoporose) [32].

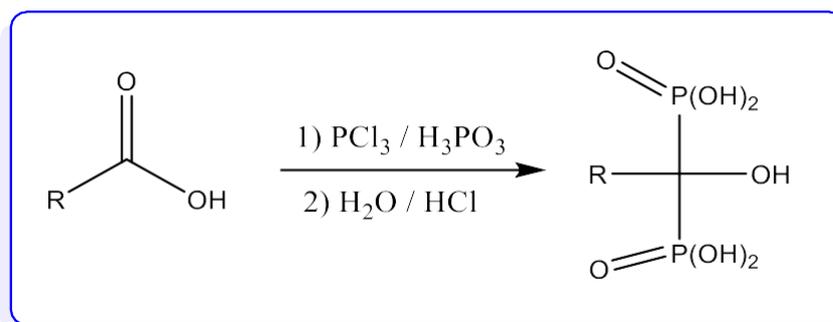


**Figure I.4.** Structure commune des bisphosphonates.



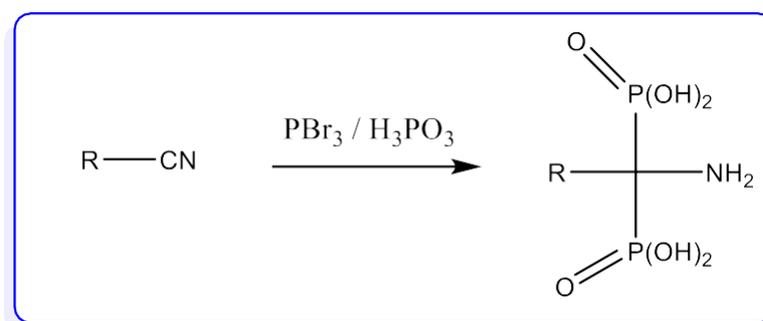
**Figure I.5.** Structure de l'etidronate disodique.

La méthode de préparation des BPs, la plus couramment citée et utilisée au niveau industriel (méthode Merck), consiste en la mise en réaction d'un acide carboxylique avec un mélange de diacide phosphoreux et de trichlorure de phosphore [33]. Après réchauffement à 100°C durant quelques heures, la transformation est hydrolysée en milieu acide (**Schéma I.3**).



**Schéma I.3.** Synthèse de BPs à partir d'un acide carboxylique.

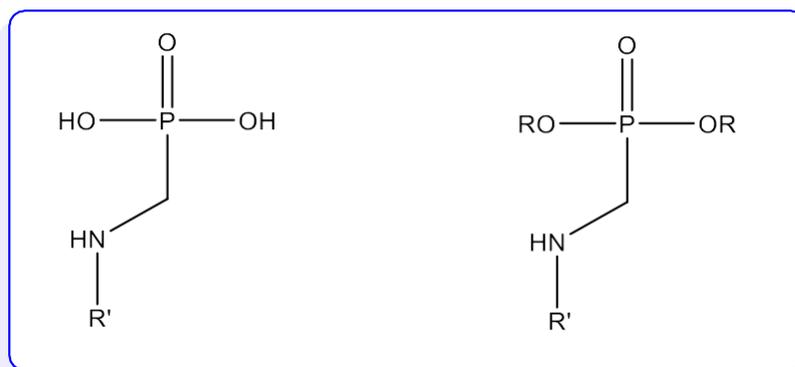
Bien que largement utilisée, cette approche possède des inconvénients. Tout en premier lieu, les conditions opératoires rigoureuses de cette réaction ne sont pas adaptées aux substances délicates. En plus, l'extraction du bisphosphonate du milieu réactionnel est généralement difficile. Ce procédé concerne également les composés présentant une fonction nitrile [34] (**Schéma I.4**). En ce cas, le produit final contient une fonction amine primaire en position  $\alpha$  des deux fonctions phosphonates.



**Schéma I.4.** Synthèse de BPs à base de nitrile.

### I.6. Les $\alpha$ -aminophosphonates

Les  $\alpha$ -aminophosphonates et leurs acides  $\alpha$ -aminophosphoniques représentent les éléments les plus intéressants du fait de leur structure similaire aux aminoacides. Les  $\alpha$ -aminophosphonates intéressent beaucoup les chimistes en raison de leurs larges utilisations dans divers secteurs. Il s'agit de substances organiques comportant une liaison (-N-C-P), où le phosphore est pentavalent (**Figure I.6**).



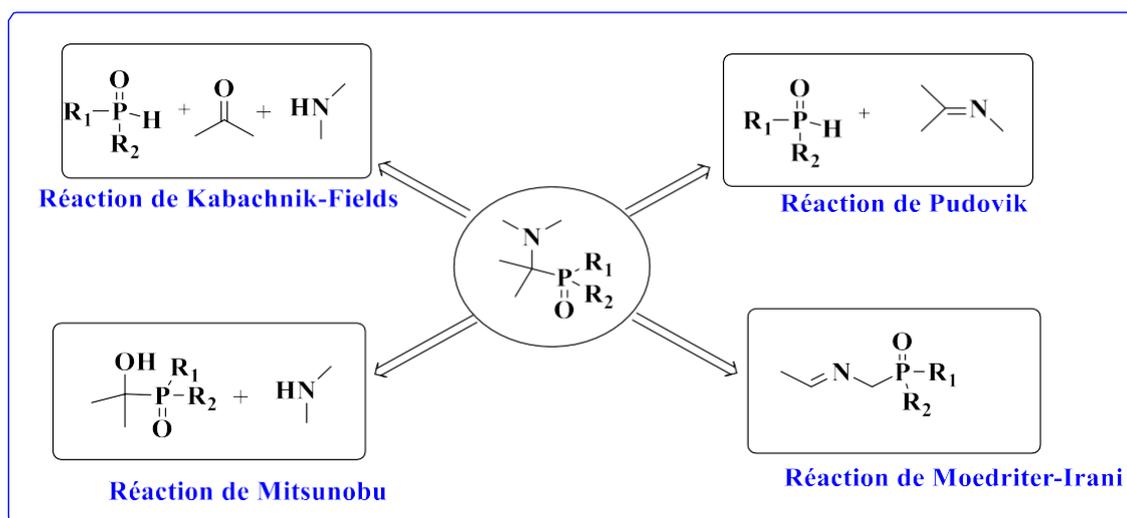
Acide  $\alpha$ -aminophosphonique

Ester  $\alpha$ -aminophosphonique

**Figure I.6.** Structures des esters et acides  $\alpha$ -aminophosphoniques.

### I.6.1. Synthèse des esters $\alpha$ -Aminophosphonates

Les principales méthodes de synthèse des dérivés de l' $\alpha$ -aminophosphonate sont décrites par le schéma ci-après.



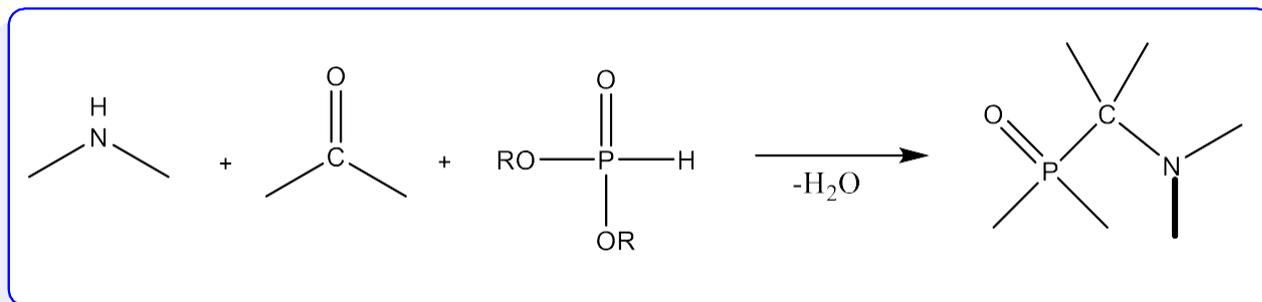
**Schéma I.5.** Procédés de synthèse d' $\alpha$ -aminophosphonates.

La réaction de condensation de Kabachnik-Fields ainsi que la réaction de Pudovik représentent les deux principales voies de synthèse des  $\alpha$ -aminophosphonates.

### I.6.2. Réaction de Kabachnik-Fields

La méthode de Kabachnik-Fields comportant la condensation des amines primaires ou secondaires, des dérivés oxo (aldéhydes et cétones) et des entités  $>P(O)H$  (Schéma I.6), particulièrement les phosphites de dialkyle, constitue un excellent choix pour synthétiser les  $\alpha$ -aminophosphonates qui jouent un rôle très important en raison de leurs propriétés

biologiques [35,36].

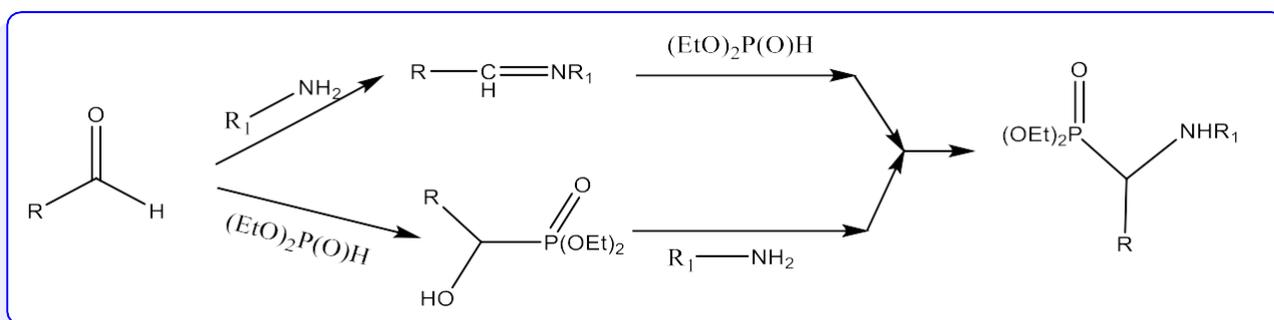


**Schéma I.6.** Schéma global de la réaction Kabachnik - Fields.

Cherkasov et al. ont fait une étude détaillée sur le déroulement de la réaction Kabachnik - Fields. Une première voie implique la formation d'une imine (une base de Schiff) par le composé carbonyle et l'amine (primaire), suivie de l'addition du phosphite de dialcyle sur le motif C=N de l'intermédiaire. La seconde voie consiste en la formation d'un  $\alpha$ -hydroxyphosphonate par addition du dialcylphosphite au groupement carbonyle de l'élément oxo, ensuite l'hydroxyphosphonate est substitué par l'amine pour obtenir l' $\alpha$ -aminophosphonate. Les études cinétiques permettent de constater que le mécanisme varie selon la qualité des réactifs. Ainsi, la réaction de condensation de l'aniline, du benzaldéhyde et d'un dialcylphosphite est censée suivre le mécanisme précédent.

Cependant, il est important de préciser que, avant de condenser l'aniline et le benzaldéhyde, une liaison H est créée entre la fonction P=O du phosphite et le motif HN de l'amine (**schéma I.7**) [37,38].

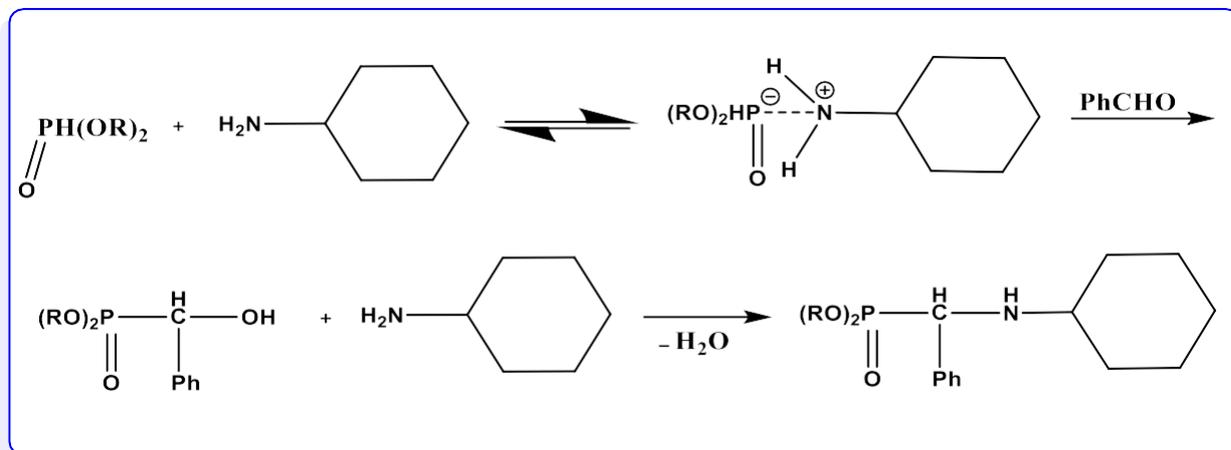
Deux mécanismes généraux ont été proposés (**Schéma I.7**) :



**Schéma I.7.** chemins possibles pour la réaction de Kabachnik – Fields [37,38].

Par ailleurs, Cherkasov et al. proposent de faire réagir la cyclohexylamine, plus nucléophile, le benzaldéhyde et un dialcylphosphite selon la méthode de

l'"hydroxyphosphonate". De nouveau, une interaction a été confirmée pour précéder l'addition du dialkylphosphite au motif C=O du composé oxo. D'après cela, une liaison H est créée entre le groupement P(O)H du phosphite et le groupe azoté de l'amine (**schéma I.8**) [37,39].

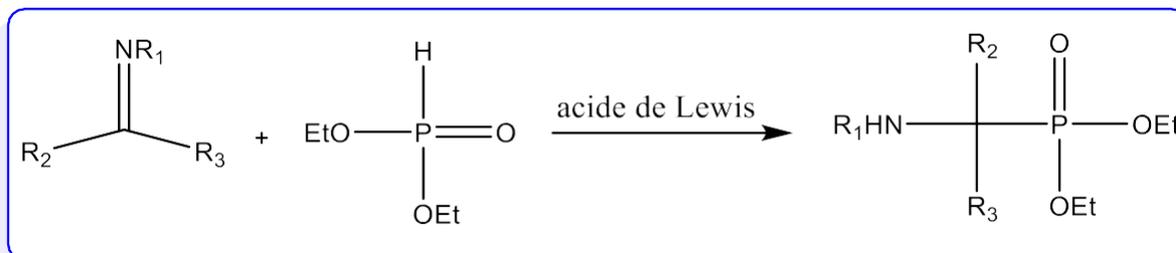


**Schéma I.8.** Le mécanisme " $\alpha$ -hydroxyphosphonate" suggéré pour la réaction de Kabachnik-Fields [37,39].

Plus loin, Zefirov et Matveeva ont démontré que le processus de condensation de la cyclohexylamine, du benzaldéhyde et du phosphite de dialcyle se déroule selon la " méthode de l'imine " et ils ont constaté qu'il n'existe pas de véritable preuve sur le plan expérimental de la voie de l'hydroxyphosphonate [40]. Il faut aussi mentionner que la réaction de la cyclohexylamine, du benzaldéhyde et de l'oxyde de dibutylphosphine, pouvant être envisagée comme une condensation étendue de Kabachnik-Fields, suit le mécanisme de l'imine [37,41]. Il est possible que le véritable mécanisme soit dépendant des éléments de la réaction, même si la voie de l'"imine" paraît plus général que celle impliquant un intermédiaire " $\alpha$ -hydroxyphosphonate" [42]. R. Gancarz et I. Gancarz ont mis en évidence que la forme réversible de l' $\alpha$ -hydroxyphosphonate peut aussi se produire, et que si elle est à nouveau organisée en le phosphate qui lui est correspondant, cette voie se transforme en une voie "sans issue" [43]. On peut affirmer que, lors de la réaction de Kabachnik-Fields, un nucléophile doux (phosphite de dialcyle) et un nucléophile fort (amine) sont en concurrence pour réagir avec le dérivé carbonyle électrophile. Plus ce dernier est doux, plus vite il réagit avec le nucléophile doux et plus lent il réagit avec le nucléophile fort [44].

### I.6.3. La réaction Pudovik

La deuxième approche est la réaction de Pudovik, où les phosphites de dialcyle sont additionnés aux composés possédant une liaison imine (N=C) (**Schéma I.9**). De nombreuses variétés de cette réaction utilisent des catalyseurs de type base ou acide de Lewis, dont les plus courants sont :  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{Me}_2\text{AlCl}$ ,  $\text{BF}_3$ ,  $\text{SnCl}_4$  et  $\text{ZrCl}_4$  [45].

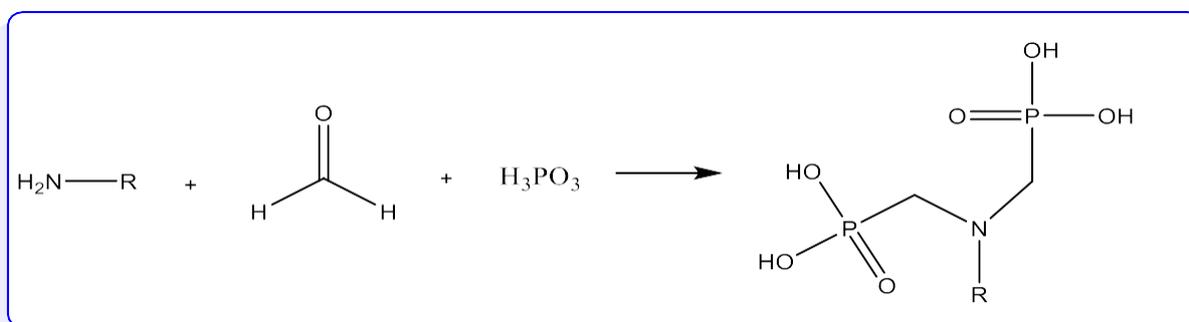


**Schéma I.9.** La réaction de Pudovik.

### I.6.4. Synthèse des Acides $\alpha$ -Aminophosphoniques

#### Réaction de Moedritzer et Irani

Ce procédé est basé sur la réaction d'une amine primaire avec du formol et de l'acide phosphoreux suivant la réaction ci-dessous (**schéma I.10**).



**Schéma I.10.** La réaction de Moedritzer-Irani [46].

La réaction de condensation de Mannich, connue aussi comme étant la réaction de Moedritzer-Irani [46], constitue une méthode fréquente de synthèse des acides aminométhylphosphoniques N, N-disubstitués ou N-substitués (monosubstitués). Cette dernière semble être la voie de synthèse la plus simple, mettant en œuvre des substrats aisément accessibles, et certainement la plus rentable afin d'obtenir des composés dérivés d'acides aminométhylphosphoniques présentant des caractéristiques de complexation. La condensation de Mannich constitue une forme particulière de la réaction de Kabachnik-Fields

[47,48]. Tout d'abord, les substrats sont l'ammoniac, les composés carbonylés (aldéhydes ou parfois cétones), les amines primaires ou secondaires et les phosphites dialkyles ou diaryles. Au cours de la réaction de Moedritzer-Irani, au lieu des phosphites, c'est l'acide phosphoreux (également appelé acide phosphonique) qui est employé, au lieu des dérivés carbonylés, seul le formol est mis en œuvre (**Schéma I.11**). La réaction est effectuée dans un environnement acide (HCl).

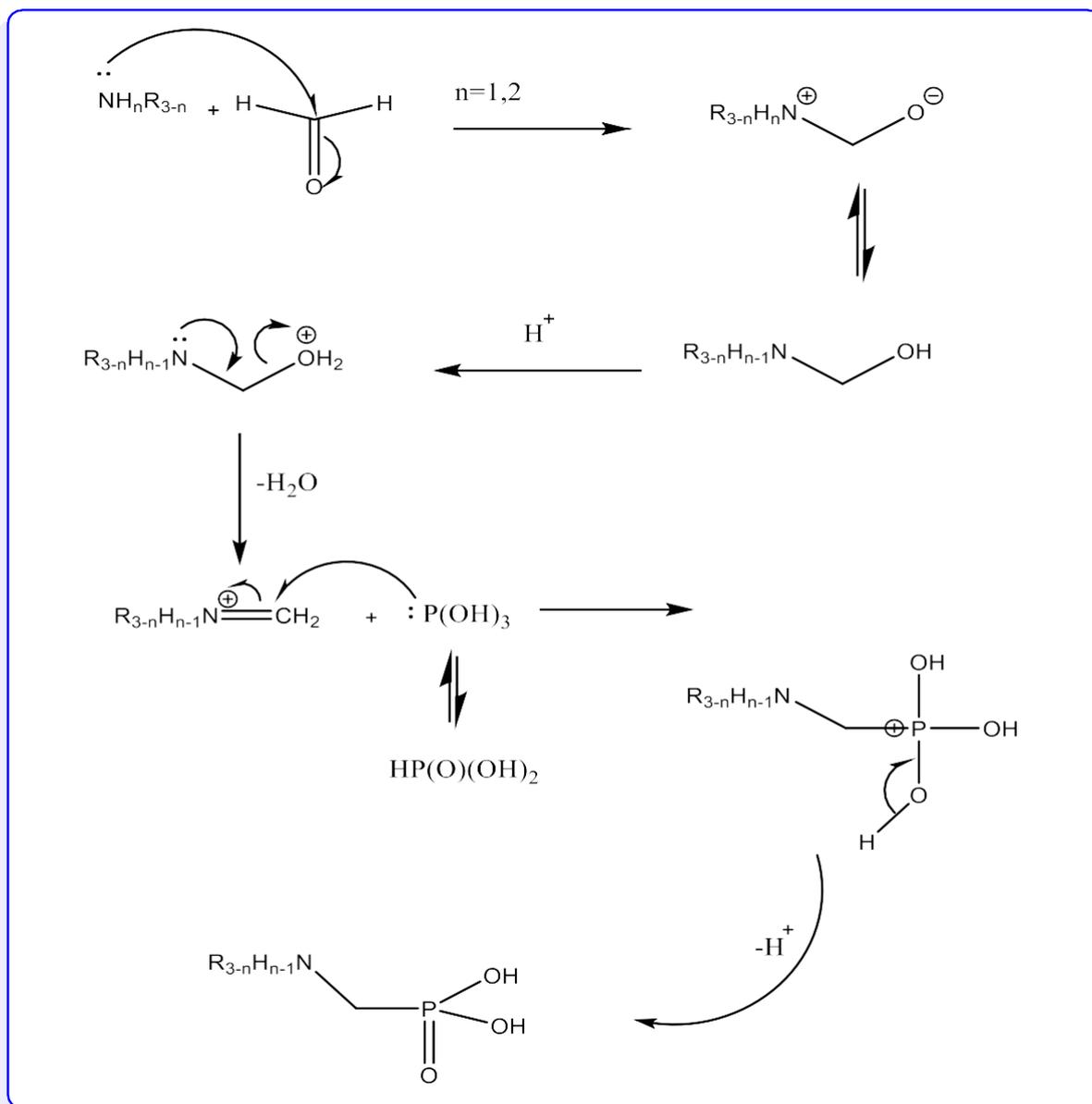


Schéma I.11. Mécanisme de Moedritzer-Irani.

Le premier stade de la réaction consiste en une attaque nucléophile par l'azote. Un réarrangement complémentaire donne la N-hydroxyméthylamine qui subit, en présence d'un acide fort, une élimination d'une molécule d'eau conduisant à un sel d'imine [49]. L'acide phosphoreux se comporte en milieu acide en tant que nucléophile et donc attaque le sel d'imine (électrophile). Le composé d'addition chargé se stabilise en perdant un proton afin de former l'acide monophosphonique. Au cours de la deuxième étape, c'est l'amine (primaire) qui attaque de façon plus rapide ( $K_2 \gg K_1$ ) pour aboutir à l'acide diphosphonique (**Figure I.7**) [50].

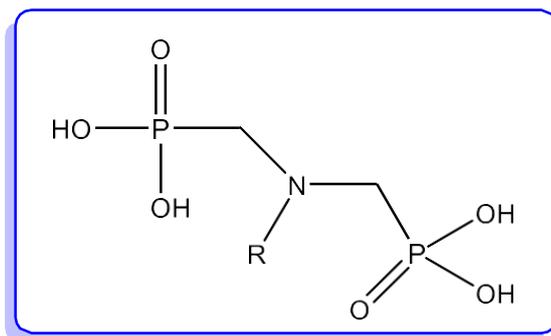


Figure I.7. Structure générale d'un acide diphosphonique.

### I.6.5. Réaction de Schwarzenbach

Ce procédé consiste à mettre en réaction une amine primaire avec de l'acide chlorométhylphosphonique en milieu alcalin suivant la réaction (**Schéma I.12**) [51].

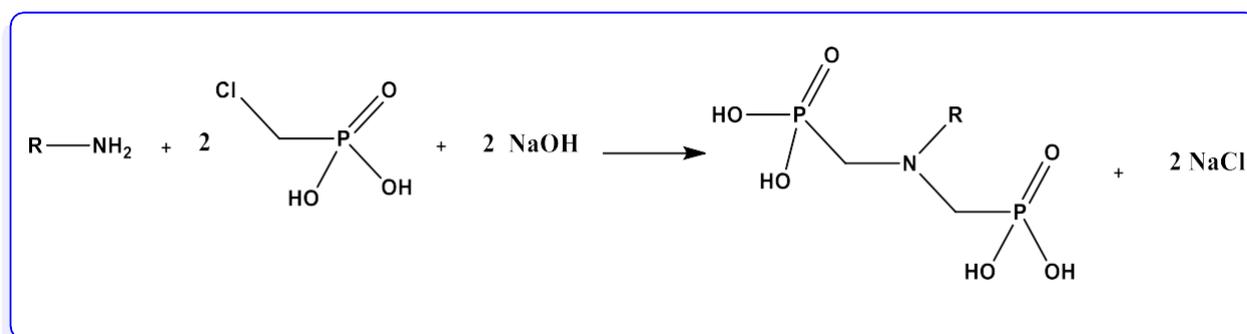
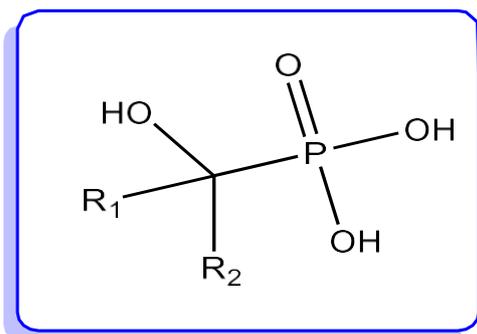


Schéma I.12. Réaction de Schwarzenbach.

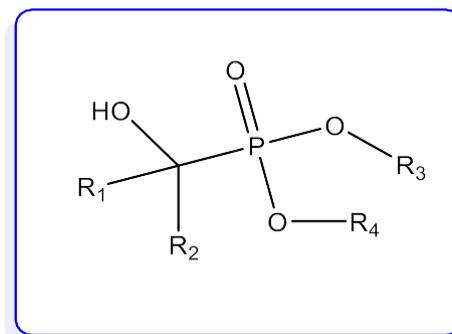
Ce processus est extrêmement lent. il exige plusieurs jours à température relativement élevée (80°C) et en milieu alcalin dont le pH est entre 10 et 11. En outre, cette voie fait intervenir des réactions secondaires qui produisent des dérivés, en quantité parfois élevée et difficilement séparables du produit désiré ; tel que le cas de l'acide hydroxyméthylphosphonique (HO-CH<sub>2</sub>P(O)(OH)<sub>2</sub>), obtenu par la réaction d'hydrolyse de l'acide chlorométhylphosphonique soumis à l'action de la réaction en milieu alcalin [52].

### I.7. Les $\alpha$ -hydroxyphosphonates

Les  $\alpha$ -hydroxyphosphonates font partie des organophosphonates dont l'atome de carbone attaché au phosphore est remplacé par le radical hydroxyle (-OH) (**Figure I.8**).



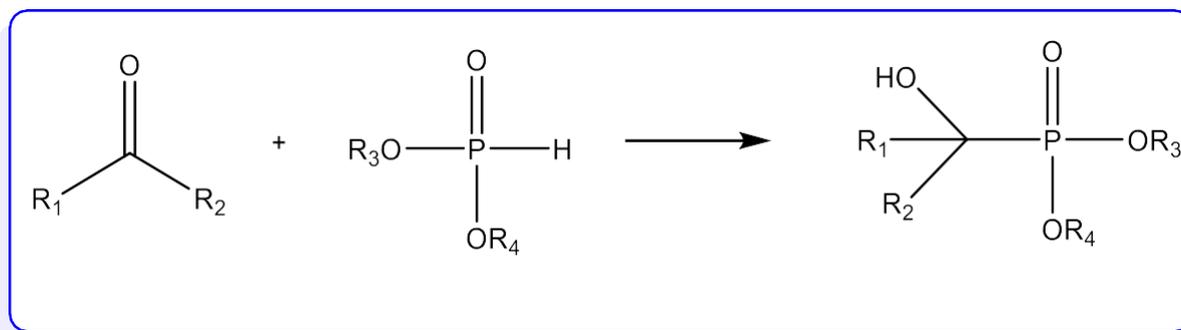
Acide  $\alpha$ -hydroxyphosphonique



Ester  $\alpha$ -hydroxyphosphonique

**Figure. I.8.** Structure générale des  $\alpha$ -hydroxyphosphonates.

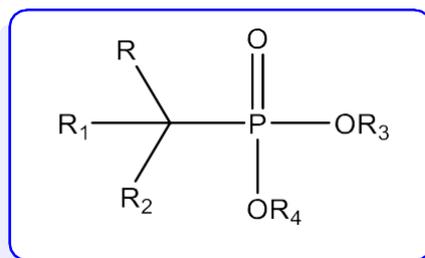
Compte tenu de la bioactivité des  $\alpha$ -hydroxyphosphonates, leur synthèse constitue un thème permanent en chimie des organophosphorés. Les principaux procédés permettant d'obtenir des  $\alpha$ -hydroxyphosphonates sont décrits dans le (Schéma I.13). La voie la plus couramment étudiée est celle qui consiste à ajouter un phosphite de dialkyle à un dérivé carbonyle [53].



**Schéma I.13.** Synthèse des  $\alpha$ -hydroxyphosphonates [53].

### I.8. Les alkyles-phosphonates et les aryles-phosphonates

Ces derniers sont des substances organophosphorées dont le radical phosphonate est associé à un radical alkyle ou aryle (**Figure I.9**) [54] :

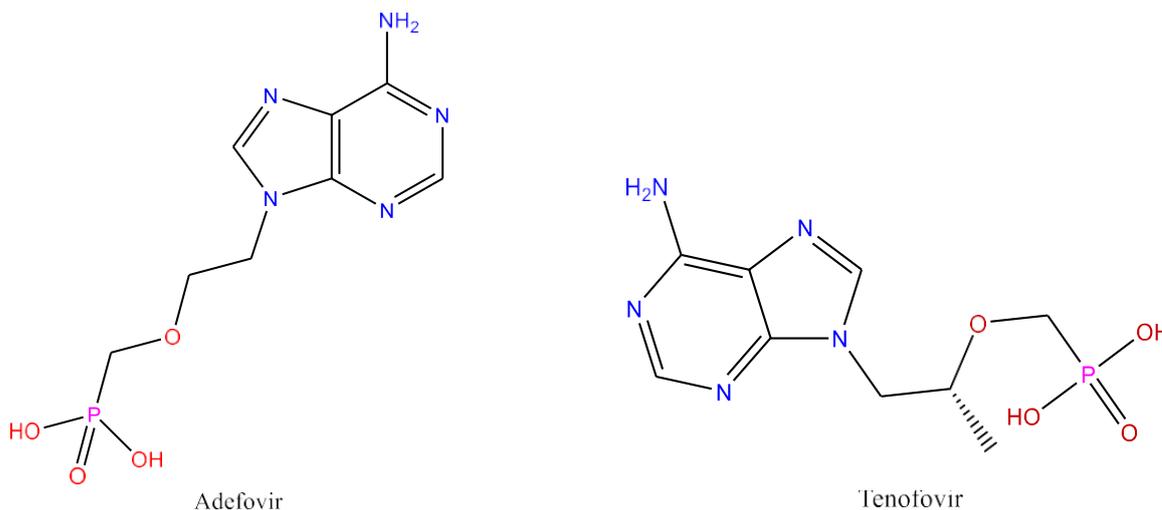


R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> et R<sub>3</sub>: un atome d'hydrogène, un groupe alkyle ou un groupe aryle.

**Figure I.9.** Structures chimiques des alkyles-phosphonates et des aryles-phosphonates [54].

### I.9. Les nucléosides phosphonates

Les nucléosides phosphonates sont des structures similaires aux acides nucléiques et nucléosides naturels (**Figure I.10**), où le motif phosphate (O–PO(OR)<sub>2</sub>) est substitué par le motif phosphonate (CH<sub>2</sub>–PO(OR)<sub>2</sub>) [55].



**Figure I.10.** Quelques exemples de nucléosides phosphonates[55].

### I.10. Champs d'applications des phosphonates

Les phosphonates et en particulier les  $\alpha$ -aminophosphonates sont considérés depuis longtemps parmi les produits les plus couramment employés dans de nombreux secteurs de la vie. Dans ce but, nous allons présenter dans la suite quelques champs d'application.

#### I.10.1. Dans la biologie et la médecine

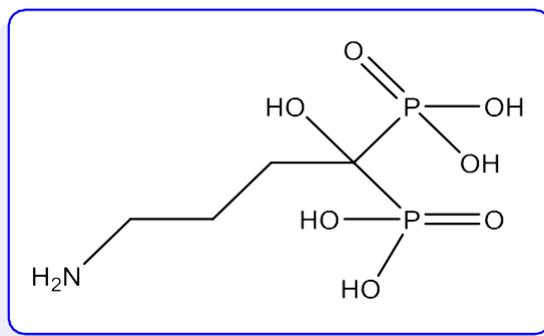
La relation structure-activité RSA permet d'orienter la sélection des molécules capables de renforcer l'index thérapeutique. La présence d'un motif phosphonate constitue un facteur important dans l'interférence biologique. Il faut signaler que des caractéristiques antibactériennes, antivirales, neuroactives et d'inhibition de la croissance des cellules ont été

constatées et mises en évidence sur différents dérivés de phosphonates [56-58].

Les phosphonates, en particulier les  $\alpha$ -aminophosphonates sont amplement exploités en biologie et sur le plan médical. De ce fait, les phosphonates regroupent un large éventail de domaines d'application allant des herbicides, insecticides et fongicides à des produits plus utiles pour l'homme, comme par exemple : les anti-VIH, les anticancéreux et les antioxydants.

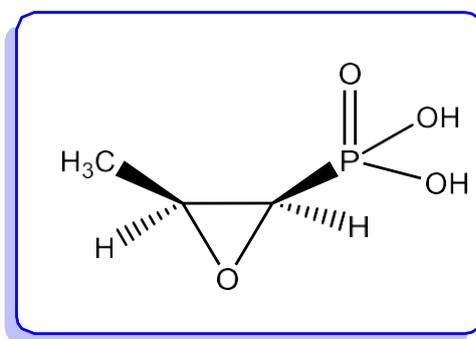
Des phosphonates comportant des atomes d'halogène en  $\alpha$  du phosphore ont d'ailleurs fait l'objet de descriptions dans la littérature et possèdent des activités biologiques importantes [59]. Les phosphonates halogénés, en particulier les fluorés, constituent de fait de bons mimés de phosphates que les phosphonates sans un halogène [60].

L'acide alendronique (**Figure I.11**) est un bisphosphonate vendu sous le nom de Fosamax®. Ce médicament est habituellement destiné au traitement de l'ostéoporose et d'autres pathologies osseuses.



**Figure I.11.** Structure de L'acide alendronique.

La fosfomycine est apparue en 1969 comme un membre appartenant à une nouvelle famille d'antibiotiques phosphoniques (**Figure I.12**). On l'a employée comme antibiotique par voie parentérale dans les cas d'infections systémiques mais plus récemment, elle existe en formulation orale réservée uniquement au traitement des cystites non compliquées.



**Figure I.12.** La structure chimique de La fosfomycine.

L'ester bis(pivaloyloxyméthyle) de la 9-(2-phosphonylméthoxyéthyl) adénine,

Bis(POM) PMEA ou Adefovir dipivoxil (**Figure I.13**), est un autre agent antirétroviral à partir de nucléosides phosphonates conçu par De Clercq et Antonín Holý. Ce médicament est mis sur le marché sous la dénomination Hepsera® et est destiné au traitement des adultes souffrant d'hépatite B chronique [61-63].

Le marché est aujourd'hui très riche en produits pharmaceutiques à base de phosphonates et leurs dérivés tels que :

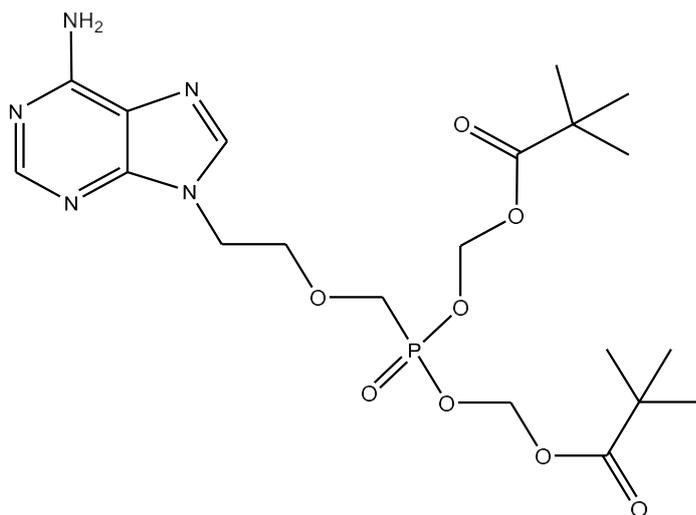


Figure I.13. Structure chimique *L'Adefovir dipivoxil*.

### I.10. 2. Application des phosphonates en industrie

Les phosphonates jouent un rôle important en tant qu'inhibiteurs de corrosion dans les systèmes de refroidissement d'eau [64]. De plus, leur capacité à complexer certains métaux font d'eux d'excellents ligands, ces complexes sont utilisés comme stabilisateurs dans les procédés d'oxydation associés aux industries de la pâte, du papier et du textile [65]. En outre, les phosphonates sont utilisés comme des ignifugeants de plastiques comprenant le polystyrène, l'acrylonitrile et le méthacrylate de methyl [66].

Le phosphonate de quinoléine (Figure I.14) est un agent inhibiteur de corrosion [67].

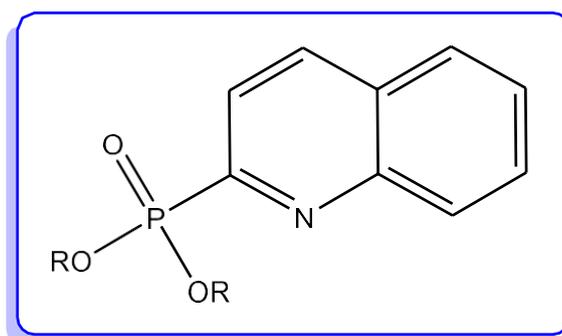
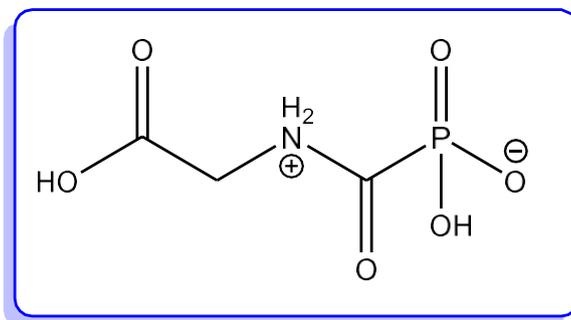


Figure I.14. La structure des quinoléines phosphonates .

Les composés pyridiniques porteurs d'un substituant phosphonique en ortho ou en para sont couramment employés en tant qu'inhibiteurs de corrosion [68]. Ils protègent efficacement les surfaces métalliques face à l'humidité, à l'eau, aux acides inorganiques et organiques, au CO<sub>2</sub> et au H<sub>2</sub>S.

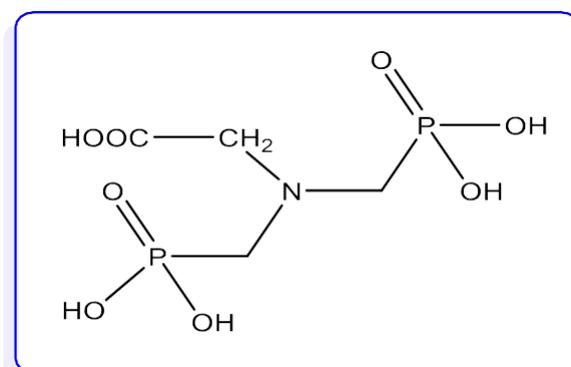
### I.10.3. Dans l'agriculture

**Herbicides** : Le premier herbicide à base de phosphonate est le glyphosate -N (phosphonométhyl) glycine, (**Figure I.15**) [69].



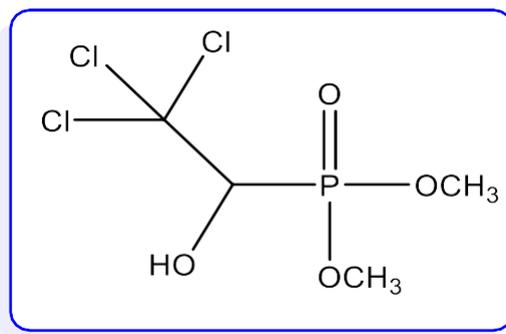
**Figure I.15.** Squelette de glyphosate (Roundup®).

**Stabilisateurs de croissance végétale** : Les stabilisateurs de croissance occupent une place considérable dans le secteur agricole. La glyphosine (N,N-bis (phosphonométhyl) glycine) est un équivalent du glyphosate (**Figure I.16**), mais est employée afin d'accélérer le processus de maturation et d'augmenter le taux de saccharose au niveau de la canne à sucre [70].



**Figure I.16.** Structure de *N, N-bis (phosphonomethyl) glycine*.

**Insecticides** : L'utilisation du 2,2,2-trichloro-1-hydroxyéthylphosphonate de diméthyle est très répandue en tant qu'insecticide (**Figure I.17**), sous la dénomination commerciale "Chlorofos".



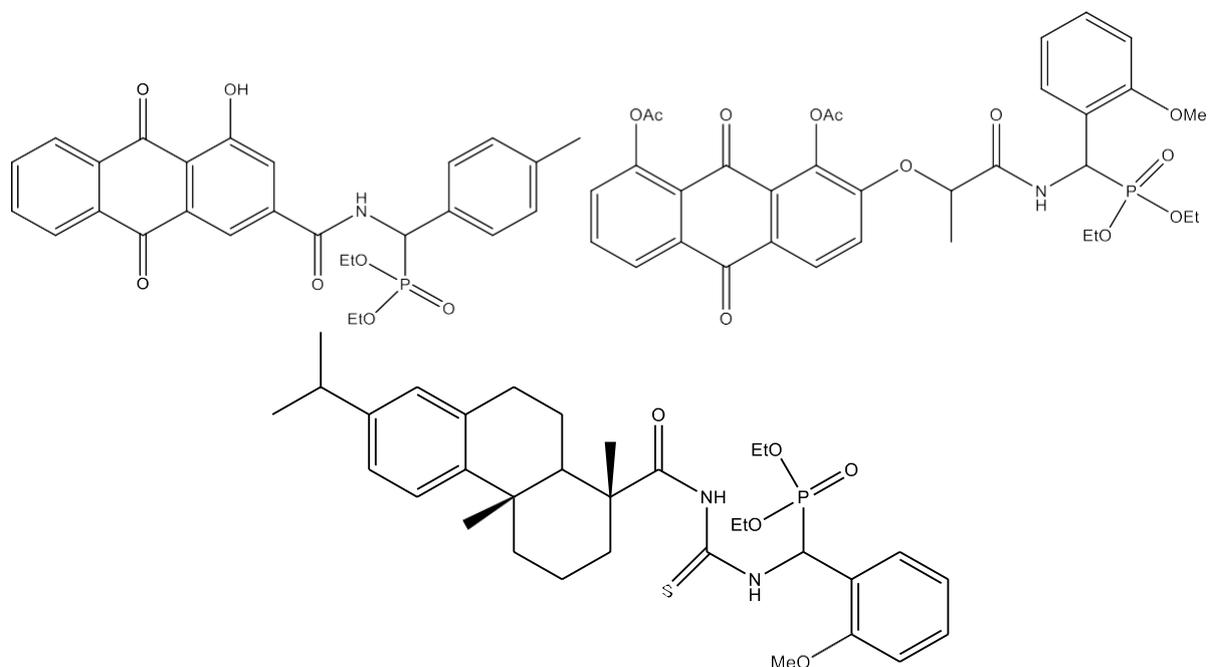
**Figure I.17.** Dimethyl-2, 2, 2-trichloro-1-hydroxyethylphosphonate.

### I .11. Caractéristiques biologiques des $\alpha$ -aminophosphonates

Ces dernières années, la synthèse des esters d' $\alpha$ -aminophosphonate et des acides  $\alpha$ -aminophosphoniques, connus pour être des acides aminés, a fait l'objet d'une attention particulière, ce qui leur confère un large spectre d'activité antibiotique [71], antibactérienne [72-74], antivirale [75] et herbicide [76].

#### I .11. 1. $\alpha$ -Aminophosphonates en tant qu'agents anti-tumoraux

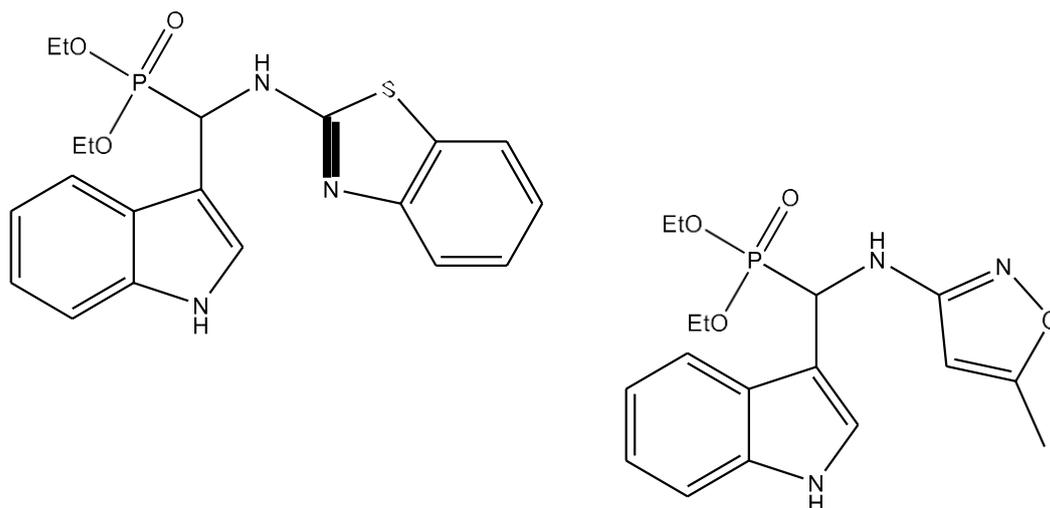
Durant ces derniers temps, de nombreux composés dérivés d' $\alpha$ -aminophosphonates ont fait preuve d'une forte efficacité sur le plan thérapeutique vis-à-vis de nombreuses pathologies tumorales cancéreuses [77-79]. Sur les nombreux exemples présentés à travers la littérature, Huang et al [80] ont élaboré la synthèse d'une série de nouveaux  $\alpha$ -aminophosphonates issus de l'acide déhydroabiétique (**Figure I.18**). Ces derniers ont été testés *in vitro* sur des cellules tumorales. Une activité plus élevée que celle du 5-fluorouracil (anticancéreux servant de référence) a été mise en évidence dans les résultats obtenus.



**Figure I.18.** Structures de quelques  $\alpha$ -aminophosphonates ayant une action anti-tumorale.

### I.11. 2. $\alpha$ -aminophosphonates en tant qu'agents antibactériens

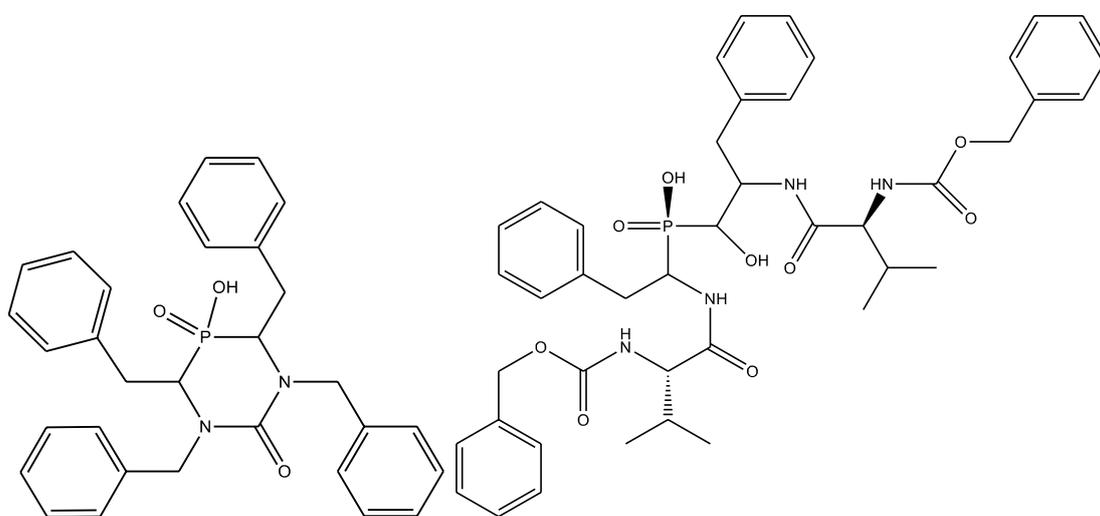
Dernièrement, d'autres nouveaux  $\alpha$ -aminophosphonates ont été préparés par Narayana Reddy et al. [81] (**Figure I.19**), leur activité antibactérienne a été analysée *in vitro* vis-à-vis de certaines bactéries Gram-positives (*Escherichia coli*) et Gram-négatives (*Staphylococcus aureus*). Une activité plus importante par rapport à la pénicilline (médicament destiné à traiter les infections bactériennes) a été notée .



**Figure I.19.** Structures d' $\alpha$ -aminophosphonates possédant une action antibactérienne.

### I .11. 3. $\alpha$ -Aminophosphonates en tant qu'inhibiteurs de la transcriptase inverse du VIH

Le VIH (virus de l'immunodéficience humaine) est un virus rétroactif qui provoque le fameux syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Les inhibiteurs de protéase constituent, une des familles thérapeutiques d'antirétroviraux, leur rôle étant de préserver l'organisme contre une activité exogène protéolytique en évitant qu'une cellule contaminée puisse générer d'autres particules virales, comme le font tous les rétrovirus. De nombreux composés dérivés d' $\alpha$ -aminophosphonate (**Figure I.20**) ont été évalués quant à leur capacité à inhiber la protéase du VIH [82-87].



**Figure I.20.** Diverses structures d' $\alpha$ -aminophosphonates ayant une activité inhibitrice des protéases.

### I .12. Conclusion

Possédant un potentiel pharmacologique intéressant, les phosphonates ont éveillé la curiosité du monde scientifique et les travaux réalisés sur leur synthèse ou leur comportement biologique ne cessent d'augmenter. Cet intérêt est dû essentiellement à la stabilité relative différente des groupements phosphate et phosphonate. De fait, le caractère facilement hydrolysable des phosphates pose une problématique cruciale dans la mise au point d'analogues de substances bioactives. La basse stabilité de cette fonction dans le métabolisme réduit considérablement la biodisponibilité de substances potentielles et donc , leur rendement. Le remplacement d'un atome d'oxygène par un atome de carbone autorise l'accès à des dérivés également actifs, bien que plus stables et plus lipophiles. Or, le spectre des activités biologiques des composés portant un groupement phosphonate est très étendu. Cela justifie notre intérêt pour ce type de composés.

## Références

- [1] L.C. Costa, Current issues in organophosphate toxicity, *Clin. Chim. Acta*, 366, 1-13, (2006).
- [2] V. Baille., P.G.Clarke, G.Brochier, F. Dorandeu, J-M.Verna, E.Four, G. Lallement, P.Carpentier, Soman-induced convulsions : the neuropathology revisited. *Toxicology*, 215, 1- 24,(2005).
- [3] S. Hideo, K. Yoshikazu et col. , *International Journal of Polymeric Materials* 54(4), p. 257, (2005).
- [4] R.Osiecka, K. M. Janas, *Physiology and Biochemistry*, 36(11), p. 805, (1998).
- [5] M. A. Didi, A. Elias, A. Azzouz et col. , des agents Extractantsorganophosphorés, Science& Technologie, Edition OPU, Algérie, (2004).
- [6] P. J. Forth, E. M. B. A. jeunieux et col. , U. S. Patent ; 736354, CAN 137 :249528, (2002).
- [7] T. Umeda, K. Hirose, H. Kisshioka, Jap. Patent; 587228, CAN 127:264157, (1997).
- [8] H. Kuwamoto, S. Iwado, Y. Koga and col. , Ger. Offen. , 425124, CAN 109:25124, (1988).
- [9] M. Kanayama, R. Kizawa, H. Tada, Jap. Patent; 907379, CAN 139:382951, (2003).
- [10] R. R. Navarro, K. Tatsumi; *separation science and technology* 37(1), p. 203, (2002).
- [11] H. Amar, J. Benzakour, D. Villeminet col., *Journal of Electroanalytical Chemistry* 558, p.131, (2003).
- [12] G. Gunasekaran, R. Natarajan et col., *Anti-Corrosion Methods and Materials* 44(4), p. 248,(1997).
- [13] M. Horiguchi, M. Kandatsu, *Nature*, 184(Suppl 12), 901–902, (1959).
- [14] H. Seto, S. Imai, T. Tsuruoka, A. Satoh, M. Kojima, S. Inouye, T. Sasaki, N. J. Otake, *Antibiot.*, 35, 1719–1721, (1982).
- [15] S. Imai, H. Seto, T. Sasaki, T. Tsuruoka, H. Ogawa, A. Satoh, S. Inouye, T. Niida, N. J.Otake, *Antibiot.*, 37, 1505–1508, (1984).
- [16] S. N. Thompson, R. W. Lee, K. J. Parasit, 71, 652–663. (1985).
- [17] H. M. Seidel, S. Freeman, H. Seto, Knowles, J. R. *Nature*, 335, 457–458, (1988).
- [18] V. E. Anderson, P. M. Weiss, Cleland, W. W. *Biochemistry*, 23, 2779– 2786, (1984).
- [19] E. Gumienna–Kontecka, J. Jezierska, M. Lecouvey, Y. Leroux, H. J. Kozłowski, *Inorg.Biochem*, 89, 13–17, (2002).
- [20] E. Gumienna–Kontecka, R. Silvagni, R. Lipinski, M. Lecouvey, F. C. Marincola, G. Crisponi, V. M. Nurchi, Y. Leroux, H. Kozłowski, *Inorg. Chim. Acta*, 339, 111–118,

(2002).

[21] B. Theodorine, B. Ramon; P. Thierry, L. Marc. T. Lett. , 44, 189–192, (2003).

[22] W. D. Ellis, R. M. Rowell, Wood Fiber Sci., 21, 367–375, (1989).

[23] Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act, Section 2(u). [http://www.epa.gov/PR\\_Notices/pr2000-6.pdf](http://www.epa.gov/PR_Notices/pr2000-6.pdf) (accessed 06/24/10), part of US EPA PR Notices.

[24] M. L. Bigsterbosch, L.J.J. W. Smeijsters, T. J. C. van Berkel, Antimicrob. Agents Chemother., 42, 1146–1150, (1998).

[25] D. Clercq, E. Clin. Microbiol. Rev. 16, 569–596, (2003).

[26] T. A. Guise, Cancer Treat. Rev. 34, (Supp 1), S19–S24, (2008).

[27] M. B. Martin, J. S. Grimley, J. C. Lewis, H. T. Heath, B. N. Bailey, H. Kendrick, V. Yardley, A. Caldera, R. Lira, J. A. Urbina, S. N. Moreno, R. Docampo, S. L. Croft, E. J. Oldfield, Med. Chem., 44, 909–916, (2001).

[28] V. Yardley, A. A. Khan, M. B. Martin, T. R. Slifer, F. G. Aruajo, S. N. Moreno, R. Docampo ,

S. L. Croft, Oldfield, E. Antimicrob. Agents Chemother., 46, 929–931, (2002).

[29] R. Engel, J. L. Cohen, *Synthesis of Carbon–Phosphorus Bonds*, 2nd ed.; CRC Press: Boca Raton, (2003).

[30] H. Von Baeyer, K. A. Hofmann, *Chem. Ber.*, 30, (1897). [31] R. Graham, R. Bone, 49, 2-19. (2011).

[32] H. Fleish; W. F. Neuman, *Am. J. Physiol.*, 1296-1300. (1961).

[33] G.R. Kieczkowski, R.B. Jobson, D.G. Mellilo, D.F. Reinhold, V.J. Grenda et al., *J. Org. Chem.*, 60, 8310-8312. (1995).

[34] G. Thomae, brevet DE 1002355, (1954).

[35] M.I. Kabachnik; T.Y. Medved, New synthesis of aminophosphonic acids. Dokl. Akad. Nauk SSSR, 83, 689–692, (1952).

[36] E.K. Fields , The synthesis of esters of substituted amino phosphonic acids. J. Am. Chem. Soc., 74, 1528–1531, (1952).

[37] 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).

[38] V.I. Galkin, E.R. Zvereva, A.A. Sobanov, I.V. Galkina, R.A. Cherkasov, Kinetics and mechanism of Kabachnik–Fields reaction in dialkylphosphite-benzaldehyde-aniline system. Zhur. Obsch. Khim, 63, 2224–2227, (1993).

[39] I.V. Galkina , A.A. Sobanov, V.I. Galkin, Cherkasov, R.A. Kinetics and mechanism of the Kabachnik–Fields reaction: IV. Salicylaldehyde in the Kabachnik–Fields reaction. Russ.

- J. Gen.Chem., 68, 1398–1401. (1998).
- [40] E.D.Matveeva; N.S. Zefirov, On the mechanism of the Kabachnik–Fields reaction: Does a mechanism of nucleophilic amination of alpha-hydroxyphosphonates exist? *Doklady Chem.*, 420, 137–140. (2008).
- [41] 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).
- [42] N.S. Zefirov; E.D. Matveeva, Catalytic Kabachnik-Fields reaction: New horizons for old reaction. *Arkivoc*, 1–17. (2008).
- [43] R. Gancarz; I. Gancarz, Failure of aminophosphonate synthesis due to facile hydroxyphosphonate-phosphate rearrangement. *Tetrahedron Lett.*, 34, 145–148. (1993).
- [44] R. Gancarz, Nucleophilic addition to carbonyl compounds. competition between hard (amine) and soft (phosphite) nucleophile. *Tetrahedron*, 51, 10627–10632, (1995).
- [45] E.V. Meenen, K. Moonen, D. Acke, and Christian V. Stevens, *Arkivoc*, 1, 31-45, (2006).
- [46] K. Moedritzer and R. R. Irani, *J. Org. Chem.*, 31, 1603. (1966).
- [47] R. A. Cherkasov and V. I. Galkin, *Russ. Chem. Rev.*, 67, 857. (1998).
- [48] N. S. Zefirov and E. D. Matveeva, *ARKIVOC*, (i), 1. (2008).
- [49] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren and P. Wothers, *Organic Chemistry*, Oxford University Press, New York, (2001).
- [50] F. Simeon, Thèse de Doctorat, Université de Caen, (1998).
- [51] K. Moedritzer et R. R. Irani, *J. Org. Chem.*, 31, 1603, (1966).
- [52] L.D.Freedman and G.O.Doak, *Chem. Rev.*, 57,479, (1957).
- [53] A.N. Pudovik, I.V. Konovalova, Addition reactions of esters of phosphorus (III) acids with unsaturated systems. *Synthesis*, 2, 81–96. (1979).
- [54] L. Verhelst et al. , Mixed alkyl aryl phosphonate esters as quenched fluorescent activity-based probes for serine proteases , *Org. Biomol. Chem.*, 13, 2293–2299, (2015).
- [55] J. Hee Hong et al. , Synthesis of nucleoside phosphonate analogs having phosphonodifluoromethylene moieties and their biological activities, *Journal of Fluorine Chemistry* 224, 1–34, (2019).
- [56] C. Rapp; G. Jung; M. Kulger and W. Loeffler, *Liebigs Ann. Chem.*, 655. (1981).
- [57] L. Maier, *Phosphorus Sulfur.*, 53, 43, (1990).
- [58] D. Petra and D.E. Martin, *J. Med. Chem.*, 2408, (2009).
- [59] G. M. Blackburn, D.E. Kent, F. Kolkman, *J. Chem. Soc.*, Perkin Trans 1, 1149, (1984).
- [60] D. O’Hagan, H.S. Rzepa, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* , 645-652 (1997).

- [61] E. De Clercq, A. Holy', I. Rosenberg, T. Sakuma, J. Balzarini, PC. Maudgal , A novelselective broad-spectrum anti-DNA virus agent. *Nature*, 323:464–7, (1986).
- [62] P. Marcellin, TT. Chang, SG. Lim, MJ. Tong, W. Sievert, ML. Shiffman, et al. Adefovirdipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *N EnglJMed*; 348:808–16, (2003).
- [63] SJ. Hadziyannis, NC. Tassopoulos, EJ. Heahtcote, TT. Chang, G. Kitis, M. Rizzetto, et al., Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N EnglJ Med*; 352:2673–81, (2005).
- [64] a) T. Bailly, R. Burgada, T. Prange, M. Lecouvey, *Tetrahedron. Lett.*, 2003, 44, 189. b) H. Fleisch, *Der. Orthopä de.*, 2007, 36, 103.
- [65] B. Nowack, *Water. Research.*, 2003, 37, 2533
- [66] 1 D. Price, L. K. Cunliffe, K. J. Bullett, T. R. Hull, G. J. Milnes, J. R. Ebdon, B. J. Hunt, P. Joseph, *Polym. Degrad. Stab.*, 2007, 92, 1101.
- [67] B. Nowack. *Water Research*, 1, 1–14, (2003).
- [65] (a) U.S. Pat. 3,786,055 (1974); C.A., 80, 96154d (1974); (b) U.S. Pat. 3,888,627 (1975); C.A., 83, 97570k (1975).
- [66] (a) U.S. Pat. 4,557,845 (1985); C.A. 104, 152169r (1986); (b) U.S. Pat. 4,529,528 (1985); C.A., 103, 126320x (1985).
- [67] M.K. Mao, J.E. Franz, *Synthesis*, 11, 920-922, (1991).
- [68] E. Karanov, D.Trendafilova, M. Georgieva, V. Aleksieva, V. Vasileva, K. Troev. *Dokl. Bulg. Akad. Nauk.*, 44, 11. (1991).
- [69] A. Lejczak, B. Kafarski, P. Sztajer, H. Mastalerz, *P. J. Med. Chem.*, 29, 2212,(1986).
- [70] R.Grembecka, J. Mucha, A. Cierpicki, T. Kafarski, *P. J. Med. Chem.*, 46, 2641. (2003).
- [71] J. D. Sprott, K. T. Hanson, *P. R. J. Org. Chem.*, 67, 8123. (2002).
- [72] W. S. Rogers, C. J. Fischer, A. J. Toney, *M. D. Biochemistry.*, 41, 12320. (2002).
- [73] J. Chen, Huang, R. *Heteroatom. Chem.*, 11, 480. (2000).
- [74] T. He, Chen, H. W. J. *Fluorine Chem.*, 127, 291. (2006).
- [75] M. Y. Yao, Ye, G. Y. Pan, Y. M. Liao, Z. X. Zhang, Y. Wang, H. S. *Eur. J. Med. Chem.*,83, 116, (2014).
- [76] J. M. Li, Qin, J. F. Ye, M. Y. Huang, R. Z. Xu, Q. Pan, Y. M. Wang, H. S. Yao, G. Y. *Indian J. Chem.*, 53, 1584. (2014).
- [77] X. C. Wang, Huang, M. Pan, Y. M. Tian, X. Y. Wang, H. S. Zhang, Y. *bioorg. med. Chem. Lett*, 23, 5283. (2013).
- [78] N. Reddy, M. V. Siva Kumar, B. Balakrishna, A. Reddy, C. S. Nayak, S. K. Reddy, C. *D.ARKIVOC.*, xv, 246. (2007).
- [79] B. Budt, Stowasser, K. H. Jian-Qi, L. Peyman, A. Ruppert, D. *Tetrahedron Lett.*, 33,

6625.(1992).

[80] US patent 5663139, Sep 2, (1997).

[81] Dreyer, G. B. AbdelMeguid, S. S. Zhao, B. Murthy, K. Winborne, E. Choi, J. W. DesJarlais, R. L. Minnich, M. D. Culp, J. S. Debouck, C. Tomaszek, T. A. Jr. Meek, T. D. Biochemistry., 32, 7972. (1993).

[82] World patent 9200954, Jan 23, (1992).

[83]US patent 5707979, Jan 13, (1998).

[84] H. J. Ctau, A.Herve, D. Virieux, Tetrahedrn, 60, 877. (2004)

*Chapitre II : Synthèse, Caractérisation, étude  
théorique et biologique*

Le présent chapitre est divisé en trois parties, dont : la première est dédiée à la synthèse et la caractérisation d'une série de composés dérivés de phosphonates par différentes méthodes physico-chimiques (2 esters  $\alpha$ -aminophosphonates et un acide  $\alpha$ -aminophosphonique). En seconde partie sont exposés les notions et principes fondamentaux des calculs théoriques par la méthode (DFT). En dernier lieu, une analyse biologique a été effectuée en vue d'évaluer le pouvoir antioxydant et l'activité enzymatique des substances synthétisées.

### II.1. Synthèses et caractérisation physicochimiques

L'objectif de cette première partie consiste en les étapes de synthèse et la caractérisation de trois produits dérivés de phosphonate, dont deux sont des esters  $\alpha$ -aminophosphonates, et le dernier est un acide  $\alpha$ -aminophosphonique. Après obtention des molécules, on procède à des analyses physico-chimiques :

- ❖ Détermination de la solubilité et du point de fusion.
- ❖ Caractérisation de l'extrait par l'UV-visible, la spectroscopie infrarouge et la spectroscopie RMN (résonance magnétique nucléaire).

#### II.1.1. Produits chimiques/Matériels

<i>Équipements</i>	<i>Réactifs</i>	<i>Solvants</i>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Chauffe-ballon</li><li>• Réfrigérant serpentant.</li><li>• Ballon de 25 ml</li><li>• Bécher de 25 ml</li><li>• Erlenmeyer de 25 ml</li><li>• Micro-ondes (M.W)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• m-toluidine</li><li>• Acide phosphoreux</li><li>• Triethyl phosphite (TEP)</li><li>• Benzaldéhyde</li><li>Formaldéhyde</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• L'eau distillée,</li><li>• l'acétate d'éthyle (AcOEt),</li><li>• dichlorométhane (DCM),</li><li>éther di-éthylique,</li><li>• l'éthanol (EtOH),</li><li>• n-hexane,</li><li>• méthanol (MeOH).</li></ul>

#### II.1.2. Synthèse de l'acide $\alpha$ -aminophosphonique MTA (à partir de la m-Toluidine)

La condensation entre un aldéhyde, une amine primaire et un acide phosphoreux aboutit à la formation d'acides aminophosphoniques. Des travaux réalisés par différents chercheurs ont notamment montré l'intérêt de la réaction connue sous le nom d'Irani- Moedritzer. Cette partie a pour but de réaliser la synthèse d'un acide  $\alpha$ -aminophosphonique à

partir de la m-toluidine, du formaldéhyde et de l'acide phosphoreux selon deux méthodes :

### *II.1.2.1. Synthèse classique à reflux (conventionnelle)*

Dans un ballon bicol, introduire 0,01 mole de m-Toluidine, solubilisée dans 10 ml de méthanol, 0,02 mole de  $H_3PO_3$  et 0,02 mole de formaldéhyde, le mélange est mis dans le chauffe ballon avec agitation à une température de  $65C^\circ$  durant quatre heures. L'achèvement de la réaction a été suivi par analyse par CCM. Ensuite, on a éliminé le solvant dans un rotaevaporator. 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.1.2.2. Synthèse sous micro-ondes*

Les fours à micro-ondes domestiques sont apparus dans les années 1975 au sein des laboratoires, servant tout d'abord à sécher la verrerie ou à effectuer des opérations de minéralisation. Seulement à partir du milieu des années 1980, le micro-ondes a prouvé être un bon équipement permettant la réalisation des synthèses organiques, remplaçant le traditionnel "reflux". Un chauffage au sein de la matière garantissant un considérable gain de temps (les synthèses sont réalisées au bout de quelques minutes avec une grande sélectivité et un rendement satisfaisant.

Cependant, la technique d'activation par micro-ondes au four domestique est confrontée à deux grands problèmes, celui du réchauffement excessif des solvants organiques ainsi que celui de la non reproductibilité des résultats. Dans un four micro-ondes ménager, un magnétron émetteur d'hyperfréquences, des ondes électro-magnétiques de fréquence 2,45 GHz canalisées par un guide d'ondes pour aboutir en haut du plateau rotatif. La dispersion de ces ondes (on parle de four à micro-ondes multimode) se fait ensuite par de nombreuses réflexions sur les parois et provoque dans le four un chauffage hétérogène : régions froides et régions chaudes). Or, c'est précisément ce phénomène d'hétérogénéité des zones qui est considéré comme étant responsable de la non-reproductibilité des résultats. Les fabricants ont

donc développé des fours monomodes où le champ d'ondes stationnaires est concentré grâce à l'utilisation d'un guide d'ondes où les micro-ondes sont canalisées et focalisées sur l'échantillon. La longueur d'onde des MO est comprise entre 0,1 et 100 cm<sup>-1</sup> et leur fréquence entre 300 MHz et 300 GHz. Sur le spectre électromagnétique, les MO sont situées entre les ondes radios et les ondes infrarouges (IR) , elles sont exploitées en télécommunications, localisation et détection. Les MO employés dans les appareils industriels, ainsi que dans le domaine de la recherche médicale se situent en général entre 915 MHz (33 cm<sup>-1</sup>) et 2,45 GHz (12,2 cm<sup>-1</sup>) [1].

Dans un erlenmeyer de 25 ml, on introduit 0,01 mole d'amine (m-toluidine) dans 5 ml de méthanol et 0,02 mole (V=1,98 ml) d'acide phosphoreux (H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub>). La solution est activée dans un micro-ondes durant 1 minute, puis on ajoute 0,04 mole de formaldéhyde par gouttes en utilisant une pipette. De nouveau, la solution est mise dans le four à micro-ondes pendant 3 minutes en attendant que le volume du solvant diminue et que se forme un nouveau produit.

La synthèse par irradiation aux micro-ondes a été réalisée dans un four à micro-ondes SAMSUNG (fonctionnant entre 100 et 700 W).

Le schéma II.1 illustre la séquence réactionnelle de la synthèse effectuée.

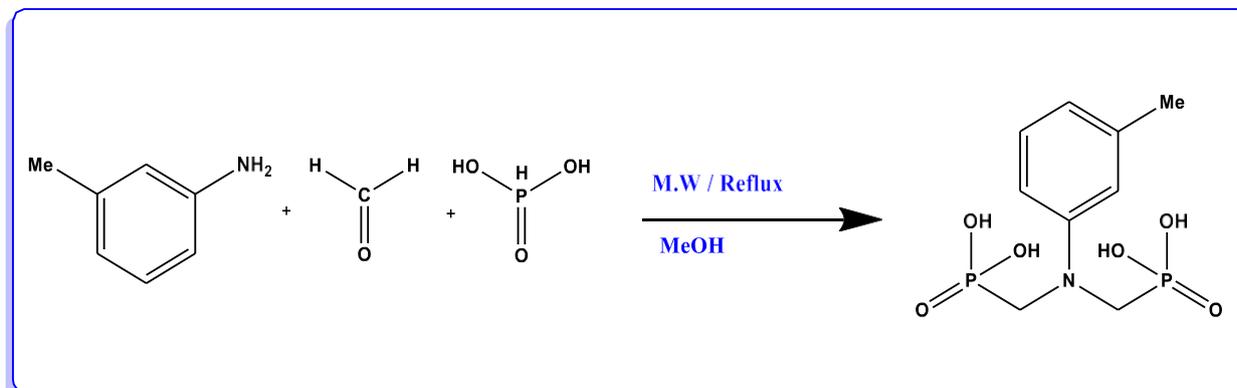


Schéma II.1. Synthèse de l'acide α-aminophosphonique ( MTA).

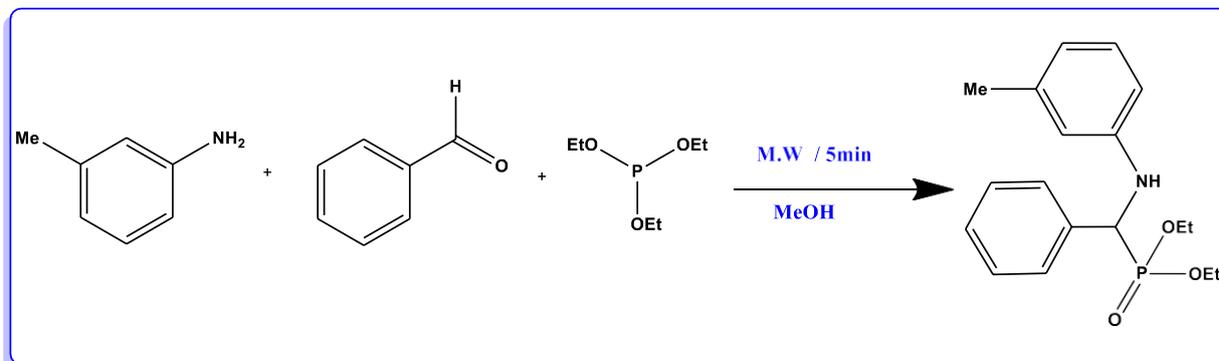
### II.1.3. Synthèse de l'ester α-aminophosphonate MTE ( à partir de la m-Toluidine)

#### II.1.3.1. Synthèse classique a reflux

Le procédé appliqué est celui de Kabachnik-Fields. Dans un erlenmeyer de 25 ml, on introduit 10<sup>-3</sup> mole d'une solution méthanolique de m-Toluidine et 10<sup>-3</sup> mole de triéthylphosphite. Après une heure d'agitation, on rajoute au mélange 10<sup>-3</sup> mole de benzaldéhyde. On soumet ce dernier à un chauffage à reflux de 4 heures. La progression de la réaction a été suivie par CCM.

### II.1.3.2. Synthèse sous micro-ondes

Le même procédé que celui utilisé pour l'acide aminophosphonique a été appliqué. La réaction de synthèse est illustrée dans le **Schéma II.2**:



**Schéma II.2.** Synthèse de l'ester  $\alpha$ -aminophosphonate (MTE).

### II.1.4. Synthèse de l' ester $\alpha$ -aminophosphonate 5MC (à partir de 2-amino-5-méthylphénol)

#### II.1.4.1. Synthèse classique a reflux

Le procédé appliqué est celui de Kabachnik-Fields (meme procédé que celui utilisé pour MTE ). Dans un erlenmeyer de 25 ml, on introduit  $10^{-3}$  mole d'une solution méthanolique de 2-amino-5-méthylphénol et  $10^{-3}$  mole de triéthylphosphite. Après une heure d'agitation, on rajoute au mélange  $10^{-3}$  mole de benzaldéhyde. On soumet ce dernier à un chauffage à reflux de 4 heures. La progression de la réaction a été suivie par CCM.

#### II.1.4.2. Synthèse sous micro-ondes

Faire dissoudre  $m=0.123$ g de 2-amino-5-méthylphénol dans 5ml d'éthanol, ajout de  $V=0.176$ ml de la triéthylphosphite. Mettre le mélange dans le Micro-onde pour 2 minutes.

- Ajout de  $V=0.103$  ml de Benzaldehyde (goutte à goutte avec agitation).
- Mettre le mélange final dans le Micro-onde de 8 à 10 min.

La réaction de synthèse est illustrée dans le **Schéma II.3** :

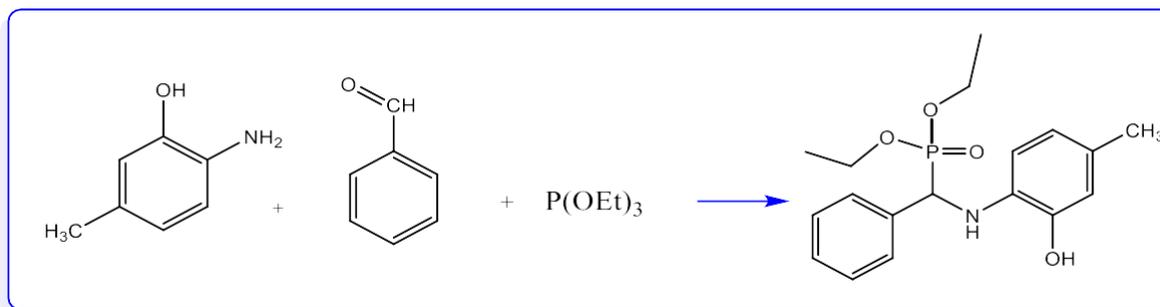


Schéma II.3. Synthèse de l'ester  $\alpha$ -aminophosphonate (5MC).

### II.1.5. Caractérisation des molécules synthétisées

Les dérivés synthétisés ont fait l'objet des analyses physico-chimiques : point de fusion, IR, UV-Vis, etc., permettant leur identification.

#### II.1.5.1. Point de fusion

Le point de fusion désigne la température pour laquelle une matière passe de l'état solide à l'état liquide sous pression atmosphérique. Les températures de fusion Tfs ont été mesurées sur un appareillage à plaque chauffante à gradient de température de 50 à 260°C, dit banc de Köfler. La substance est directement posée sur l'appareil sans nécessité d'accessoire, lors du chauffage à partir d'un point précis sur la lame une modification de texture apparaît sur l'échantillon, le système de curseur nous permet une lecture directe du point de fusion de la substance.

#### II.1.5.2. Solubilité

Cette caractéristique qualitative est destinée à décrire le comportement d'une espèce chimique vis-à-vis d'un solvant. Elle traduit la capacité d'un soluté à se dissoudre dans le solvant, pour former une solution homogène. On peut donc caractériser un produit de manière quantitative par la mesure de sa solubilité vis-à-vis des solvants. La détermination qualitative de la solubilité est intéressante dans notre cas. Pour cela, on prépare une série de tubes à essai, chaque tube contient une quantité de la molécule et un solvant. On effectue ce test dans l'eau, l'éthanol, l'acétone, l'acétate d'éthyle, l'hexane et le DMSO. Les essais sont effectués en même temps et sous les mêmes conditions.

#### II.1.5.3. Analyse par chromatographie sur couche mince CCM

La chromatographie sur couche mince est une technique de chromatographie à visée analytique permettant l'identification des constituants d'un mélange. La phase stationnaire est une couche polaire mince de silice ou d'alumine appliquée sur une plaque. La phase mobile

liquide, ou éluant, est un solvant ou un ensemble de solvants. Dans un système donné, le comportement d'une molécule donnée s'exprime par son front ratio  $R_f$  qui représente le rapport entre la distance traversée par cette molécule et celle traversée par la phase mobile (front du solvant) et qui est donc comprise entre 0 et 1 [1].

### II.1.5.4. Spectroscopie UV-visible (UV-vis)

L'absorption du rayonnement UV par une molécule provoque des transitions électroniques, passant d'une orbitale de faible énergie à une orbitale d'énergie plus élevée.

Les transitions possibles dans nos molécules peuvent être :

➤ **Transition  $\sigma\text{-}\sigma^*$**

Elle apparaît dans le lointain UV. Elle correspond au passage d'un électron d'une orbitale moléculaire (OM) liante  $\sigma$  à un OM antiliante  $\sigma^*$ . Ces transitions sont généralement  $<180\text{nm}$  et n'apparaissent pas dans les spectres obtenus.

➤ **Transition  $n\text{-}\sigma^*$**

Le saut d'un électron d'un doublet  $n$  des atomes (O, N) dans une OM  $\sigma^*$  conduit à une transition d'intensité moyenne qui se situe vers 180 nm pour les OH alcooliques (R-OH), vers 190 nm pour les OH phosphoniques (P-OH) et vers 220 nm pour les amines (NH). Ces transitions nécessitent des énergies plus faibles que les transitions  $\sigma\text{-}\sigma^*$ .

➤ **Transition  $n\text{-}\pi^*$**

Cette transition peu intense résulte du passage d'un électron d'une OM non liante de type ( $n$ ) à une OM anti liante ( $\pi^*$ ). On la rencontre pour les molécules comportant un hétéroatome porteur de doublets électroniques libres et appartenant à un système insaturé (P=O, dans notre cas).

### II.1.5.5. Spectroscopie infrarouge IR

La spectroscopie IR fait partie des techniques analytiques visant à identifier et à caractériser la nature des liaisons chimiques d'un échantillon et les différents groupements de molécules en vue d'obtenir des informations sur la conformation et les interactions qui peuvent exister [3]. Cette méthode basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau examiné et la détection des vibrations caractérisant les liaisons chimiques, nous permet de procéder à une analyse des fonctions chimiques existant dans le matériau. Le spectrophotomètre est capable d'observer le rayonnement infrarouge dans le domaine  $400\text{-}4000\text{cm}^{-1}$  [4].

Les spectres FTIR ont été enregistrés sur le spectromètre Shimadzu FTIR 8400S dans la gamme de longueur d'onde (4000–600)  $\text{cm}^{-1}$  avec une résolution de 4  $\text{cm}^{-1}$  et 120 balayages par spectre. La chambre de mesure est traversée par un flux d'azote qui limite les conséquences de l'absorption des éléments atmosphériques [5].

### *II.1.5.6. Spectroscopie RMN (résonance magnétique nucléaire)*

Les spectres de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz ;  $\text{CDCl}_3$ ) ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Ultra Shield Plus-400 MHz, en utilisant le TMS comme étalon interne, le solvant été le DMSO. Les déplacements chimiques sont indiqués en parties par million (ppm), les déplacements chimiques de la RMN  $^{31}\text{P}$  ont été référencés par rapport à du  $\text{H}_3\text{PO}_4$  externe (85% p/p). Les multiplicités sont indiquées par les abréviations suivantes : s (singulet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet).

### II.2. Etude théorique par la méthode de DFT

Une étude théorique concernant les molécules synthétisées a été effectuée dont le but est de calculer les caractéristiques structurales et électroniques par la méthode de DFT avec la base standard B3LYP 6-31G (d, p) et la fonctionnelle B3LYP qui est la variante la plus aboutie des méthodes DFT [6] en utilisant le logiciel Gaussian 09.

Le but de cette étude est la détermination des propriétés structurales et électroniques suivantes:

- ❖ Propriétés géométriques (longueurs des liaisons, angles).
- ❖ Orbitales limites moléculaires (HOMO-LUMO).
- ❖ Indices de réactivité.

#### II.2.1. La Théorie de la fonctionnelle de densité DFT

De nos jours, les travaux de recherche et de synthèse des nouveaux composés chimiques sont fréquemment accompagnés d'une étude de modélisation moléculaire. La théorie de la fonction de la densité (DFT) est une des méthodes les plus répandues ces dernières années afin de calculer et de prédire la structure électronique et les caractéristiques physico-chimiques des éléments (atomes, molécules et même solides) [7,8].

Depuis une trentaine d'années, la Théorie de la Fonctionnelle de Densité qui complète les techniques HF et Post HF, a prouvé son efficacité. Elle offre de nombreux avantages qui favorisent son utilisation dans divers domaines, spécialement en chimie et en science des matériaux.

Il faut savoir que dans le cas de la méthode Hartree-Fock (HF), il s'agissait d'exprimer l'énergie du système comme étant une fonction de la fonction d'onde, tandis que dans le cas de la DFT, cette énergie sera une fonctionnelle de la densité électronique  $\rho$  d'un système. Avant de passer aux bases de la DFT, il est nécessaire de préciser ce qu'est le logiciel Gaussian09.

#### II.2.2. Logiciel de calcul : GAUSSIAN09

GAUSSIAN est un programme de chimie numérique, initialement créé par John Pople et publié en 1970 (Gaussian 70). Depuis, il est constamment mis à jour. Son nom provient de son utilisation des orbitales gaussiennes permettant d'accélérer les calculs comparé aux logiciels employant les orbitales de Slater, Ce qui a permis de développer la chimie

numérique, notamment les procédés initiaux comme la méthode Hartree-Fock. À l'origine, Gaussian a été concédé sous licence à l'université Carnegie-Mellon, puis à la société Gaussian, Inc.

Il est capable de prévoir les caractéristiques des éléments et des réactions, y compris : les énergies et les compositions des molécules, celles des états de transition, leurs fréquences vibratoires, leurs spectres IR, leurs caractéristiques thermodynamiques, leurs énergies de liaison et de réaction, leurs chemins de réaction, les orbitales moléculaires et les charges des atomes. GaussView est un outil graphique destiné à être employé avec Gaussian pour simplifier, accélérer et rendre plus efficaces les calculs.

### II.2.3. Les orbitales frontières

Les orbitales frontières occupées hautes (HOMO) et vacantes basses (LUMO) ont une importance fondamentale dans l'interprétation de la réactivité chimique. En effet, les valeurs et les signes des coefficients OF constituent un indice majeur permettant de privilégier le mode d'attaque. Ainsi, le réactif électrophile sera attaqué de manière préférentielle au niveau du site dont le coefficient de l'OF est le plus élevé. A l'inverse, l'attaque nucléophile aura lieu préférentiellement sur les sites moléculaires ayant les valeurs les plus importantes de la densité LUMO. L'écart entre l'orbitale HOMO et LUMO est nommé écart énergétique  $\Delta E$  et constitue un paramètre essentiel qui détermine la réactivité et la stabilité d'une structure [12,13].

La différence des énergies HOMO et LUMO permet de mesurer le caractère excitable des molécules, plus cette énergie est faible, plus l'excitation est facile et vice versa.

### II.2.4. Notions chimiques et indices de réactivité issus de la DFT

Le point de départ de la modélisation théorique de la réactivité a été le développement de la théorie de Huckel [14] en 1931. Aujourd'hui, les chimistes font appel à deux grandes théories : celle des orbitales frontières lancée par Fukui en 1952 et couronnée par le prix Nobel de chimie en 1981 ainsi que la théorie de la fonctionnelle de la densité. Ces deux modèles sont à l'origine de la définition de divers indices de réactivité [15].

La théorie fondamentale de la DFT, précédemment présentée, constitue une deuxième branche élaborée depuis les années 1980, qui vise à donner un cadre théorique précis à des concepts souvent mal définis caractérisant la réactivité chimique [16]. La DFT (density

## *Chapitre 2 : Synthèse, Caractérisation ,étude théorique et biologique*

---

functional theory) constitue une véritable source de notions chimiques à l'heure actuelle. De nombreux paramètres servent de descripteurs de la réactivité lors des réactions chimiques. Le potentiel chimique ( $\mu$ ), l'affinité électronique (A), le potentiel d'ionisation (I) et la dureté ( $\eta$ ) représentent les descripteurs globaux qui permettent de déterminer d'autres indices globaux tels que l'électronégativité ( $\chi$ ) [17].

## II.3. Evaluation des activités biologiques

### II.3.1. Activité antioxydante

C'est selon six méthodes que l'étude de l'activité antioxydante est testée pour les différents extraits : le piégeage des radicaux libres DPPH, le piégeage ABTS, l'activité de réduction du complexe cuivre-néocuproïne CUPRAC, l'activité du pouvoir réducteur (FRAP), l'activité de réduction par la formation du complexe Fe<sup>+2</sup>-phénantroline et le blanchiment du β-carotène.

#### II.3.1.1. Activité de piégeage des radicaux libres DPPH

L'activité du piégeage des radicaux libres DPPH a été évaluée suivant le protocole prescrit par Blois [24], dont le principe consiste à réduire le piégeage des radicaux libres DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), coloré en violet, en 2,2 diphényl-1-picrylhydrazine, de couleur jaune. L'absorption du DPPH se situe à 517 nm, mais lors de sa réduction grâce à un antioxydant, elle diminue. En résumé, on a préparé dans du méthanol une solution 0,4 mM de DPPH puis on a ajouté 160 µl de celle-ci à 40 µl d'échantillon dissous dans du méthanol à des concentrations différentes. Au bout de trente minutes, on a mesuré l'absorbance à 517 nm. Du BHT et de l'α-tocophérol ont servi de standards antioxydants, pour la comparaison de leur activité avec celle des extraits utilisés. Une valeur d'absorbance faible du mélange réactionnel indique une meilleure activité de piégeage des radicaux libres. Le pouvoir de piégeage des radicaux DPPH est calculé d'après la formule suivante :

$$\text{Inhibition \%} = (A_{\text{Blanc}} - A_{\text{Extrait}} / A_{\text{Blanc}}) \times 100 \quad (1)$$

$A_{\text{Blanc}}$  représente l'absorbance du mélange réactionnel contenant uniquement les réactifs.

$A_{\text{Extrait}}$  correspond à l'absorbance du mélange réactionnel contenant les réactifs et l'extrait.

#### II.3.1.2. Essai du pouvoir antioxydant par réduction du cuivre (CUPRAC)

On a déterminé la réduction du cuivre en appliquant la méthode CUPRAC définie par Apak et al [25]. On a préparé une solution en mélangeant les volumes de : 50 µl de Cu (II) (10 mM), 50 µl de néocuprine (7,5 mM), et 60 µl de tampon NH<sub>4</sub>Ac (1 M, pH = 7,0). On a ajouté des concentrations d'extrait différentes au premier mélange pour que le volume final soit de 200 µl. Les microplaques à 96 puits ont été isolées de la lumière, et au bout d'une heure, la valeur d'absorption à 450 nm a été déterminée. On a comparé le pouvoir réducteur des extraits

avec celui de l' $\alpha$ -tocophérol et du BHT. Le calcul des résultats a été effectué comme A0,5 ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) qui correspond à la concentration donnant une absorbance de 0,50.

### II.3.1.3. Activité du piégeage de l'ABTS

La détermination spectrophotométrique de la capacité de piégeage de l'ABTS<sup>•+</sup> a été effectuée suivant la méthode de Re et al [26], légèrement modifiée. L'ABTS<sup>•+</sup> a été produite par réaction entre 7 mM d'ABTS en milieu aqueux et 2,45 mM de persulfate de potassium conservé à l'obscurité et à température ambiante durant 12 h. La réaction d'oxydation de l'ABTS débute directement mais l'absorption n'est pas à son maximum et elle s'est stabilisée au bout de 6 h. Sous cette forme, la stabilité du radical cationique est supérieure à 2 jours en conservation dans des conditions d'obscurité à température ambiante. Avant usage, on dilue l'ABTS à un taux d'absorption de  $0,708 \pm 0,025$  à 734 nm dans de l'éthanol. Puis, 160 $\mu\text{l}$  de la solution contenant L'ABTS<sup>•+</sup> ont été additionnés à 40 $\mu\text{l}$  de la solution de l'extrait dilué dans l'éthanol à diverses concentrations. 10 minutes plus tard, la valeur d'absorption a été évaluée à 734 nm en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puits. On a calculé les pourcentages d'inhibition correspondant à chacune des concentrations vis-à-vis de l'absorbance du blanc d'éthanol. Le pouvoir de piégeage de L'ABTS<sup>•+</sup> a été déterminé à l'aide de la formule ci-dessous :

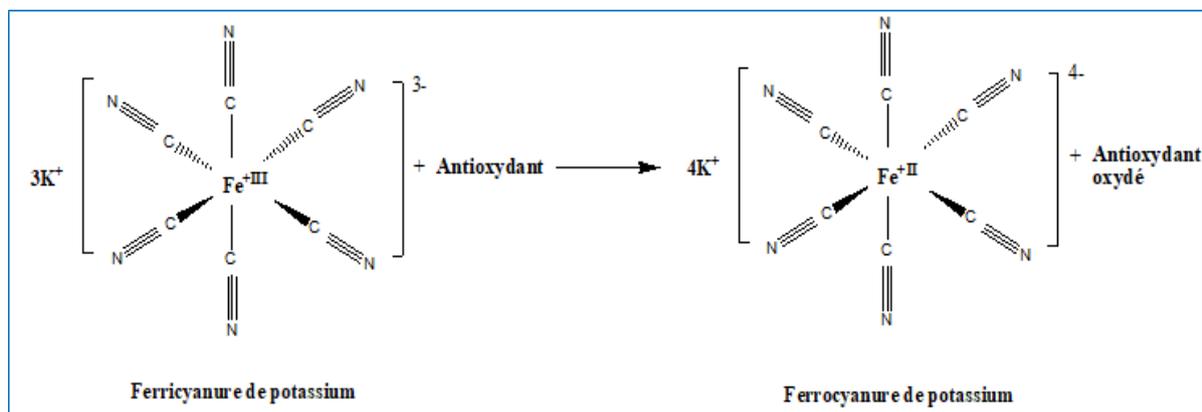
$$\text{ABTS Inhibition \%} = (A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{Extrait}} / A_{\text{Contrôle}}) \times 100 \quad (2)$$

### II.3.1.4. Activité de blanchissement du $\beta$ -carotène

La capacité de blanchiment du  $\beta$ -carotène des extraits synthétisés a été testée à l'aide du modèle de l'acide  $\beta$ -carotène-linoléique [27]. On a dissous une quantité de 0,5 mg de  $\beta$ -carotène dans un volume de 1 ml de chloroforme, avant de l'ajouter à un volume de 25 $\mu\text{l}$  d'acide linoléique et 200 mg de Tween 40, donnant ainsi un mélange émulsifiant. Le chloroforme étant évaporé sous-vide, on a ajouté 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène en agitant vigoureusement. La valeur d'absorbance de cette solution de  $\beta$ -carotène doit être située entre 0,8 et 0,9 nm. On a ajouté un volume de 160 $\mu\text{l}$  de cette solution préparée, à un volume de 40 $\mu\text{l}$  d'extrait pour les différentes concentrations. Les valeurs d'absorption ont été mesurées sur un lecteur de microplaques à 470 nm. Les standards utilisés sont le BHA et l' $\alpha$ -tocophérol.

### II.3.1.5. Activité du pouvoir réducteur (FRAP)

Le FRAP ( Ferric Reducing Antioxidant Power ) est un test colorimétrique à transfert d'électrons qui se base sur la capacité des extraits analysés à réduire le fer ferrique ( $\text{Fe}^{+3}$ ) contenu dans le ferricyanure de potassium (  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{+2}$  ) et sur la formation de ferrocyanure de potassium ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ) (**Figure. II.1**).



**Figure II.1.** Mécanisme réactionnel du test FRAP(Gülçin, 2012)

Ce phénomène entraîne le passage de la couleur jaune du ferricyanure de potassium à une couleur bleu/verte dont l'intensité est liée au pouvoir réducteur de l'antioxydant. Toute augmentation de l'absorbance correspond au pouvoir réducteur des produits testés. La détermination du pouvoir réducteur des différents extraits est effectuée par la méthode Oyaizu légèrement modifiée. On ajoute un volume de 10  $\mu\text{l}$  de l'extrait à différentes concentrations à 40  $\mu\text{l}$  de solution tampon phosphate (pH 6,6) et 50  $\mu\text{l}$  de solution de ferricyanure de potassium(1%) . L'ensemble est incubé dans une étuve à 50°C pour une durée de 20 min. Par la suite, on ajoute 50  $\mu\text{l}$  d'acide tri-chloroacétique (10%) pour stopper la réaction. Finalement, on ajoute un volume de 40  $\mu\text{l}$  d'eau distillée et 10  $\mu\text{l}$  de solution de chlorure feranhydrique (0,1%). La lecture de l'absorbance de la solution réactionnelle se fait à 700 nm par rapport à un blanc similaire, dans lequel l'extrait est remplacé par le méthanol. Le contrôle positif est constitué de deux solutions d'antioxydants standards : l'acide ascorbique et l' $\alpha$ -tocophérol dont on mesure l'absorbance dans les mêmes conditions que les échantillons. Le calcul des résultats a été réalisé sous la forme  $A_{0,50}(\mu\text{g/ml})$  représentant la concentration qui indique une absorbance de 0,50.

### *II.3.1.6. Activité de réduction par la formation du complexe $Fe^{+2}$ - phénantroline*

Le complexe Fe(II)-phénantroline est couramment appliqué dans la méthode spectrophotométrique traditionnelle pour la détermination du fer. La formation du complexe rouge-orange  $Fe^{+2}$ -phénantroline suite à une réaction d'oxydoréduction constitue la base de cette technique. Ce complexe est soluble à un pH basique et se mesure à une absorbance de 510 nm.

### II.3.2. Activités antimicrobienne et antifongique

Les activités antimicrobiennes de tous les composés synthétisés ont été étudiées et les zones d'inhibition antimicrobienne (mm) ont été déterminées en utilisant la méthode de diffusion sur disque. Les composés de référence ampiciline et nystatine, respectivement, pour tous les microorganismes utilisés dans ce travail afin de comparer et de vérifier la fiabilité de la méthode utilisée. Les effets antimicrobiens in vitro des composés étudiés ont été testés contre certaines espèces bactériennes et fongiques par la méthode de diffusion sur disque. Nous avons voulu vérifier le potentiel antibactérien du MTE et du MTA contre deux espèces de bactéries à Gram positif (*S. aureus* et *P. aeruginosa*) et deux espèces de bactéries à Gram négatif (*E. coli* et *B. cereus*).

L'activité antifongique des composés MTA et MTE a également été déterminée à trois doses différentes (100, 200, 400 µg/ml) contre trois champignons pathogènes. La méthode de diffusion sur disque a été utilisée pour vérifier la sensibilité des souches isolées (*C. albicans*, *C. tropicallis* et *A. niger*) à différents agents antifongiques.

### II.3.3. Activité enzymatique

Les enzymes font partie des catalyseurs biologiques intervenant dans les réactions biochimiques indispensables à la croissance, à la maturation et à la reproduction des organismes vivants. La quantification de ces enzymes en mesurant l'activité catalytique à partir d'échantillons biologiques joue un rôle important dans différents domaines.

#### II.3.3.1. Activité acétylcholinestérase (AChE)

La mesure de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) a été réalisée par une légère variation de la technique spectrophotométrique développée par Ellman [28], l'anguille électrique a été employée, le substrat étant l'iodure d'acétylthiocholine. Le DTNB [5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoïque)] a permis de mesurer le pouvoir cholinestérasique. Un solvant, l'éthanol, a été choisi pour la dissolution des composés à tester et des contrôles. En résumé, 150 µl de tampon phosphate de sodium (100 mM, pH 8,0), un volume de 20 µl de la solution d'échantillon diluée dans l'éthanol à des concentrations diverses, et un volume de 20 µl de l'AChE ( $5,32 \times 10^{-3}$  U) a été mélangé et incubé pour une durée de 15 min à 25°C, ensuite 10 µl de DTNB (0,5 mM) ont été additionnés. Enfin, la réaction a été initiée par l'addition de 20 µl d'iodure d'acétylthiocholine (0,71 mM).

Le suivi spectrophotométrique de l'hydrolyse de ces substrats a été réalisé par l'apparition d'une couleur jaune de l'anion 5-thio-2-nitrobenzoate de méthyle, en fonction du résultat de la réaction du DTNB avec la thiocholine, dégagée par la réaction d'hydrolyse enzymatique de l'iodure d'acétylthiocholine à une longueur d'onde de 412 nm, à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits (SpectraMax PC340, Molecular Devices, USA). Un logiciel PRO Softmax v5.2 a permis d'évaluer les valeurs mesurées et les calculs. Le pourcentage de l'inhibition de l'AChE a été calculé en comparant les vitesses de réaction des échantillons à celles de l'échantillon témoin (éthanol dans un tampon phosphate, pH 8) selon la formule  $(E - S) / E \times 100$ , dans laquelle E représente l'activité de l'enzyme sans l'échantillon testé, et S, l'activité de l'enzyme avec l'échantillon testé. Les essais ont été réalisés en trois exemplaires. Le composé de référence a été la galantamine.

$$\text{Inhibition \%} = (A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{Extrait}} / A_{\text{Contrôle}}) \times 100 \quad (3)$$

Les agents antidiabétiques de synthèse utilisés à l'heure actuelle entraînent des troubles gastro-intestinaux tels que les diarrhées, les brûlures d'estomac, les ballonnements et autres. En conséquence, il est possible de faire appel à des inhibiteurs d'alpha-amylase naturels pour traiter l'hyperglycémie postprandiale en minimisant les effets secondaires.

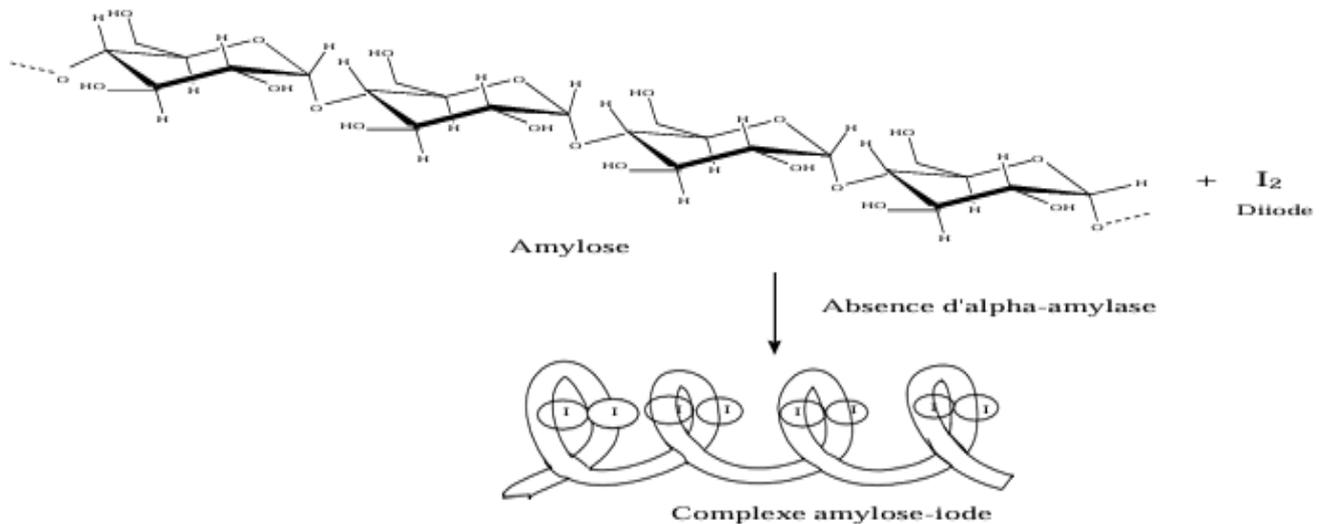
On utilise les inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase et de l' $\alpha$ -amylase dans le traitement du diabète sucré en raison de leur capacité à ralentir la digestion des glucides au niveau de l'intestin grêle et donc à diminuer l'augmentation du taux de sucre dans le sang après un repas.

### II.3.3.2. Inhibition de l'alpha amylase

On appelle  $\alpha$ -amylase l'enzyme de digestion, sécrétée par les glandes de la salive et les glandes du pancréas, synthétisée également par les fruits des végétaux lors de leur maturation. Il s'agit de l'une des plus importantes endo-amylases permettant d'hydrolyser les liaisons  $\alpha(1-4)$  glycosidiques présentes dans les chaînes d'amidon pour obtenir des molécules de maltose (disaccharides d' $\alpha$ -glucose). Cette dernière est indispensable pour absorber et digérer l'amidon et les glucides intégrés dans les aliments, c'est pourquoi elle pourrait être une cible dans le traitement du diabète de type 2. Le médicament Acarbose est un produit connu, qui sert d'inhibiteur de l'enzyme  $\alpha$ -amylase. Il ralentit la digestion des glucides et réduit le taux de glucose dans le plasma postprandial. Toutefois, il présente certains effets néfastes tels que diarrhées, hernies, ulcérations...

On suggère que les inhibiteurs d' $\alpha$ -amylase naturellement présents, notamment les

flavonoïdes et les composés phénoliques provenant de plantes, constituent une approche alternative pour la prévention et le traitement de la pathologie du diabète de type 2 avec un faible risque d'effets secondaires, voire aucun.



**Figure II.2.** Formation du complexe amylose-iodine en cas d'absence d' $\alpha$ -amylase (Boursier,2005).

La formule suivante a permis de déterminer le pourcentage d'inhibition de l' $\alpha$ -amylase :

$$\text{Inhibition \%} = 1 - \frac{[(Ac-Ae)-(As-Ab)]}{(Ac-Ae)} \quad (4)$$

**Références**

- [1] Stuerger, D. & Delmotte, M. Loupy, A. ed. **(2002)**, *Microwaves in Organic Synthesis*, 1ère Ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, chapter 1, pp. 1-33.
- [2] K. Randerath, « *Chromatographie sur couches minces* ». Gauthier-Villars, Paris, **(1971)**.
- [3] A. Beer, Bestimmung der absorption des rothenlichts in farbigen flussigkeiten, dans *annalen der physik and chemie*, vol. 86, p.78-88,**(1852)**.
- [4] R. T. Conley. *Infrared Spectroscopy*. Alin and Bacon Inc., **(1966)**.
- [5] M. Cotte, J. Susini, P. Dumas « les nouveaux développements en microspectroscopie infrarouge utilisant le rayonnement synchrotron » Colloque SFμ- Grenoble, **(2007)**.
- [6] W. Kohn and L. G. Sham, «Self-consistent equations including exchange and correlation effects», *Phys. Rev.*, (140) 1133–1138, **(1965)**.
- [7] W. Van Gunsteren, H. J. Berendsen, *C. Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*29, 992. **(1990)**.
- [8] C. Corminboeuf, F. Tran, J. Weber, *Journal of Molecular Structure: Theochem.*762, **(2006)**.
- [9] G.S. Kürkçüoğlu, E. Sayın, K. Gör, T. Arslan, O. Büyükgüngör, *Vib Spectrosc* 71, 105 **(2014)**.
- [10] E. Temel, C.Alaşalvar, H. Gökçe, A. Güder, Ç. Albayrak, Y. Bingöl Alpaslan, G. Alpaslan, N. Dilek, *Spectrochim Acta A* 136, 534 **(2015)**.
- [11] Ü. Ceylan, G. Özdemir Tarı, H.Gökçe, E.Ağar, *J Mol Struct* 1110, 1, **(2016)**.
- [12] J.B. Foresman, A.E. Frisch, *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods*, (2nd ed), Gaussian, Pittsburgh, PA, **(1996)**.
- [13] T.A. Koopmans, *Physica* 1: 104-113, **(1934)**.
- [14] J.P. Weber, J. Doucet, *Computer-aided molecular design: Theory and applications*, AcademicPress, London, 266. **(1996)**.
- [15] J.M.Godinez, Alvarez, J.L.Mora, Mendoza, E.Rodriguez, Institut Mexicain du Pétrole, NACE International, Corrosion 2004, paper n° 04412, Houston, TX, **(2004)**.

- [16] C. Fiaud, C. Lemaitre, N. Pébère, Corrosion et anticorrosion, chapitre 13. Lavoisier, Paris (2002).
- [17] C. Kessous, Biochimie Structurale, (2006).
- [18] W. Van Gunsteren, H. J. Berendsen, C. Angew. Chem. Int. Ed. Engl.29, 992. (1990).
- [19] C. Corminboeuf, F. Tran, J. Weber, Journal of Molecular Structure: Theochem.762,(2006).
- [22] J.Pipekand, P.Z.Mezey, J. Chem. Phys. 4916-4926, 90, (1989).
- [23] P.Hiberty, N.Trong Anh, Introduction à la chimie quantique, livre, p 34, (2008).
- [24] M.S. Blois, 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, Nature, 181, 1199-1200.
- [25] R. Apak, K. Guclu, M. Ozyurek, S. E. Karademir, 2004.Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. J. Agric. Food. Chem., 52, 7970–7981.
- [26] R., Re, N., Pellegrini, A., Proteggente, A., Pannala, M., Yang, C., Rice-Evans, 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic. Bio. Med., 26, 1231–1237.
- [27] H. M. Miller, 1971. A simplified method for the evaluation of antioxidants. J. Oil Chem. Soc., 45, 91.
- [28] G.L., Ellman, K.D., Courtney, V., Andres, , R.M., Featherston, 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol., 7, 88–95

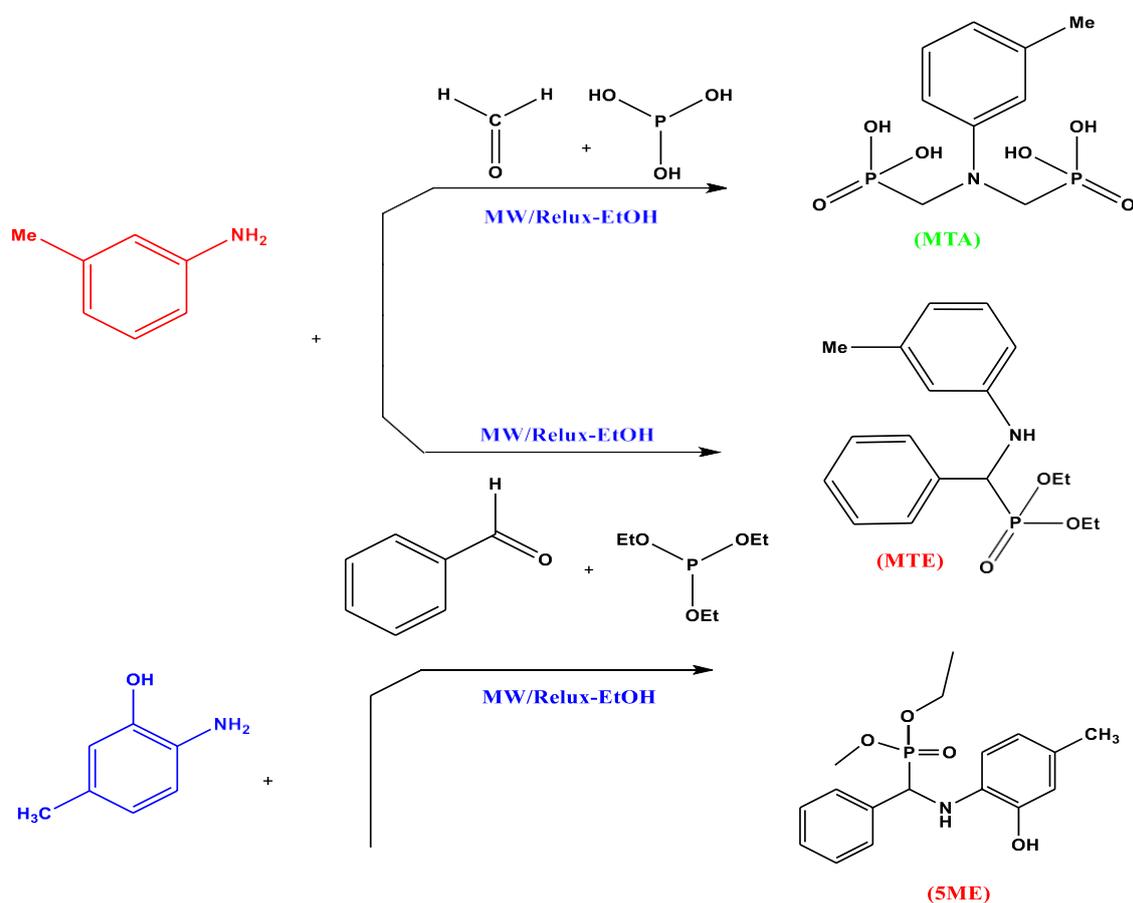
## *Chapitre III : Résultats et discussions*

Les phosphonates connaissent actuellement un essor très rapide. Leur intérêt synthétique réside principalement dans la rapidité d'élaboration de structures complexes, avec une grande diversité. Elles trouvent de nombreuses applications en chimie médicinale et en agrochimie. Ce troisième et dernier chapitre présente l'ensemble des résultats obtenus de mes travaux réalisés ainsi qu'aux discussions qui en découlent.

### III.1. Synthèses et caractérisations physicochimiques

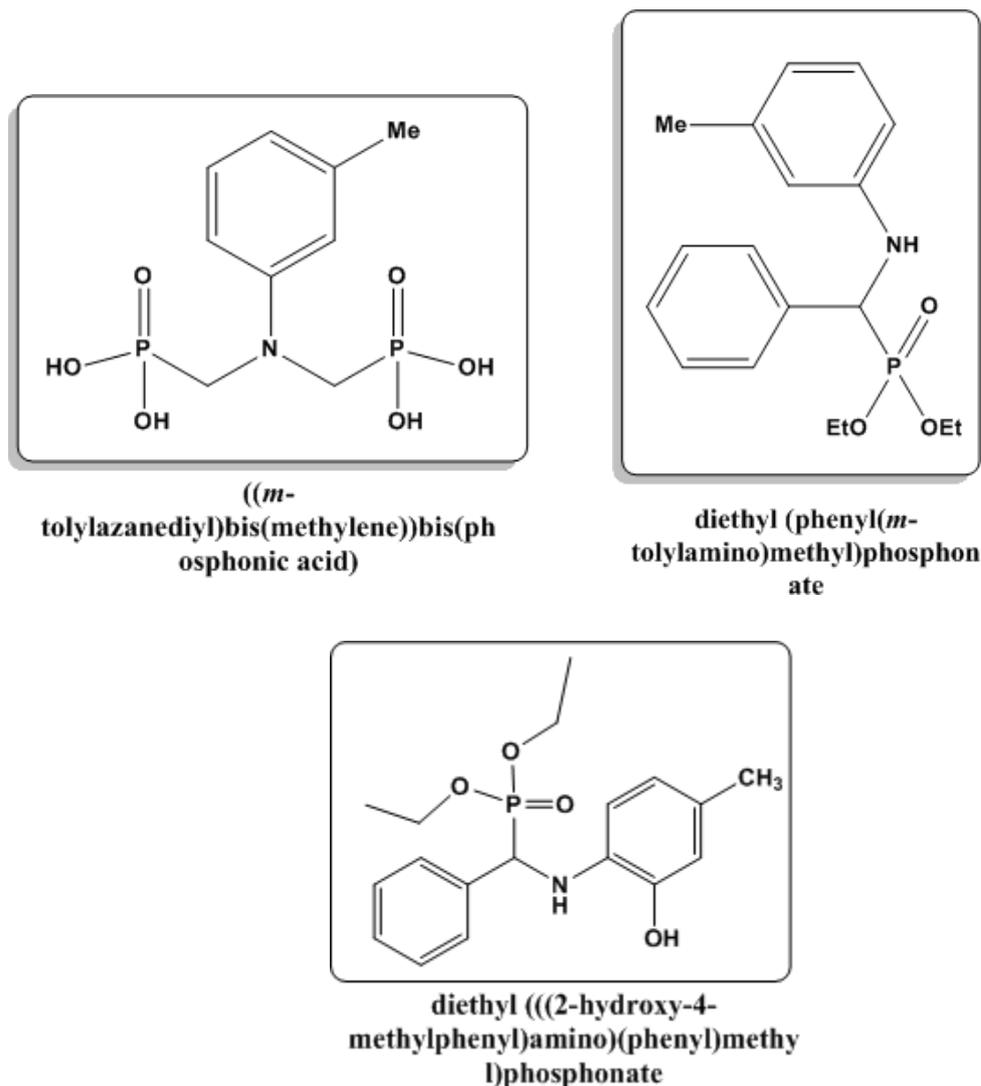
#### III.1.1. Synthèses

Les réactions de synthèse sont effectuées selon les séquences réactionnelles ci-dessous, dont le but est d'obtenir des esters  $\alpha$ -aminophosphonates *via* la réaction de Kabachnik-Fields et un acide  $\alpha$ -aminophosphonique *via* la réaction d'Irani-Moedritzer à partir de la m-Toluidine et le 2-amino-5-méthylphénol:



**Schéma III.1.** Synthèse de l'acide  $\alpha$ -aminophosphonique (MTA) et des esters  $\alpha$ -aminophosphonates (MTE) et (5MC).

Selon l'IUPAC la dénomination des composés est:



**Schéma III.2.** Dénomination de MTA, MTE, et 5MC selon IUPAC.

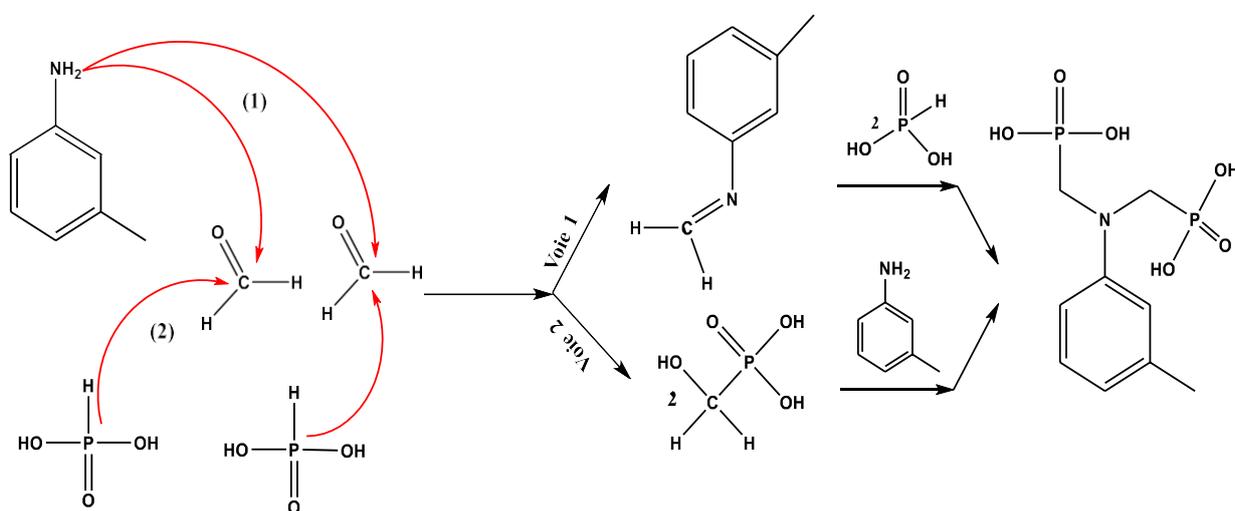
### III.1.1.1. Mécanisme proposé pour la synthèse de MTA

La réaction d'une amine primaire (*m*-toluidine), de formaldéhyde (paraformaldéhyde) et de l'acide phosphoreux dans un milieu acide (HCl) ou sous irradiation micro-ondes conduit à la synthèse de l'amino-bis(acide méthylène phosphonique (MTA)) (Schéma III.1). Cette réaction, également connue sous le nom de Réaction de Moedritzer-Irani depuis qu'elle a été rapportée pour la première fois par ces auteurs en 1966 [1]. Lorsque l'amine primaire est utilisée, la réaction produit un acide bis-phosphonique puisque l'amine secondaire générée *in situ* est plus réactive que l'amine primaire de départ [2]. En conséquence, la stoechiométrie doit être adaptée, et 2 équivalents de formaldéhyde et de l'acide phosphoreux doivent être utilisés.

La réaction de Moedritzer-Irani a cependant l'avantage de conduire directement aux acides phosphoniques sans nécessiter une fastidieuse déprotection des phosphonates par les acides de Bronsted [3] ou de Lewis [4].

Pour la réaction **Moedritzer-Irani**, deux mécanismes généraux ont été proposés qui se distinguent par l'ordre dans lequel se font les deux étapes :

- **Voie 1:** Une imine est formée à partir du composé carbonyle et l'amine (primaire), et puis l'acide phosphoreux est ajouté à la liaison C-N de l'intermédiaire.
- **Voie 2:** Assume la formation d'une  $\alpha$ -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  $\alpha$ -aminophosphonique.



**Schéma III.3.** Voies principales de la réaction de «Irani-Moedritzer».

**1<sup>er</sup> mécanisme :** l'attaque de l'amine (nucléophile) sur le site électrophile du carbonyle formant une imine, après la seconde attaque par l'acide phosphoreux sur la liaison C=N. la même attaque sera répétée pour l'amine et l'acide phosphoreux.

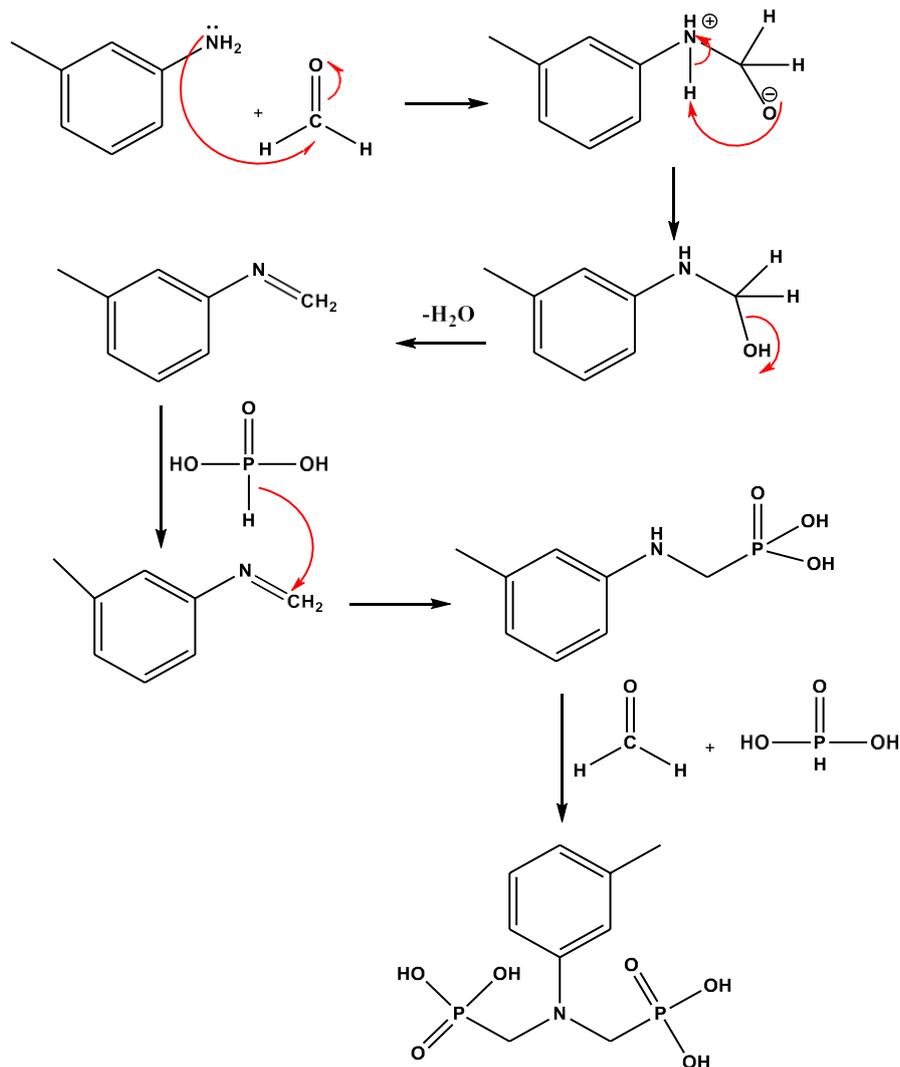


Schéma III.4. Mécanisme réactionnel de la synthèse de MTA selon la voie 1.

**2<sup>ème</sup> mécanisme :** l'attaque de l'acide phosphoreux (nucléophile) sur le site électrophile du carbonyle pour former l' $\alpha$ -hydroxyphosphonique, après une substitution du groupe OH par l'amine :

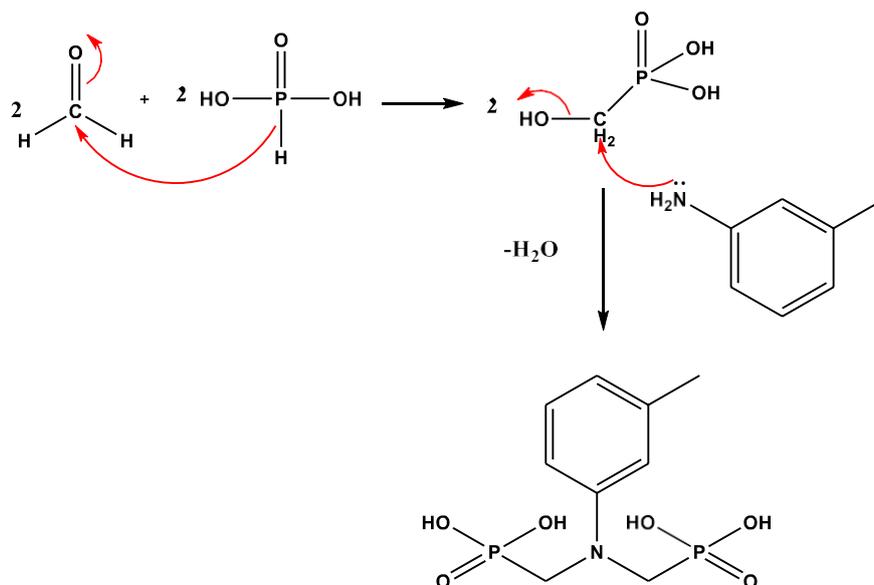


Schéma III.5. Mécanisme réactionnel de la synthèse de MTA selon la voie 2.

### III.1.1.2. Mécanismes proposés pour la synthèse des esters MTE et 5MC

La réaction de Moedritzer-Irani n'est pas généralisable avec d'autres aldéhydes aromatiques, contrairement à la réaction de Kabachnik-Fields [5], dans laquelle un dialkylphosphonate est utilisé à la place de l'acide phosphoreux selon le **Schéma III.1**. La voie principale d'accès aux  $\alpha$ -aminophosphonates est une réaction à trois composants connue sous le nom de réaction de Kabachnik-Fields. Elle met en jeu un composé carbonylé, une amine et un dialkylphosphite.

Les réactions de Kabachnik-Fields peuvent être accomplies dans de nombreuses variantes. Ces condensations sont généralement réalisées en présence de divers catalyseurs et/ou solvants [6]. Ils peuvent être réalisés dans des conditions de chimie verte, y compris la synthèse assistée par micro-ondes (MW), qui présentent également un intérêt particulier [7]. Dans certains cas, la réaction est réalisée sans catalyseur [8]. Cependant, dans la plupart des cas, l'usage d'acides comme de bases [9].

Bien que de nombreuses suggestions aient été avancées, le mécanisme de cette réaction n'a pas été complètement élucidé [10]. Parmi les mécanismes actuellement envisagés, les plus plausibles sont :

**1<sup>er</sup> mécanisme** (de type Mannich): consiste en la condensation de l'amine sur le composé carbonylé suivie de l'hydrophosphorylation de l'imine intermédiaire, c.-à-d , l'attaque de l'amine (nucléophile) sur le site électrophile du carbonyle (benzaldéhyde) formant un groupe

hydroxyle, une seconde attaque de la triéthylphosphite sur l'atome de carbone qui porte le groupement OH pour faire une substitution. Puis formation d'un groupe phosphonate après libération de l'éthyle pour donner de l'éthanol à la fin.

Ce mécanisme offre un exemple d'une réaction plus générale, la réaction de Pudovik, qui consiste en l'addition d'un phosphite sur une liaison double C=O, C=N, voire C=C ou une liaison triple C≡C dans certains cas. Comme pour la réaction de Mannich, il est possible d'additionner le dialkylphosphite à des imines préformées, ce qui revient à réaliser une réaction de Pudovik au sens strict

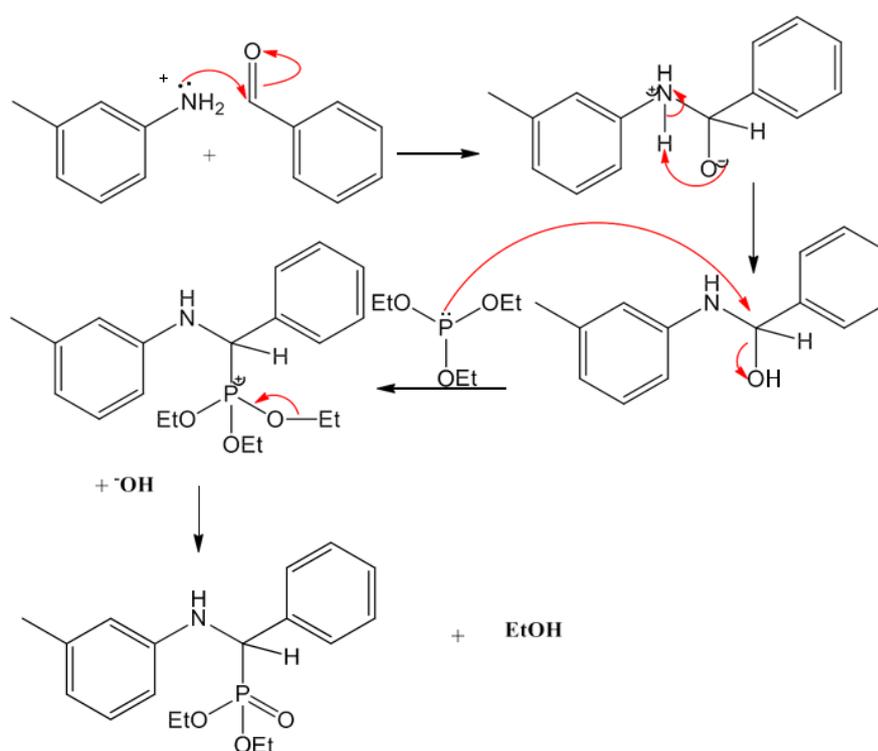
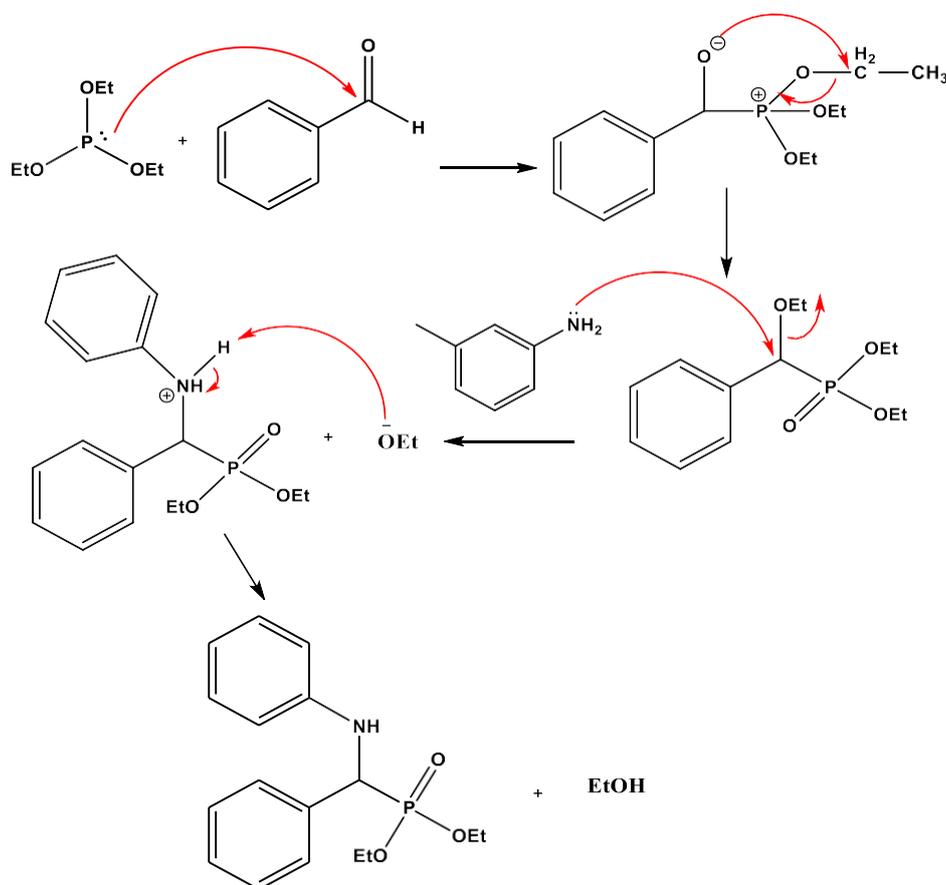


Schéma III.6. Mécanisme réactionnel de la synthèse de MTE selon la voie 1.

**2<sup>ème</sup> mécanisme :** Selon l'autre voie, la première étape est l'addition de la triéthylphosphite au groupement carbonyle de composant oxo, pour fournir un  $\alpha$ -hydroxyphosphonate, qui subit une substitution par l'amine pour fournir l' $\alpha$ -aminophosphonate. Sur la base d'études cinétiques, il a conclu que le mécanisme dépend de la nature des réactifs [11-13].



**Schéma III.7.** Mécanisme réactionnel de la synthèse de MTE selon la voie 2.

Les produits (MTA), (MTE) et (5MC) ont été préparés à partir de m-toluidine et 5- methyl-2-aminophenol sous irradiation micro-ondes et chauffage conventionnel, comme indiqué dans le **Schéma III.1**. La comparaison entre les rendements et le temps consacré à la préparation de ces molécules est présentée dans le **Tableau III.1**. Après isolement et évaporation des solvants , les rendements de synthèse ont été calculés. Comme le montre le **Tableau III.1**

**Tableau III.1.** Rendements des produits synthétisés.

Produits	À reflux	Sous Micro-ondes
<b>MTA</b> Temps/Rendement	4-5h/66%	<b>7-15min/87%</b>
<b>MTE</b> Temps/Rendement	4-5h/70%	<b>5-10min/92%</b>
<b>5MC</b> Temps/Rendement	4-5h/56%	<b>9-11min/80%</b>

Les résultats montrent que la synthèse sous irradiations micro-ondes était plus rapide (4-8 min/MTA, 5-10 min/MTE et 9-11 min/5MC), plus productive (87%/MTA, 92%/MTE et 80%/5MC) et consommait moins de solvant, ce qui la rend plus adaptée aux principes de la chimie verte, alors que des réactions similaires sous chauffage conventionnel (reflux) ont donné des rendements plus faibles (66%/MTA, 70%/MTE et 56%/5MC) avec des temps de réaction comparativement plus longs ( $\approx 5$  h/MTA,  $\approx 6$  h/MTE et 5 h/5MC).

### III.1.2. Caractérisations

#### III.1.2.1. Caractérisations physico-chimiques

Les composés obtenus à partir d'une synthèse assistée par micro-ondes ont les mêmes propriétés physiques (couleur, forme, point de fusion) qu'à ceux synthétisés par une préparation conventionnelle. La détermination des points de fusion a été réalisée au Laboratoire de Chimie à l'Université de Ferhat Abbes Sétif-1 à l'aide d'un banc Kofler. Le dépôt d'un produit sur cet appareil, nous permet de connaître la température de fusion en visualisant la zone où ils fondent. Le **Tableau III.2** résume les résultats des points de fusion des produits synthétisés

**Tableau III.2.** Aspects et points de fusion des produits synthétisés.

Produits	Aspects	Points de fusion
MTA	Gel rouge	137-140°C
MTE	Poudre blanche	130-133°C
5MC	Poudre blanche	108-111°C
m-Toluidine	Liquide huileux incolore à jaunâtre	-31 °C
2-Amino-5-methylphenol	Cristaux beiges	160-162°C

Pour une caractérisation partielle des différents échantillons, nous avons suivi le déroulement des réactions chimiques par des tests CCM. La chromatographie sur couche mince (CCM) a été réalisée avec le système solvant : éthanol/dichlorométhane (1/3, V/V), le choix est basé sur la bonne migration des échantillons analysés ce qui permet d'avoir une bonne séparation et une visibilité acceptable des taches. Chaque molécule isolée par les deux méthodes présentait une seule tache sur la plaque CCM. L'apparition d'une seule tache, pour chaque produit synthétisé et qui est différente de celle du produit de départ, constitue un signe de pureté et confirme la fin de la réaction et l'obtention de nouveaux produits. Il suffit donc de déterminer le rapport frontal de chaque produit, les valeurs des rapports frontaux des produits synthétisés se trouvent dans le **Tableau III.3**.

**Tableau III.3.** Les rapports frontaux des produits synthétisés.

Produits	Rapports frontaux
Eluant : Ethanol /Dichloromethane 1/3	
MTA	0.625
MTE	0.385
5MC	0.428

### Chapitre 3: Résultats et discussions

Le produit synthétisé (MTA) s'est révélé soluble dans l'eau, l'éthanol et le méthanol. Alors que le MTE et le 5MC ont été trouvés solubles dans le méthanol, l'acétone, l'acétonitrile, le chloroforme, le DMF et le DMSO à température ambiante, également solubles dans l'éthanol à température élevée.

L'essai de solubilité effectué dans des tubes à essai à  $\sim 22^\circ\text{C}$  a montré les résultats regroupés dans le **Tableau III.4**. Les tests de solubilité effectués montrent que l'ester et l'acide présentent une solubilité dans certains solvants polaires, d'autre part l'acide est également soluble dans l'éther de pétrole.

**Tableau III.4.** Solubilités des produits synthétisés.

Solvants	Eau	Méthanol	n-Hexane	Acétate d'éthyle	Acétone	Ethanol	DMSO
MTE	Peu Soluble	Soluble	Insoluble	Insoluble	Insoluble	Soluble	Soluble
MTA	Soluble	Soluble	Insoluble	Insoluble	Insoluble	Soluble	Soluble
5MC	Insoluble	Soluble	Insoluble	Soluble	Soluble	Soluble	Soluble

Tous les composés synthétisés ont été adéquatement caractérisés par les analyses élémentaires et les méthodes spectroscopiques UV, IR et RMN.

#### III.1.2.2. Analyse élémentaire

Les pourcentages de carbone, d'hydrogène et d'azote ont été déterminés en utilisant un analyseur CHN. Les résultats de l'analyse élémentaire sont regroupés dans le tableau ci-dessous

**Tableau III.5.** Valeurs trouvées et calculées des éléments (C, H et N) des produits synthétisés

Produits	Valeurs trouvées (calculées)			Formule brute
	%C	%H	%N	
MTA	36.61(36.58)	5.08(5.12)	4.74(4.70)	$\text{C}_9\text{H}_{15}\text{NO}_6\text{P}_2$
MTE	64.86(64.83)	7.20(7.25)	4.20(4.31)	$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{NO}_3\text{P}$
5MC	54.82(54.83)	6.87(6.81)	4.01(4.20)	$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{NO}_4\text{P}$

Les données trouvées et calculées étaient en bon accord avec les formules moléculaires proposées. Ces résultats d'analyse nous ont permis de confirmer les structures proposées.

### III.1.2.3. Analyses spectrophotométriques

Une fois que les molécules sont obtenues, des analyses spectrophotométriques ont été effectuées pour les identifier. Les analyses spectrophotométriques Infrarouge et UV-vis des molécules obtenues sont réalisées au niveau du Laboratoire de Chimie à l'Université Ferhat Abbas Sétif-1. Toutes les structures des composés ci-dessus étaient en bon accord avec les données spectrales et analytiques.

#### ❖ Analyses par UV-Vis :

Les spectres UV-Vis servent d'une part à l'analyse quantitative en appliquant la loi de Beer Lambert pour calculer le coefficient d'absorption molaire ( $\epsilon$ ), et d'autre part, à l'analyse qualitative, en comparant les spectres des produits synthétisés avec ceux des produits de départ, le but étant de prouver qu'il existe des différences significatives ( $\lambda_{\max}$  différents) entre les spectres des produits synthétisés et ceux des produits de départ.

Les spectres d'absorption électronique des composés étudiés ont été enregistrés dans l'éthanol, à température ambiante, sur des solutions de concentration identique en quartz, de trajet optique de 1 mm dans le domaine allant de 200 nm à 900 nm.

- Le spectre UV-Vis de la molécule MTA a montré deux absorptions: l'une est située à  $\lambda_{\max}=246,34$  nm (**n- $\pi^*$** ), l'autre à  $\lambda_{\max} = 290,79$  nm (**n- $\sigma^*$** ).
- Le spectre MTE présente deux bandes: une bande d'absorption située à  $\lambda_{\max}=236,65$  nm(**n- $\pi^*$** ), une autre bande à  $\lambda_{\max} = 287,32$  nm (**n- $\sigma^*$** ).
- Tandis que le spectre 5MC présente également deux bandes : l'une est située à  $\lambda_{\max} = 216,50$  nm(**n- $\pi^*$** ), l'autre bande se situe à  $\lambda_{\max} = 257,50$  nm (**n- $\sigma^*$** ).

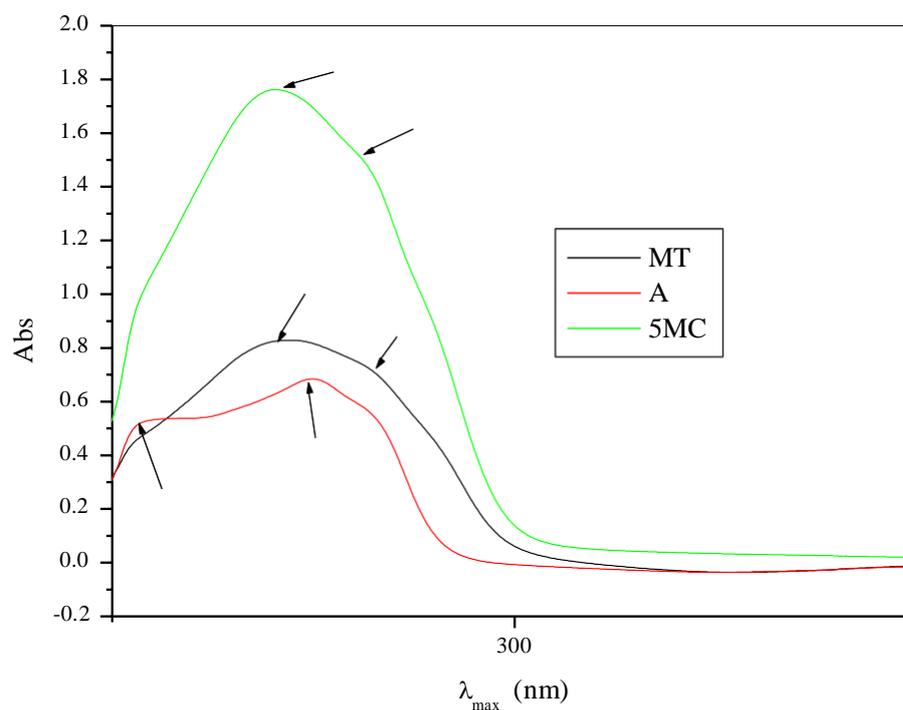
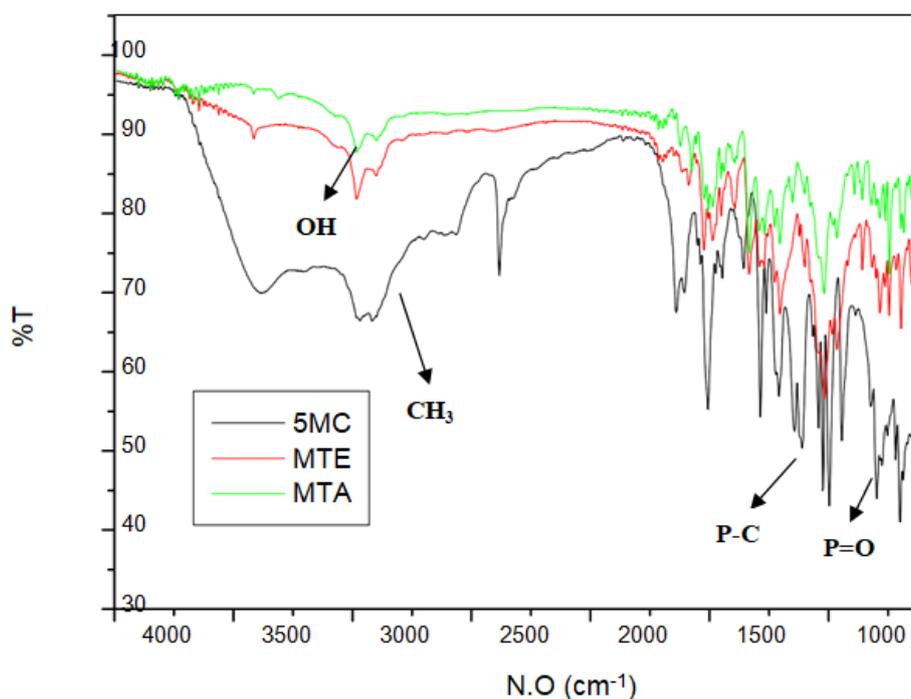


Figure. III.1. Spectres UV-vis des produits MTA, MTE et 5MC (Solvant : Ethanol).

#### ❖ Analyse par FTIR

Les  $\alpha$ -aminophosphonates sont généralement caractérisés par des bandes d'absorption caractéristiques des principaux groupements. Les spectres infrarouges des échantillons ont été enregistrés dans un domaine de  $4000-500\text{cm}^{-1}$  en utilisant le spectrophotomètre FTIR. Les principales bandes de vibration des différents groupements fonctionnels, sont présentées dans le **Tableau III.6**. Les spectres IR des produits: MTE, MTA et 5MC sont représentés dans la figure suivante:



**Figure. III.2.** Spectres FTIR des produits MTA, MTE et 5MC.

L'étude est basée sur deux techniques pour interpréter les spectres IR :

La comparaison des spectres des produits synthétisés avec ceux des produits de départ et le repérage et l'identification des bandes grâce à des tables de références que l'on trouve dans des ouvrages spécialisés. La figure III.2 illustre les spectres d'absorption infrarouge des produits obtenus, sur lesquels on peut aisément remarquer la disparition des bandes de la fonction amine primaire des produits de départ et l'apparition des bandes d'absorption attribuables aux groupements P-OC, P-OH, P-C, P=O et OH phosphonique, ...etc, dans les produits synthétisés.

- Tous les composés synthétisés présentent des bandes d'absorption du carbone ( $sp^3$ ) à 2922-2860 $cm^{-1}$  dues à la présence du groupement méthyl dans la position (méta) et aussi à la substitution des groupements methyl-phosphono.
- L'acide  $\alpha$ -aminophosphonique MTA présente des bandes caractéristiques de la fonction -O-H phosphonique à 3200-3600 $cm^{-1}$ . Le pic à 1440 $cm^{-1}$  est dû au stretching de la fonction -P(O)-OH.
- Les bandes d'absorption à 1253 $cm^{-1}$  et 1095 $cm^{-1}$  sont affectées aux modes stretching de P=O et P-O, respectivement de MTA, MTE et 5MC.

### Chapitre 3: Résultats et discussions

- Le fort pic à  $\approx 1370\text{cm}^{-1}$  est attribué à la flexion de la liaison P-CH<sub>2</sub> qui pourrait être mis à profit pour confirmer la formation d'une liaison entre l'acide phosphoreux (ou la TEP) et le Benzaldehyde.
- Les groupements amines primaires sont responsables de l'apparition des deux bandes d'inégale importance vers 2935-3369  $\text{cm}^{-1}$  dues aux vibrations d'élongations  $\nu$  (NH<sub>2</sub>). Alors que les amines secondaires (MTE et 5MC) présentent un seul pic de faible intensité et l'amine tertiaire (MTA) ne présente aucun signe (aucune bande N-H). Le tableau suivant (**Tableau III.6**) résume les bandes caractéristiques d'absorption des spectres infrarouge des composés.

**Tableau III.6.** Attribution des bandes d'absorption des produits synthétisés MTA, MTE et 5MC.

Produits	Fonction	Fréquences( $\text{cm}^{-1}$ )	
5MC	-NH-	3393	Elongation
		3479	
		1620	Déformation
	C-N	1309	Elongation
	-CH <sub>3</sub>	2860	Elongation
		2922	Symétrique , Asymétrique
C=C	1494	Elongation	
=C-H	3038	Elongation	
MTA	-OH	$\approx 3200-3600$	Elongation
	N-C	1650	/
	P-C	1370	/
	P-OH	1440	/
	P=O	1253	/
	-CH <sub>3</sub>	2845	Elongation
2910		Symétrique , Asymétrique	
MTE	N-C	1660	/
	P-C	1378	/
	P=O	1240	/
	P-O-C	1095	/
	C-C aliphatique	851	/

#### ❖ Analyses par RMN

Récemment, les méthodes RMN pour la détermination structurale des aminophosphonates ont gagné en importance. Cela découle de la simplicité de ces méthodes, qui nécessite une quantité assez petite d'échantillon, sans prérequis particuliers quant à sa préparation et sans nécessité de connaître les fondamentaux de la technique.

### Chapitre 3: Résultats et discussions

Dans la présente étude les produits MTA, MTE et 5MC ont été caractérisés par deux techniques de la RMN, à savoir RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{31}\text{P}$ .

Les figures ci-dessous présentent les Spectres RMN $^1\text{H}$  des produits MTA, MTE et 5MC:

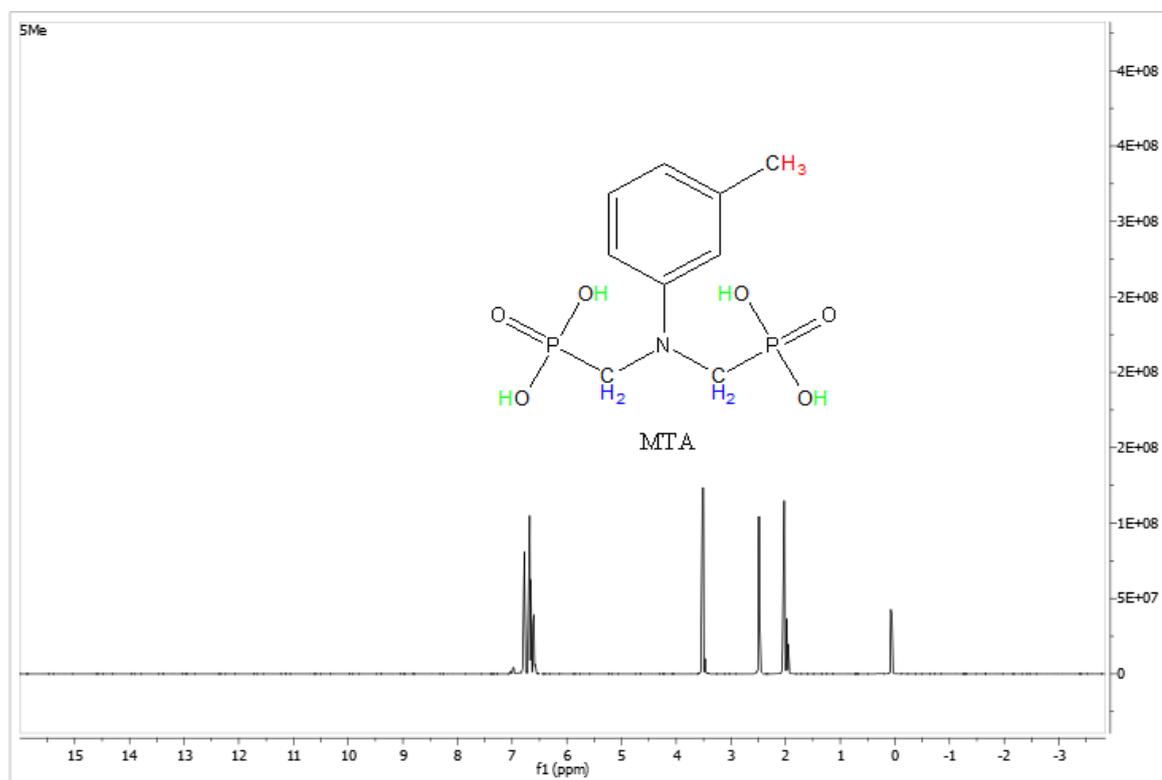


Figure. III.3. Spectre RMN $^1\text{H}$  du produit MTA.

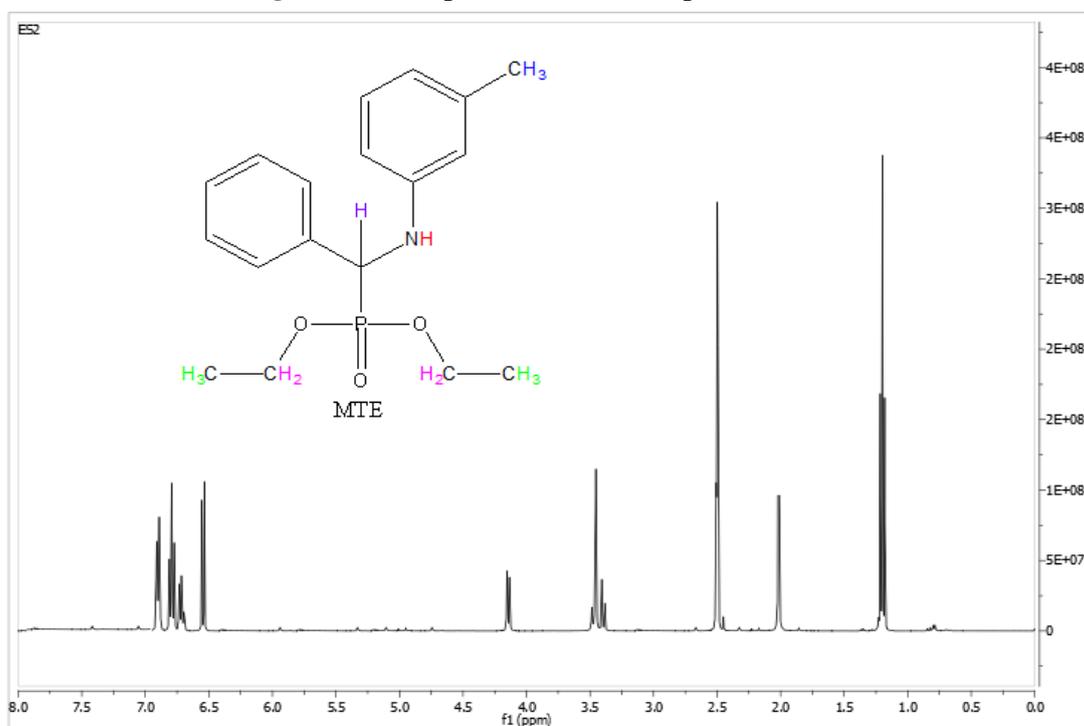
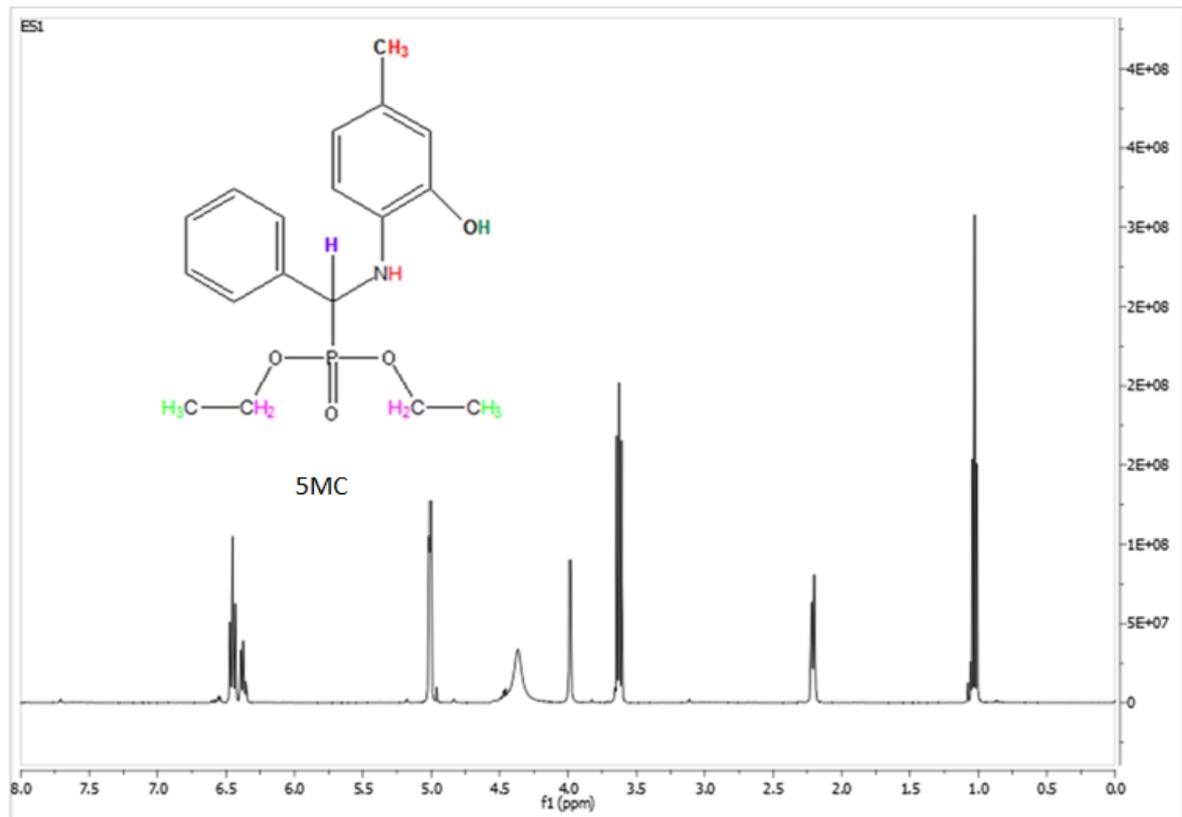


Figure. III.4. Spectre RMN $^1\text{H}$  du produit MTE.



**Figure. III.5.** Spectre RMN<sup>1</sup>H du produit 5MC.

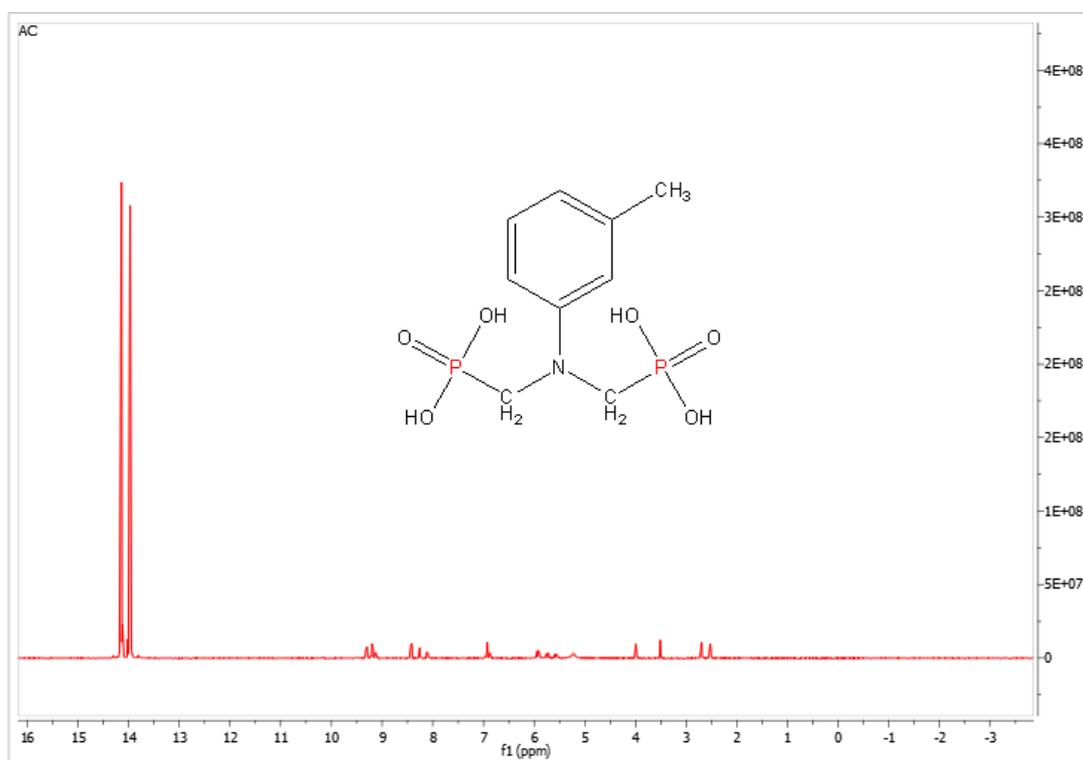
La spectroscopie RMN<sup>1</sup>H des produits préparés a permis de confirmer les structures prévues en intégrant le signal de résonance finale. Le **Tableau III.7** montre l'interprétation des spectres RMN<sup>1</sup>H des produits synthétisés MTA, MTE et 5MC.

Tableau III.7. Interprétation des spectres RMN<sup>1</sup>H de MTA, MTE et 5MC.

Produits	Type de proton	Multiplicités	δ (ppm)	Intensité
MTA	CH <sub>3</sub>	Singulet	2.35	1H
	OH	Singulet	2.1	4H
	CH <sub>2</sub>	Singulet	3.4	4H
	CH <sub>AR</sub>	Multiplet	6.30-7.02	4H
MTE	CH <sub>3</sub>	Triplet	1.35	6H
	CH <sub>3</sub>	Singlet	2.03	1H
	CH <sub>2</sub>	Quadruplet	3.47	4H
	CH	Singlet	4.1	1H
	NH	singlet	4.25	1H
	CH <sub>AR</sub>	Multiplet	6.7-7.5	9H
5MC	CH <sub>3</sub>	Triplet	1.22	6H
	CH <sub>3</sub>	Singlet	2.33	1H
	CH <sub>2</sub>	Quadruplet	3.62	4H
	CH	Singlet	3.9	1H
	NH	Singlet	4.35	1H
	OH	Singlet	5.02	1H
	CH <sub>AR</sub>	Multiplet	6.5-7.2	9H

Les protons aromatiques des esters et de l'acide  $\alpha$ -aminophosphonique sont apparus sous forme de multiplet dans la région  $\delta$  6,5–7,5. Le proton du groupe P–C–H résonnait sous forme de singlet dans la plage  $\delta$  3,4–4,10 en raison du couplage avec le phosphore et N–H. Le signal du proton N–H est apparu à  $\delta$  4,25–4,35 sous forme de singlet. Les protons de P–O–CH<sub>2</sub>–C qui apparaissaient sous forme de quatuor à  $\delta$  3,56–3,62 et P–O–C–CH<sub>3</sub> donnaient un triplet à  $\delta$  3,47–3,62.

Les Spectres RMN<sup>31</sup>P des produits MTA, MTE et 5MC sont représentés dans les figures ci-dessous (Fig. III.6, Fig. III.7, Fig. III.8):



**Figure. III.6.** Spectre RMN<sup>31</sup>P du produit MTA.

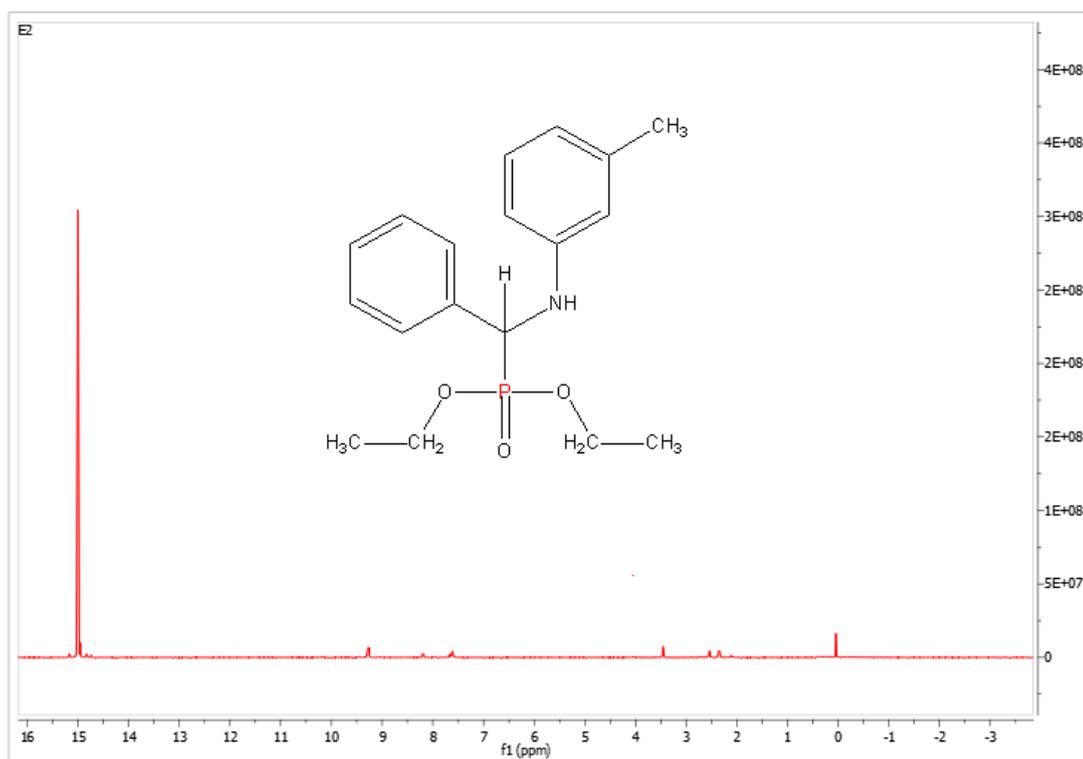


Figure. III.7. Spectre RMN $^{31}\text{P}$  du produit MTE.

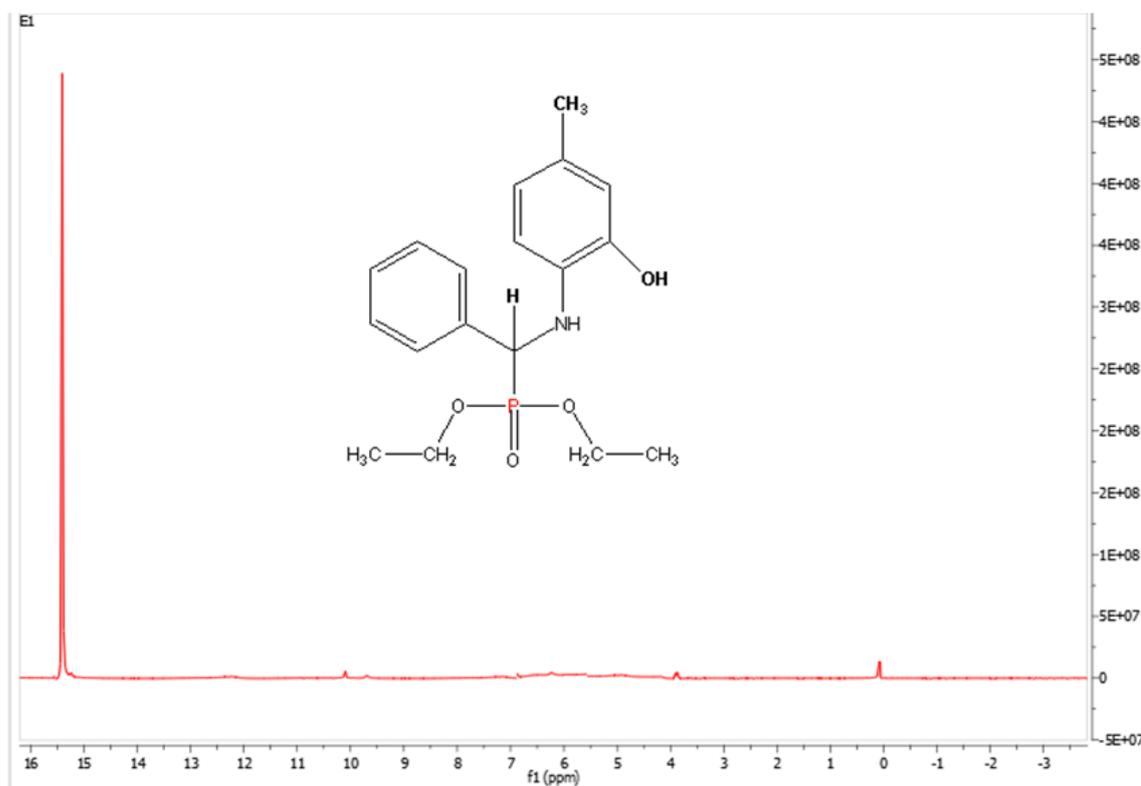


Figure. III.8. Spectre RMN $^{31}\text{P}$  du produit 5MC.

### *Chapitre 3: Résultats et discussions*

---

La spectroscopie RMN  $^{31}\text{P}$  est la plus précise des techniques de caractérisation de la structure des composés à base de phosphore. Les déplacements chimiques en RMN  $^{31}\text{P}$  pour les substances obtenues sont dépendantes des déséquilibres des liaisons  $\sigma$  provoqués par la variation de l'électronégativité des atomes, l'effet des paires électroniques libres, le degré d'occupation des orbitales  $d$  du phosphore et l'écart par rapport à la symétrie géométrique.

Les atomes de phosphore dans MTA, MTE et 5MC apparaissent respectivement à : 14ppm, 15ppm et 15.4 ppm (**Fig. III.6, Fig. III.7, Fig. III.8**). Ces résultats confirment la réussite de la synthèse d'acides  $\alpha$ -aminophosphoniques hautement purs.

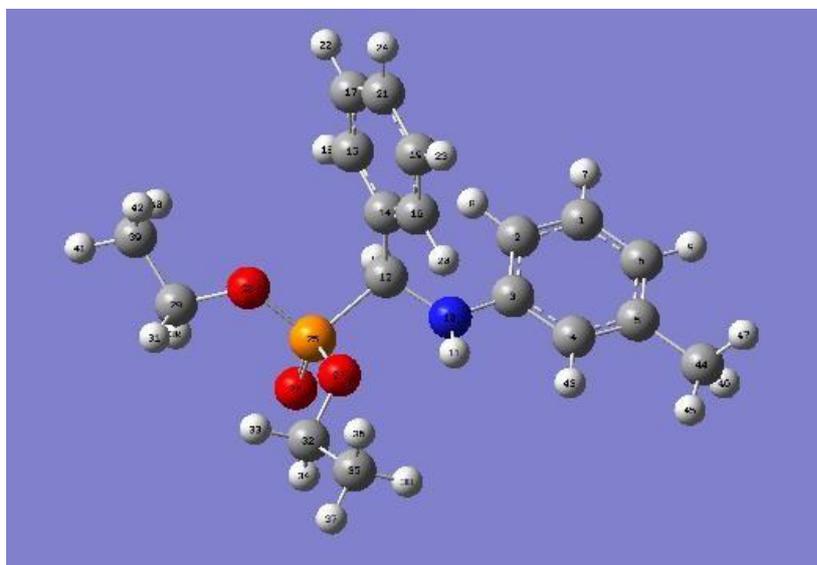
## III.2. Calculs théoriques par la méthode DFT

Cette partie a pour but de présenter les résultats des calculs théoriques par la méthode de DFT. Cette méthode théorique vise à déterminer les propriétés structurale et énergétique des molécules synthétisées.

### III.2.1. Optimisation géométrique

Au cours de cette étape, on étudie l'optimisation des formes géométriques des molécules synthétisées où l'idée principale est de faire varier la position des frontières d'une structure arbitraire, pour obtenir une structure plus stable. L'optimisation de la géométrie a été réalisée par la minimisation de l'énergie (Les structures les plus stables correspondent à l'énergie la plus faible). Les stabilités relatives des trois molécules ont été prédits en utilisant la base B3LYP/ 6-31++G(d,p), avec deux fonctions de base polarisées, d et p; la présence de ces deux fonctions polarisées est indispensable pour ajuster l'analyse DFT. Les énergies totales d'optimisation des structures sont :  $E_T(\text{MTA})=-1541.0064594\text{a.u.}$ ,  $E_T(\text{MTE})=-1322.287789\text{a.u.}$  et  $E_T(\text{5MC})=-1396.770864\text{ a.u.}$ , respectivement. De l'énergie totalement des structures optimisées, nous avons confirmé que l'acide MTA était plus stable que le les esters MTE et le 5MC.

Les structures optimisées de chaque molécule sont représentés ci-dessous (**Figure. III.9**):



**Figure. III.9.** Structure optimisée de MTE.

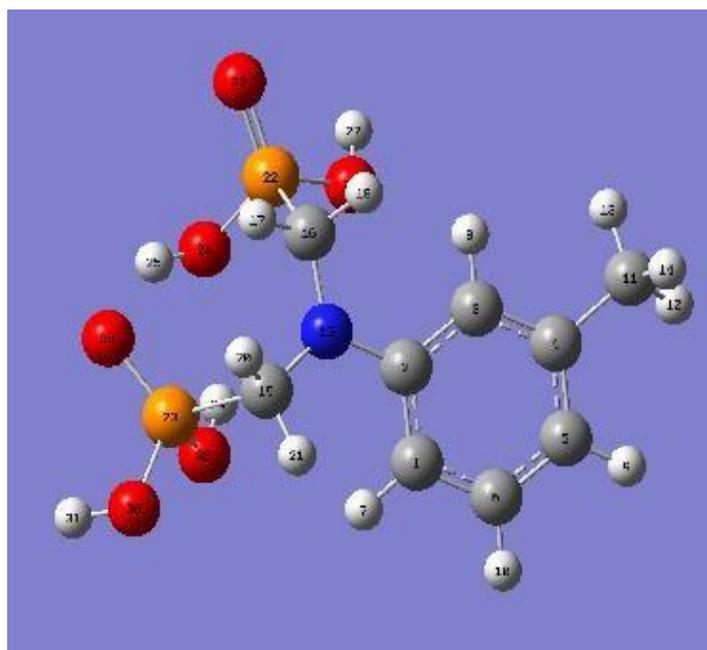


Figure. III.10. Structure optimisée de MTA.

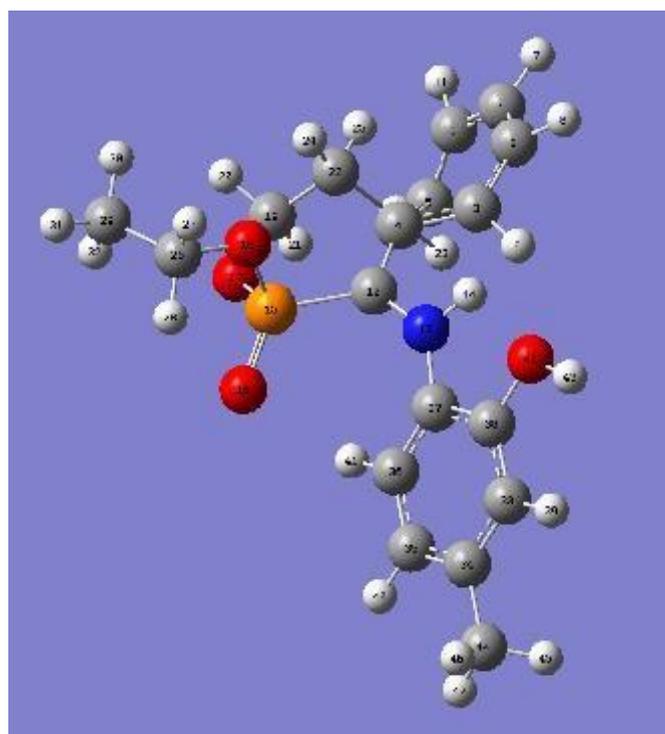


Figure. III.11. Structures optimisées de 5MC.

Egalement, on a utilisé la méthode de DFT au niveau B3LYP avec la base 6-31G (d,p) pour déterminer certains paramètres géométriques (longueurs des liaisons et les angles). L'optimisation géométrique nous a permis de comparer entre les propriétés structurales (la géométrie) des trois molécules. Les paramètres géométriques optimisés (longueur de liaison et angles) sont calculés par la méthode DFT/B3LYP/6-31G (d,p) à l'aide du logiciel

### Chapitre 3: Résultats et discussions

Gaussian09, et sont représentés dans les tableaux (Distances en Å et angles en degrés °). Pour voir les différences géométriques provoquées par le changement du groupement fonctionnel Acide-Ester ; on a choisi quelques liaisons :

**Tableau III.8.** Quelques paramètres géométriques optimisés pour MTE, MTA et 5MC (longueurs de quelques liaisons).

MTE		MTA		5MC	
Liaison	Long. (Å)	Liaison	Long.(Å)	Liaison	Long. (Å)
C3-N10	1.3943	C2-N15	1.4148	C12-N13	1.384
C5-C44	1.5122	C4-C11	1.5122	C1-C2	1.529
N10-C12	1.4476	C15-C1	1.4529	P15-O17	1.6176
C12-P25	1.8547	C15-P22	1.4523	P15-O18	1.628
P25=O26	1.4902	P22=O32	1.4872	P15=O16	1.4834
		P23=O33	1.502		
P25-O27	1.627	P22-O26	1.6231		
P25-O28	1.6179	P23-O28	1.6146		

**Tableau III.9.** Paramètres géométriques optimisés pour MTE , MTA et 5MC (quelques angles).

MTE		MTA		5MC	
Liaison	Angle (°)	Liaison	Angle (°)	Liaison	Angle (°)
C3-N10-C12	123.8556	C2-N15-C16	121.9193	C4-C12-N13	119.7513
		C2-N15-C19	120.2658		
N10, C12, P25	106.4344	N15-C16-P22	118.1096	O16-P15-O18	113.8177
		N15-C19-P23	112.7085		
C12, P25, O26	117.5126	C19-P23-O33	114.3736	O17-P15-O16	111.352
C12, P25, O27	99.9958	C16-P22-O32	112.2428	P15-O17-C19	123.4856

En géométrie moléculaire, la longueur de liaison est la distance entre les noyaux de deux atomes liés par une liaison chimique, cette liaison est directement liée à l'ordre de liaison. Plus le nombre d'électrons participant à la formation d'une liaison est grand plus celle-ci sera courte, elle est inversement proportionnelle à l'énergie de liaison. Donc plus une liaison est forte plus elle est courte.

Il est à constater que :

- Les liaisons des deux esters (MTE) (C3-N101.3943Å) et (5MC) (C12-N13=1.384Å) ont presque les mêmes valeurs, alors que l'acide MTA a une liaison C-N plus longues. Ceci est dû à la nature électrodonneurs des groupements attachés à la fonction phosphonates des deux esters.

- Les liaisons C5-C44 (MTE), C1-C2 (5MC) et C4-C11 (MTA) ont la même valeur de longueur ( $1.5122\text{Å}$ ), donc la substitution par une fonction ester ou acide n'a aucune influence sur la géométrie du groupement méthyl attaché sur le cycle aromatique.
- Les liaisons C12-P25 ( $1.8547\text{Å}$ ) et P25=O26 ( $1.4872\text{Å}$ ) de MTE sont plus longues que celles de MTA.
- Les longueurs de liaison P-O dans les deux composés sont similaires.
- Tous les angles C-C-C et C-C-H sont égaux aux  $\approx 120^\circ$ . Le cycle benzénique est un hexagone régulier plan, les six atomes d'hydrogène appartiennent également au plan du cycle.
- L'angle  $\angle_{\text{MTA}}$  (C2-N15-C16)  $121.9193^\circ < \angle_{\text{AMET}}$  (C3-N10-C12)  $123.8556^\circ$ , cela à cause de la présence de plus d'atomes d'oxygènes qui sont plus électronégatifs.

#### III. 2.2. Analyse des charges Mulliken

Une charge partielle est une charge électrique inférieure en valeur absolue à la charge élémentaire (c'est-à-dire inférieure à la charge de l'électron). Elle est souvent notée  $\delta^-$  lorsqu'elle est négative et  $\delta^+$  lorsqu'elle est positive. Elle s'exprime en coulombs ou en fraction de charge élémentaire. Les charges partielles sont utilisées en mécanique moléculaire des champs de force, pour calculer l'énergie d'interaction donnée par la loi de Coulomb. Les charges partielles permettent également une compréhension qualitative des structures et de la réactivité des molécules.

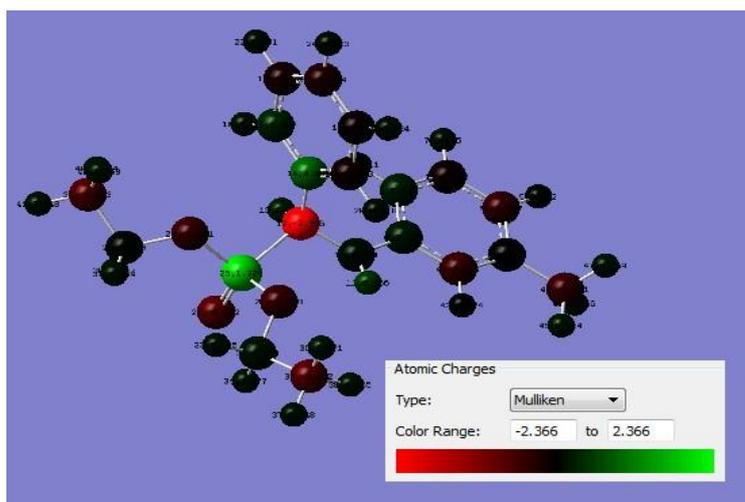


Figure. III.12. Distribution des charges mulliken sur MTE.

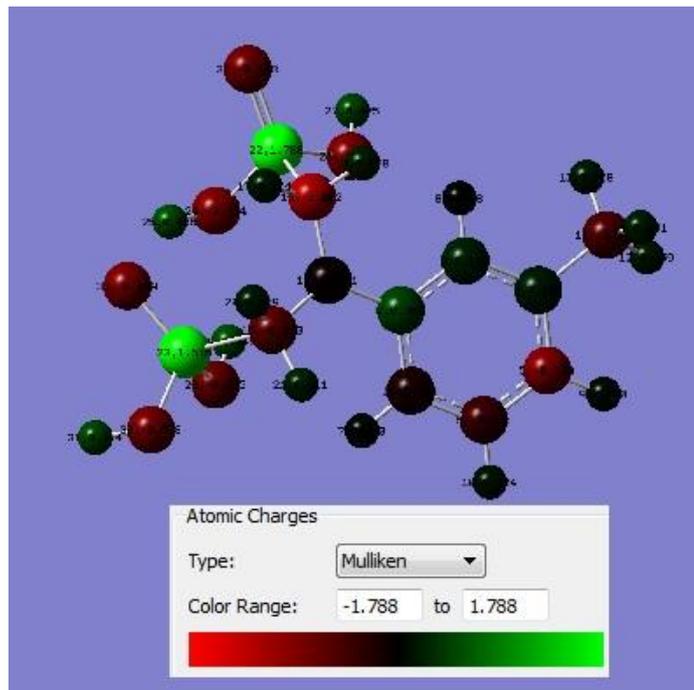


Figure. III.13. Distribution des charges mulliken sur MTA.

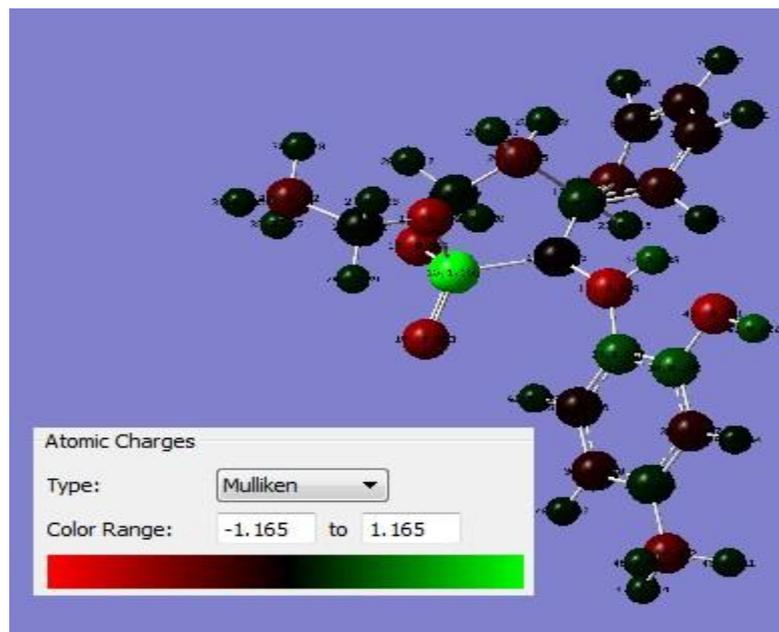


Figure. III.14. Distribution des charges mulliken sur 5MC.

La distribution des charges nettes sur les atomes des molécules obtenues est donnée dans le tableau **Tableau III.10**. Les calculs ont été effectués en utilisant l'analyse de population de Mulliken. Ces charges atomiques Mulliken calculées par la méthode DFT/B3LYP/(d,p).

### Chapitre 3: Résultats et discussions

**Tableau III.10.** Distribution des charges Mulliken sur les atomes de MTA, MTE et 5MC.

MTA		MTE		5MC	
Atome	Charge	Atome	Charge	Atome	Charge
C1	-0.144079	C1	0.665643	C1	-0.098517
C2	0.389249	C2	-0.632028	C2	-0.092395
C3	0.197240	C3	-0.804281	C3	-0.171718
C4	0.159645	C4	0.240713	C4	0.130216
C5	-0.749611	C5	0.617488	C5	-0.239749
C6	-0.334726	C6	-0.622222	C6	-0.063705
C11	-0.448954	N10	-0.211334	H10	0.101701
N15	-0.051034	H11	0.398027	C12	-0.025089
C16	-1.001529	C12	-2.213893	N13	-0.628669
C19	-0.543368	C14	-0.032295	P15	1.165481
H21	0.211309	C15	0.210053	O16	-0.563443
P22	1.788345	C16	0.405679	O17	-0.548902
P23	1.616025	C17	-0.277513	O18	-0.563623
O24	-0.753508	C19	0.019498	C19	0.067132
O26	-0.711303	C21	-0.195225	H21	0.120397
O28	-0.605103	P25	2.089910	C22	-0.304896
O32	-0.643444	O26	-0.690919	C26	0.042005
O33	-0.698510	O27	-0.421862	C29	-0.332497
		O28	-0.441008	C33	-0.167055
		C29	0.096247	C34	0.123686
		C32	0.149880	C35	-0.148082
		C35	-0.721236	C36	-0.075658
				C37	0.287027
				C38	0.298111
				O42	-0.591373
				C44	-0.382048
				C45	0.111374
				C46	0.124156
				C47	0.113921

Les charges Mulliken ont un rôle important dans l'application de calcul chimique quantique au système moléculaire en raison que ces charges atomiques affectent le moment dipolaire, la polarisabilité moléculaire, la structure électronique, et beaucoup de propriétés des systèmes moléculaires. La répartition de charge, au cours des atomes suggère la formation de donneur et accepteur impliquant le transfert de charge dans la molécule et dans une réaction chimique. D'après la distribution des charges Mulliken, On observe que :

- ✓ Les atomes P22, P23, P25, P15 et les H sont toutes positives.
- ✓ Tous les atomes d'azote et oxygène sont négatifs dans les trois molécules et constituent des sites fortement nucléophiles.

#### III.2.3. Moments dipolaires

La DFT a été utilisé également pour calculer le moment dipolaire. Le moment dipolaire est une grandeur vectorielle orienté du pôle négatif vers le pôle positif. Le moment dipolaire dans une molécule est une 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 Vander Waals, etc., Plus le moment dipolaire est important, plus les interactions intermoléculaires seront fortes. La polarité d'une liaison ou d'une molécule est due à la différence d'électronégativité entre les éléments chimiques qui la composent, Plus les charges sont réparties de façon asymétrique, plus une liaison ou molécule sera polaire, et au contraire, si les charges sont réparties de façon totalement symétrique, elle sera apolaire, c'est-à-dire non polaire. La polarité d'une molécule influe sur ses propriétés physiques ou chimiques. Les composés apolaires se dissolvent en général mal dans les solvants polaires (en particulier les hydrocarbures), ne se dissolvent pas en général dans l'eau contrairement aux composés polaires. Le moment total de dipôle dans un repère cartésien est défini par:

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

### Chapitre 3: Résultats et discussions

La figure ci-dessous représente les vecteurs et les magnitudes du moment dipolaire des trois molécules.

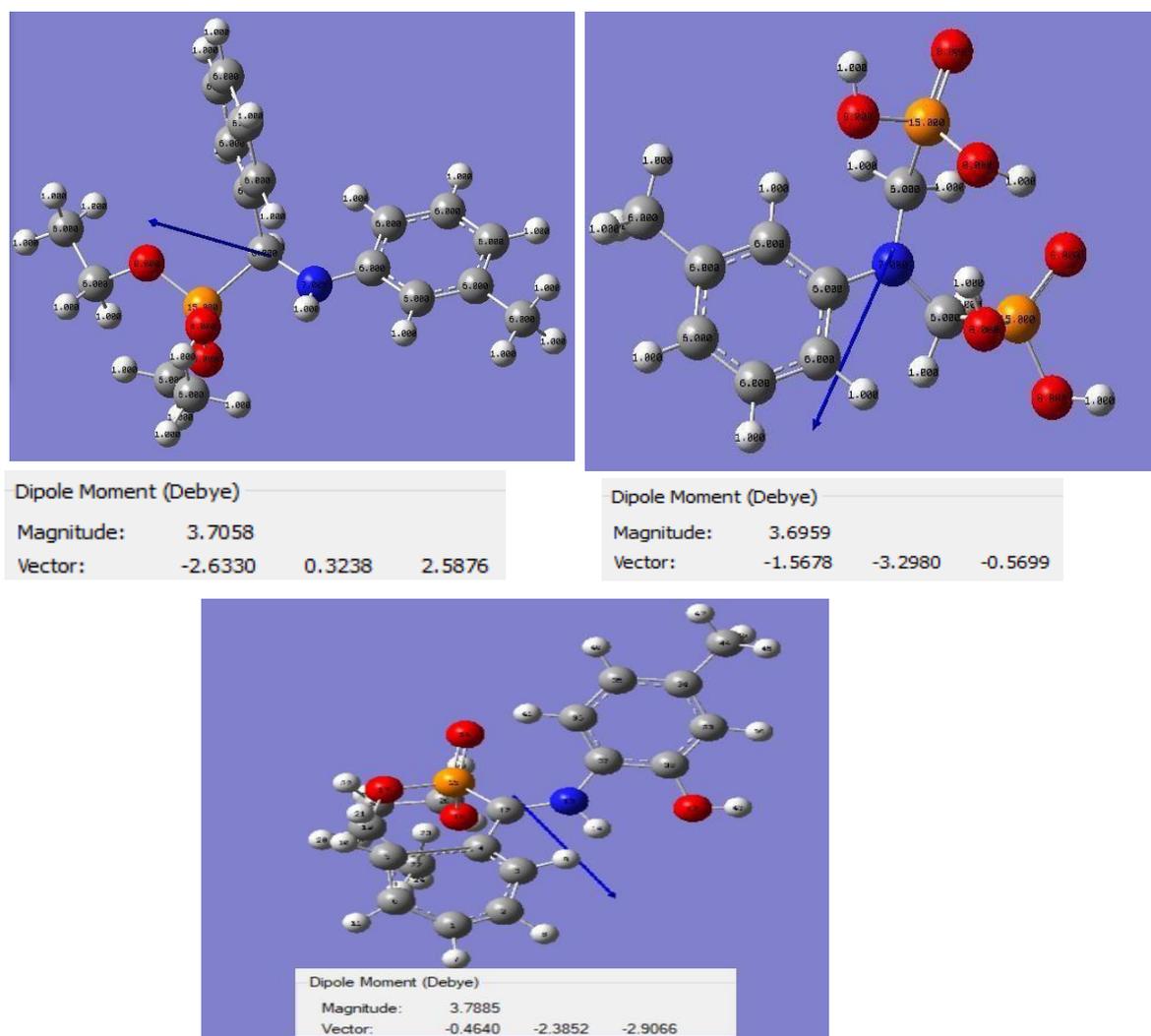


Figure. III.15. Orientation et intensité du moment dipolaire de MTE, MTA et 5MC.

**Tableau III.11.** Moments dipolaires électriques calculés par B3LYP/6-31G (d,p) des molécules MTA , MTE et 5MC.

Paramètres	MTA	MTE	5MC
$\mu_x$	-1.5678	-2.6330	-0.4640
$\mu_y$	-3.2980	0.3238	-2.3852
$\mu_z$	-0.5699	2.5876	-2.9066
$\mu_{total}$	3.6959	3.7058	3.7885

A partir de ce tableau, on observe que :

- ✓ Le moment dipolaire est plus important dans les trois molécules ce qui est expliqué par la différence d'électronégativité provoquée par les atomes d'oxygènes, d'azotes et des atomes de phosphore.
- ✓ La valeur la plus élevée des moments est principalement attribuée à un déséquilibre global de la charge d'un côté d'une molécule à l'autre.
- ✓ La valeur du moment dipolaire la plus élevée est celle de la molécule MTE.

#### III.2.4. Analyse des orbitales moléculaires

Les valeurs des énergies des orbitales HOMO, LUMO et l'écart énergétique ( $\Delta E = E_{HOMO} - E_{LUMO}$ ) du (MTA, MTE et 5MC) ont été calculés par la DFT avec la base 6-31G (d, p). Les représentations des orbitales moléculaires frontières pour les structures optimisées sont illustrées respectivement dans les **Figures (III.16-III.17- III.18)**, les régions vertes et rouges des figures représentent les OM avec des phases totalement opposées. La phase positive de la molécule est représentée en couleur rouge et la phase négative en couleur verte.

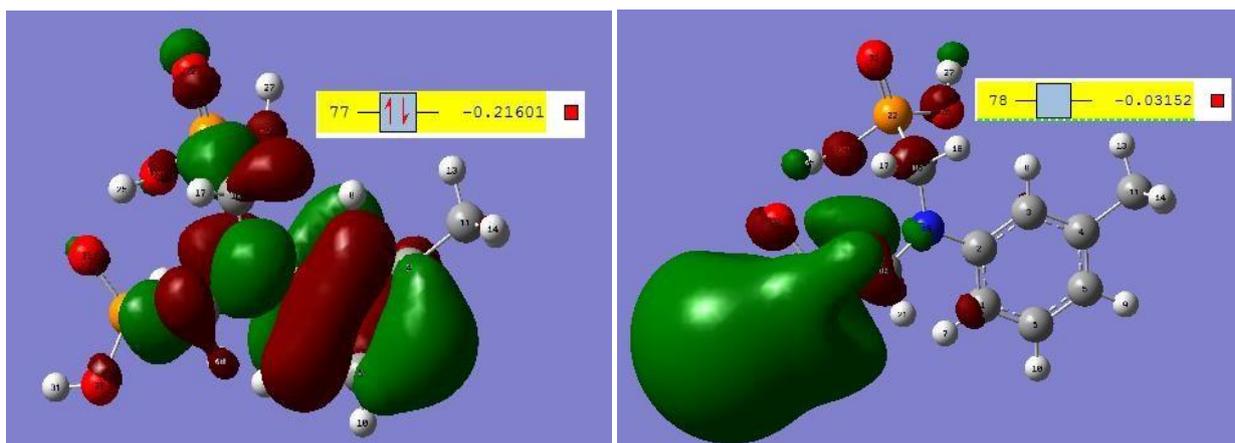


Figure.III.16. Les orbitales moléculaires HOMO-LUMO de MTA.

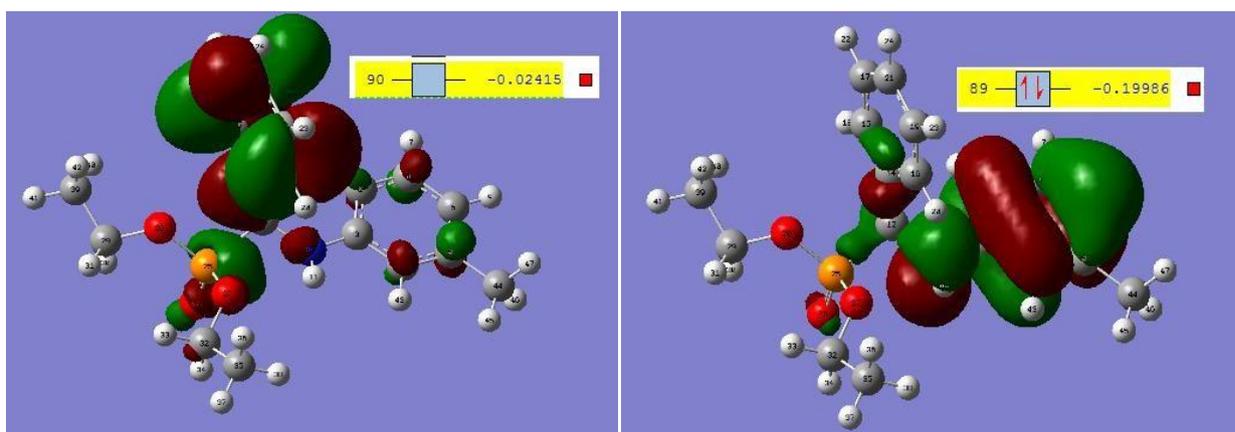
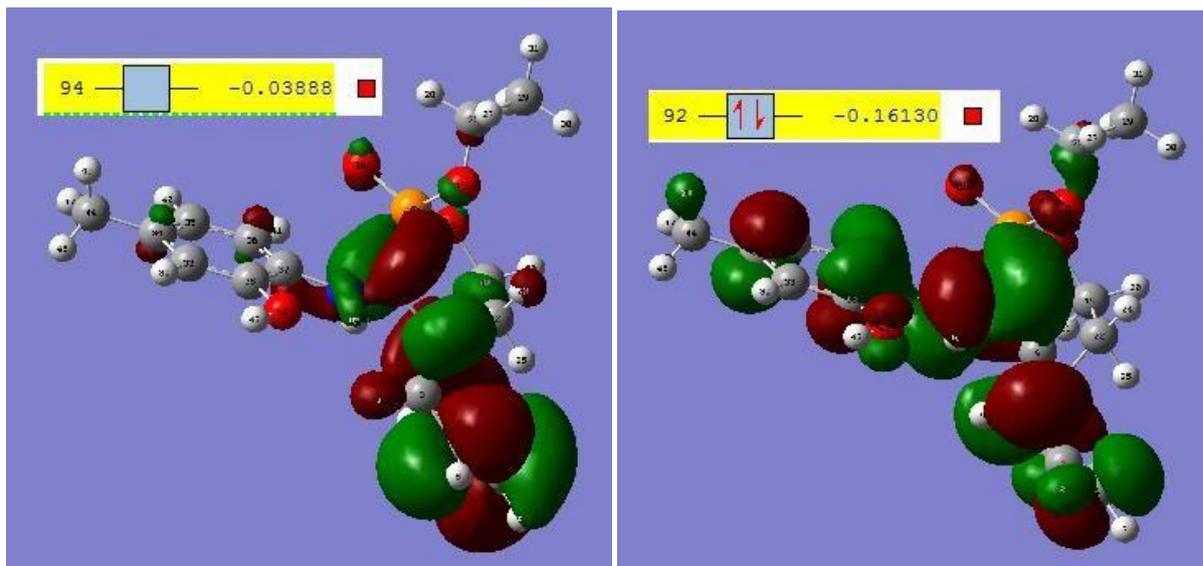


Figure.III.17. Les orbitales moléculaires HOMO-LUMO de MTE.



**Figure .III.18.** Les orbitales moléculaires HOMO-LUMO de 5MC.

Le **Tableau III.12** Présente les valeurs d'énergies HOMO, LUMO, écarts énergétiques (HOMO-LUMO) et les indices de réactivité de toutes les molécules.

**Tableau III.12.** Energies de HOMO, LUMO, écarts énergétiques (HOMO/LUMO) et Indices de réactivité des molécules MTA, MTE et 5MC.

Energie moléculaire	MTA	MTE	5MC
$E_{LUMO}$ (eV)	-0.03152	-0.02415	-0.03888
$E_{HOMO}$ (eV)	-0.21601	-0.19986	-0.1613
Ecart Energétique ( $\Delta E$ )	0.18449	0.17571	0.12242
Potentiel d'Ionisation (I)	0.21601	0.19986	0.1613
Affinité Electronique (A)	0.03152	0.02415	0.03888
Dureté globale ( $\eta$ )	0.092245	0.087855	0.06121
Douceur global (S)	5.420348	5.69119	8.168599902
Potentiel Chimique ( $\mu$ )	-0.123765	-0.11201	-0.10009
Electronégativité ( $\chi$ )	0.123765	0.11201	0.0818331
Electrophilicité ( $\omega$ )	0.08303	0.071403	0.10009

### III.2.5. Comparaison entre les indices de réactivité de chaque molécule

#### ➤ Les énergies HOMO-LUMO

Les orbitales moléculaires (HOMO et LUMO) sont des termes très importants dans la chimie quantique. Une valeur élevée de l'énergie HOMO indique que la molécule est réactive, tandis qu'une valeur basse de l'énergie LUMO indique que la molécule est moins réactive.

On remarque que:

- ✓ La molécule 5MC a une énergie HOMO plus importante ( $E_{HOMO} = -0.1613 \text{ eV}$ ), donc elle est plus réactive que MTA et MTE.
- ✓ La molécule MTA a une énergie LUMO plus basse que celle des esters, donc elle est moins réactive que MTE et 5MC et donc plus stable.
- ✓ La différence d'énergie entre l'orbitale HOMO et LUMO s'appelle l'écart d'énergie, qui est un indice de stabilité important pour les structures. 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'une HOMO.

### Chapitre 3: Résultats et discussions

Il est constaté que l'énergie gap ( $\Delta E$ ) la plus grande est présentée par la molécule MTA avec une valeur de 0.18449au, donc elle est plus stable et moins réactive que MTE et 5MC.

$\Delta E$  la plus petite est présentée par la molécule 5MC avec une valeur de 0.12242au, donc elle est moins stable et plus réactive. L'ordre de réactivité des molécules est le suivant :



#### ➤ Potentiel d'ionisation ( $I$ )

Plus le potentiel d'ionisation est élevé, plus la molécule est dure, donc stable et moins réactive. La molécule qui nécessite une grande énergie pour être ionisée est MTA avec une énergie de 0.21601au, et la molécule qui donne les électrons facilement (plus réactive) est 5MC avec une valeur de 0.1613au. L'ordre décroissant des potentiels d'ionisation des molécules est le suivant :



#### ➤ L'affinité électronique ( $A$ )

La molécule qui présente plus d'affinité pour accepter des électrons est 5MC avec une valeur de 0.03888au.

L'ordre décroissant d'affinité électronique est :



#### ➤ La dureté ( $\eta$ )

La dureté chimique peut être vue comme la résistance d'un système moléculaire au transfert d'électron, Compte-tenu du lien qui existe entre dureté chimique et mollesse globale, plus la mollesse globale d'un système moléculaire est élevée, moins il résiste à un transfert d'électrons, et donc moins il est stable.

On observe que la molécule la plus résistante au transfert d'électrons est MTA avec une valeur de 0.092245au. Donc elle est la plus stable et la molécule la plus molle est 5MC, donc elle est la plus réactive. L'ordre décroissant de la dureté des molécules est :



#### ➤ Potentiel chimique ( $\mu$ )

Un bon électrophile est associé à un potentiel chimique très bas (électronégativité

### *Chapitre 3: Résultats et discussions*

---

élevée). A partir des résultats obtenus, la molécule qui a le potentiel le plus bas est MTA avec un potentiel de (-0.123765au), donc elle est plus électrophile que MTE et 5MC. L'ordre décroissant du potentiel chimique des molécules est :



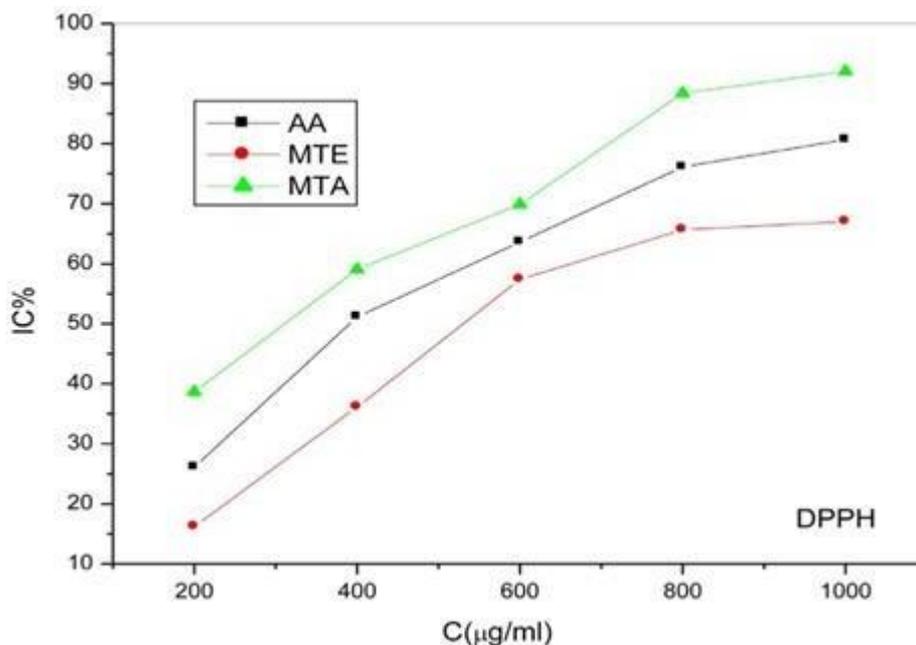
### III.3. Evaluation des activités biologiques

#### III.3.1. Activité antioxydante

Six méthodes ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des produits synthétisés à partir de la m-toluidine (MTA et MTE), et du 2- amino-5-méthylphénol (5MC).

##### III.3.1. 1. Activité de piégeage des radicaux libres DPPH

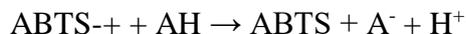
Les effets inhibiteurs du MTA, MTE et de l'acide ascorbique (AA) sur le radical DPPH ont été présentés dans le **Tableau III.13** et la **Figure .III.19**. Selon la **Figure .III.19**, tous les composés montrent une activité de piégeage dose-dépendante sur le radical DPPH. Nous avons ensuite déterminé les valeurs  $IC_{50}$  (**Tableau III.13**). Les MTA, AA et MTE ont des valeurs d' $IC_{50}$  de 311,853  $\mu\text{g/mL}$ , 457,66  $\mu\text{g/mL}$  et 621,627  $\mu\text{g/mL}$ , respectivement. La décoloration de la solution des radicaux DPPH violets au jaune peut être attribuée à un don d'hydrogène provenant des (O-H) des groupes phosphoniques (MTA) et carboxyliques (AA).



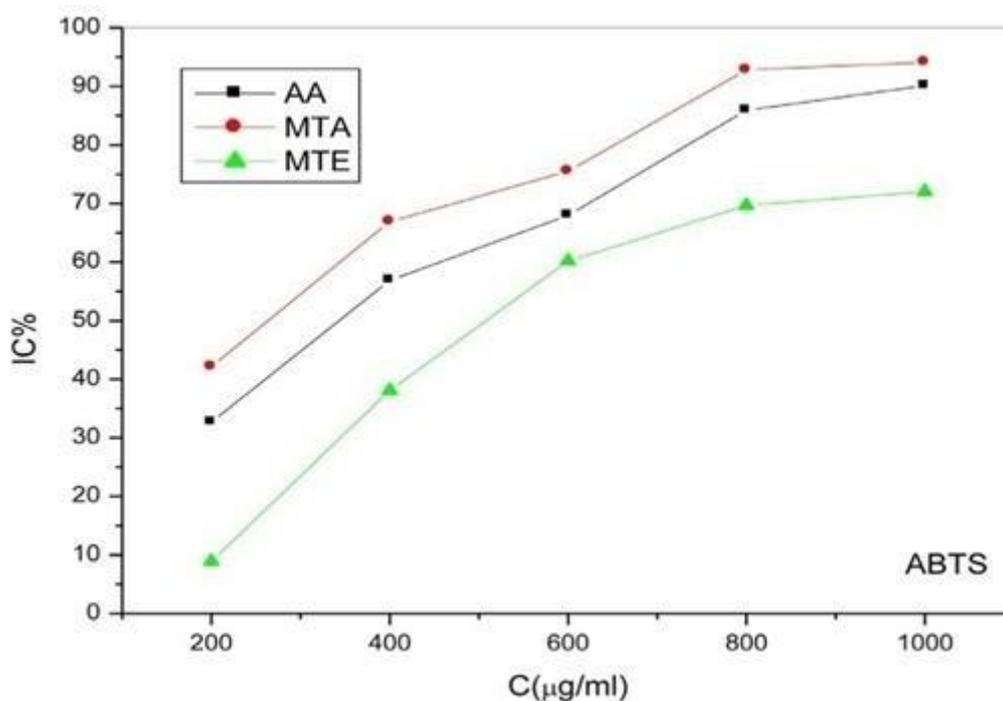
**Figure III.19.** Evolution du pourcentage d'inhibition (%) du MTE, MTA et de l'acide ascorbique par le test DPPH.

III.3.1. 2. Activité du piégeage de l'ABTS

Le test ABTS a presque le même principe que le test DPPH, mais l'ABTS<sup>+</sup> est plus réactif que le DPPH<sup>•</sup>. L'antioxydant réduit l'ABTS<sup>+</sup> en ABTS selon la réaction suivante :



Les résultats du test ABTS sont présentés dans le **Tableau III.13** et la **Figure .III.19**. Il est observé que les valeurs IC<sub>50</sub> des composés synthétisés diminuent dans l'ordre suivant : MTE>AA>MTA. Nous savons que plus petite est la valeur IC<sub>50</sub>, plus grande est l'activité antioxydante du composé. Ainsi, l'ordre de l'activité antioxydante est MTA>AA>MTE. A partir du calcul des valeurs IC<sub>50</sub>, nous pouvons conclure que MTA a la meilleure activité antioxydante par rapport à MTE. Comme pour l'essai DPPH, le composé MTA a la valeur IC<sub>50</sub> la plus basse et donc l'activité antioxydante la plus élevée, suivie par le composé MTE.



**Figure .III.20.** Evolution du pourcentage d'inhibition (%) du MTE, MTA et de l'acide ascorbique par le test ABTS.

**Tableau III.13.** Pourcentage d'inhibition et valeurs IC<sub>50</sub> de MTA, MTE et acide ascorbique par l'essai ABTS et l'essai DPPH.

Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Ascorbic Acid	MTE		MTA		
	IC%ABTS assay	IC%DPPH Assay	IC%ABTS assay	IC%DPPH assay	IC%ABTS assay	IC%DPPH Assay
200	32.67	26.136	28.91	16.250	42.12	38.636
400	56.87	51.136	38.09	36.136	66.87	59.090
600	67.98	63.636	60.16	57.386	75.54	69.886
800	85.90	76.136	69.67	65.681	92.81	88.409
1000	90.13	87.50	72.02	67.045	94.11	92.045
IC <sub>50</sub>	367.861±0.36 (R <sup>2</sup> =0.97632)	457.661±0.25 (R <sup>2</sup> =0.9663)	535.993±0.30 (R <sup>2</sup> =0,96,487)	621.627 ± 0.12 (R <sup>2</sup> =0.94861)	226,077±0.29 (R <sup>2</sup> =0,96,109)	311.853 ± 0.14 (R <sup>2</sup> =0.98073)

En ce qui concerne le Produit 5MC, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau suivant (Tableau III.14).

**Tableau III.14.** Valeurs IC<sub>50</sub>, A<sub>0.50</sub> de 5MC par les différents essais de l'activité anti-oxydante.

	DPPH <sup>•</sup> Assay	ABTS <sup>•+</sup> Assay	$\beta$ -Carotene Assay	CUPRAC Assay	Phenanthroline Assay	FRAP Assay
Test sample	IC <sub>50</sub> $\mu\text{g}/\text{mL}$	IC <sub>50</sub> $\mu\text{g}/\text{mL}$	IC <sub>50</sub> $\mu\text{g}/\text{mL}$	A <sub>0.50</sub> $\mu\text{g}/\text{mL}$	A <sub>0.50</sub> $\mu\text{g}/\text{mL}$	A <sub>0.50</sub> $\mu\text{g}/\text{mL}$
5MC	19,94±0,24	NA	61,55±2,33	12,74±0,66	6,45±0,81	20,55±2,35
BHA	5.73 ± 0.41	<b>1.03 ± 0.00</b>	1.05±0.01	3.64 ± 0.19	0.93 ± 0.07	NT
BHT	NT	<b>1.59 ± 0.03</b>	0.90±0.02	9.62 ± 0.87	2.24 ± 0.17	NT
$\alpha$ -Tocopherol	NT	NT	NT	NT	NT	34.93 ± 2.38

A<sub>0.50</sub> : la concentration à l'absorbance 0,5.

Pour les tests : DPPH, CUPRAC, Phenanthroline et FRAP, le produit 5MC présente respectivement les valeurs : IC<sub>50</sub> = 19,94±0,24 $\mu\text{g}/\text{mL}$  , IC<sub>50</sub> = 12,74±0,66  $\mu\text{g}/\text{mL}$  et A<sub>0.50</sub>= 6,45±0,81 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , A<sub>0.50</sub> = 20,55±2,35/ $\text{mL}$  donc une activité anti-oxydante importante en comparaison avec les standards mentionnés dans le tableau.. Contrairement au test de la  $\beta$ -Carotène, pour lequel le produit 5MC a la valeur : A<sub>0.50</sub>= 61.55±2.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$  et donc une activité modérée. Le produit 5MC n'a pas d'activité par le test ABTS.

### III.3.2. Activités antimicrobienne et antifongique

Les zones d'inhibition antibactériennes et antifongiques (mm) des composés testés sont indiquées dans les tableaux **III.15** et **III.16**, respectivement. Les résultats de l'activité antibactérienne sont donnés dans le **Tableau III.15**. Les résultats montrent que toutes les bactéries ont été inhibées par les composés synthétisés. Le MTE s'est avéré très actif sur les espèces bactériennes de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* et *B. cereus*. Cependant, le MTA a une activité modérée dans les mêmes espèces. On a observé que le MTE était plus actif contre les souches à Gram négatif que celles à Gram positif.

Encore une fois, la comparaison des résultats ci-dessous avec les normes antibactériennes de l'ampicilline démontre que *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* et *B. cereus* sont très actifs.

**Tableau III.15.** Activité antibactérienne du MTA et du MTE.

Sample	Zone of inhibition (mm)											
	Bacterial strains											
	S. aureus			P. aeruginosa			E. coli			B. cereu		
Conc.	100	500	1000	100	500	1000	100	500	1000	100	500	1000
MTA	11.12±0.7	14.0 ± 0.7	18.6 ± 0.2	11.1 ± 0.5	10.0 ± 0.7	15.5 ± 2.1	NIL	08.17±0.5	10.0 ± 0.7	NIL	10.0 ± 0.7	NIL
MTE	15.4 ± 0.4	18.1 ± 0.9	25.5 ± 1.1	15.4 ± 0.4	17.8 ± 0.6	17.5 ± 1.1	12.6 ± 0.4	17.1 ± 0.9	27.5 ± 1.1	12.4 ± 0.4	18.1 ± 0.9	22.5 ± 1.1
Ampc.	28.5 ± 1.1	33.2 ± 1.0	39.3 ± 1.3	25.5 ± 1.1	29.2 ± 1.0	36.7 ± 1.3	16.9 ± 1.1	25.2 ± 1.0	33.3 ± 1.3	13.5 ± 1.1	23.2 ± 1.0	31.3 ± 1.3

### Chapitre 3: Résultats et discussions

La méthode de diffusion sur disque a été utilisée pour vérifier la sensibilité des souches isolées (*C. albicans*, *C. tropicalis* et *A. niger*) à différents agents anti-fongiques. A faible dose, toutes ces souches étaient presque insensibles, mais à des doses plus élevées, les composants ont montré une activité modérée à élevée, alors que le MTE avec *C. tropicalis* montre une activité élevée suivie par *C. albicans* et *A. niger* (**Tableau III.16**). MTE possède une activité plus élevée dans l'espèce *C. albicans*. Les valeurs des zones d'inhibition du MTA et du MTE sont plus petites que celles de la nystatine. Les résultats sur le standard antifongique nystatine indiquent que *C. albicans* est plus actif que *A. niger* et *C. tropicalis*.

**Tableau III.16.** Zone d'inhibition en (mm) formée sur les différents champignons par le MTA et le MTE.

Sample	Zone of inhibition (mm) Fungal strains								
	Candida albicans			Candida tropicalis			Niger		
Conc.(µg/mL)	200	500	1000	200	500	1000	200	500	1000
MTA	8.12±0.7	11.0 ± 0.7	14.6 ± 0.2	7.1 ± 0.5	10.0 ± 0.7	41.3 ± 1.3	NIL	10.0 ± 0.7	12.1 ± 0.9
MTE	15.4 ± 0.4	18.1 ± 0.9	25.5 ± 1.1	9.1 ± 0.5	12.1 ± 0.9	15.4 ± 0.4	10.4 ± 0.4	13.1 ± 0.9	17.5 ± 1.1
Nystatine	22.5 ± 1.1	31.2 ± 1.0	40.3 ± 1.3	23.5 ± 1.1	35.2 ± 1.0	42.5 ± 1.1	32.5 ± 1.1	39.2 ± 1.0	41.3 ± 1.3

### Chapitre 3: Résultats et discussions

---

D'après le **Tableau III.17**, il est clair que le composé MTE a montré la plus grande lipophilie que les autres molécules. Pour l'activité antibactérienne, la comparaison de la lipophilie a révélé l'ordre : MTE> Ampicilline>MTA et l'activité antifongique montre l'ordre MTE>Nystatine>MTA. On peut conclure à une forte influence du coefficient de partage, log P, pour l'activité antimicrobienne. Cette évidence a été clairement décrite dans la théorie des lipides avancée par Meyer et Overton. Selon cette théorie, le log P est une mesure de l'hydrophobie, qui est importante non seulement pour la pénétration et la distribution d'un médicament, mais aussi pour l'interaction du médicament avec les récepteurs. On peut donc suggérer que les propriétés lipophiles doivent être vérifiées lors de la conception d'agents antibactériens puissants, car elles sont des facteurs décisifs pour leur activité.

**Tableau III.17.** Coefficients de partage calculés (log P) des molécules MTA, MTE, Ampicilline et Nystatin.

<b>Composés</b>	<b>LogP</b>
<b>MTA</b>	-0.54
<b>MTE</b>	1.58
<b>Ampicilline</b>	1.35
<b>Nystatine</b>	0.52

Le produit 5MC n'a pas montré d'activité antibactérienne ou antifongique.

### III.3.3. Activité enzymatique (Etude de l'acétylcholine/ butyrylcholine esterase) et l'activité antidiabétique)

Afin de déterminer l'intérêt potentiel des MTA et MTE synthétisés, le pouvoir inhibiteur de l'acétylcholinestérase AChE et de la butyrylcholinestérase BuChE a été évalué selon une méthode d'Ellman modifiée. Tous les composés obtenus ont été testés à une concentration de  $10^{-3}$  M et les résultats d'inhibition de l'AChE/BuChE sont présentés dans le **Tableau III.18**. Comme le montre le **Tableau III.18**, les composés synthétisés ont donné une activité d'inhibition enzymatique modérée à bonne en les comparant avec le standard Galantamine. Le MTE, avec des valeurs d'inhibition de  $92,70 \pm 0,9\%$  et  $79,16 \pm 0,4\%$ , a montré les meilleures activités anti-AChE et anti-BuChE parmi les composés testés. Le MTA a également montré une forte activité d'inhibition des enzymes AChE et BuChE ( $67,3 \pm 0,5\%$  et  $34,8 \pm 0,7\%$  d'inhibition). Nous pouvons dire que le MTE a montré une meilleure activité que le MTA en regardant le **Tableau III.18**.

**Tableau III.18.** Inhibitions des enzymes AChE et BuChE par MTA et MTE synthétisés.

Échantillon	AChE% Inhibition	BuChE% Inhibition
MTA	$67.32 \pm 0.52$	$34.80 \pm 0.76$
MTE	$92.71 \pm 0.91$	$79.16 \pm 0.47$
Galantamine	$83.09 \pm 0.80$	$75.77 \pm 0.98$

Par contre ces produits préparés à base de m-toluidine ( MTA et MTE ) n'ont pas montré d'activité antidiabétique ( comme inhibiteur de la  $\alpha$ -glucosidase et l' $\alpha$ -Amylase ).

Concernant le produit 5MC, les résultats des tests de l'activité enzymatique sont représentés dans le tableau ci-dessous (**Tableau III.19**).

**Tableau III.19.** Inhibitions des enzymes AChE,  $\alpha$ -Glucosidase et  $\alpha$ -Amylase par le produit 5MC

	AChE Assay		$\alpha$ -Glucosidase inhibitory assay		$\alpha$ -Amylase Inhibitory Assay	
	Inhibition (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)	Inhibition (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)	Inhibition (%)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)
<b>5MC</b>	-	NA	<b>84,11±1,40</b>	<b>7,43±0,11</b>	<b>35,13±1,69</b>	<b>&gt;200</b>
<b>Galantamine</b>	<b>83.43 ± 0.67</b>	<b>5.50 ± 0.18</b>	NT	NT	NT	NT
<b>Acarbose</b>	NT	NT	NT	NT	<b>37.21 ± 3.54</b>	<b>365.93 ± 10.70</b>
<b>Quersetine</b>	NT	NT	<b>95,98±0,59</b>	<b>4,26±0,24</b>	NT	NT

- : Pas d'inhibition / NA: Pas d'activité / NT: non testé

D'après le **Tableau III.19**, pas d'inhibition de l'enzyme AChE par le produit 5MC et donc pas d'activité, par contre le produit 5MC présente une bonne inhibition des enzymes  $\alpha$ -Glucosidase et  $\alpha$ -Amylase : 84,11±1,40 % et 35,13±1,69 % et donc une bonne activité antidiabétique par rapport aux standards Acarbose et Quersetine.

#### Références :

- [1] Moedritzer, K.; Irani, R. R. *J. Org. Chem.* 1966, 31, 1603–1607.
- [2] Iveson, P. B.; Lowe, M. P.; Lockhart, J. C. *Polyhedron* 1993, 12, 2313–2323.
- [3] Villemin, D.; Didi, M. A. Amino methylene phosphonic Acids Syntheses and Applications (A Review). *Orient. J. Chem.* **2015**, 31, 112.
- [4] Justyna, K.; Małolepsza, J.; Kusy, D.; Maniukiewicz, W.; Błażewska, K. M. The McKenna reaction—Avoid inside reaction in phosphonate deprotection. *Beilstein J. Org. Chem.* **2020**, 16, 1436–1446.
- [5] Cherkasov, R. A.; Galkin, V. I. The Kabachnik–Fields reaction: Synthetic potential and the problem of the mechanism. *Russ. Chem. Rev.* **1998**, 67, 857–882.
- [6] Fields, E. K. The synthesis of esters of substituted aminophosphonic acids. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 1528–1531.
- [7] Zefirov, N. S.; Matveeva, E. A. Catalytic Kabachnik–Fields reaction: New horizons for old reaction. *Arkivoc* **2008**, 1, 1–17.
- [8] Chandrasekhar, S. ; Narsihmulu, C. ; Shameem Sultana, S. ; Saritha, B. ; Jaya Prakash, S. *Synlett* 2003, 505 ;
- [9] Fields, E. K. *J. Am. Chem. Soc.* 1952, 74, 1528 ; Lukszo, J. ; Tyka, R. *Synthesis* 1977, 239.
- [10] Cherkasov, R. A. ; Galkin, V. I. *Russ. Chem. Rev.* 1998, 67, 857 ; Gancarz, R. *Tetrahedron* 1995, 51, 10627 ; Dimukhametov, M. N. ; Bayandina, E. V. ; Davydova, E. Y. ; Gubaidullin, A. T. ; Alfonsov, V. A. *Mend*
- [11] Keglevich E. G. Bálint, *Molecules*, 2012, 17, 12821.
- [12] Matveeva. E. D. N. S. Zefirov, *Dokl. Chem.*, 2008, 420, 137.
- [13] Kafarski. P. M. G. Górniak, I. Andrasiak, *Curr. Green Chem.*, 2015, 5, 218.

*Conclusion générale et  
perspectives*

Compte tenu de l'importance du motif phosphonate sur le plan pharmacologique, et dans le but de procéder à la synthèse de nouvelles molécules biologiquement actives, une synthèse de trois dérivés d' $\alpha$ -aminophosphonates a été mise au point : deux esters  $\alpha$ -aminophosphonates et un acide  $\alpha$ -aminophosphonique. Les deux premiers dérivés (à partir de la m-Toluidine) ont été synthétisés par deux méthodes de synthèse : une méthode classique à reflux et une autre sous micro-ondes dans le but de choisir la bonne méthode en termes de rendement et de temps de réaction par une étude comparative. Nous poursuivrons ainsi la synthèse d'un autre ester phosphonique.

Les dérivés ont été synthétisés dans une première étape selon la réaction d'Irani-Moedritzer et la réaction de Kabachnik-Fields à partir de la m-Toluidine et le 2-amino-5-methylphenol comme réactifs de départ, et sont obtenus avec de bons rendements sous micro-ondes ( $R_{MTA}=87\%$ ,  $R_{MTE}=83\%$ ,  $R_{5MC}=81\%$ ) en un temps relativement court. La pureté de ces produits a été vérifiée par CCM, chaque produit étant caractérisé par son propre rapport frontal ( $R_{fMTA}=0.625$ ,  $R_{fMTE}=0.385$ ,  $R_{f5MC}=0.428$ ).

L'acide  $\alpha$ -aminophosphonique et les esters  $\alpha$ -aminophosphonates synthétisés ont été caractérisés par les méthodes physico-chimiques usuelles, à savoir la détermination de certaines caractéristiques physiques telles que : les points de fusion, la solubilité. On a confirmé l'obtention des produits désirés par spectroscopie UV-Vis, Infra-rouge IR et par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire RMN. Les IR ont été utilisés pour voir s'il y a disparition des bandes caractéristiques des amines primaires (m-toluidine, aminophenol) et apparition de nouvelles fonctions sur les molécules synthétisées, autrement dit, pour identifier les principaux nouveaux groupes fonctionnels tels que (P-C, P=O, N-C...etc.). La RMN a été exploitée dans l'analyse qualitative, en comparant les spectres des produits de départ avec les spectres des produits synthétisés.

Dans un second temps, grâce au logiciel de calcul GAUSSIAN 09 et avec la fonction hybride B3LYP et la base 6-31G++ (d, p), une étude théorique a été effectuée dans le but de déterminer certaines propriétés structurales et énergétiques. Premièrement, nous avons commencé par l'optimisation des structures des molécules obtenues par synthèse dans le but d'obtenir la conformation la plus stable. Cette optimisation nous a permis de définir les paramètres géométriques de chaque molécule. Ensuite, une étude comparative entre les paramètres géométriques des molécules MTA et MTE a été réalisée et a facilement permis de constater que la nature des substituants exerce une influence considérable sur la géométrie d'une molécule.

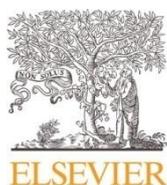
## *Conclusion générale et perspectives*

---

La molécule MTE a la plus haute énergie HOMO ( $E_{\text{HOMO}}=-0,19986\text{ua}$ ), elle est donc plus nucléophile que la molécule MTA ( $E_{\text{HOMO}}=-0,21601\text{ua}$ ). En conséquence, plus l' $E_{\text{HOMO}}$  d'une molécule est faible, plus il est facile pour elle d'accepter des électrons. La molécule MTA a une énergie LUMO plus faible avec une valeur de ( $E_{\text{LUMO}}=-0,03152\text{ ua}$ ), elle est donc plus électrophile que MTE. L'écart entre les niveaux d'énergie LUMO et HOMO des molécules est un autre indice important, de faibles valeurs de l'écart énergétique signifient une bonne réactivité.

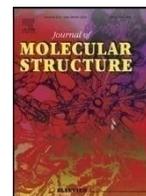
Les résultats obtenus indiquent que la molécule de MTE est plus réactive que celle de MTA avec une valeur de  $\Delta E=0.17571\text{a.u.}$  ce qui est confirmé par les valeurs de dureté chimique (le composé MTA est plus stable et plus dur que le MTE). Quant aux perspectives de ce travail, elles peuvent s'articuler autour des points suivants :

- Réaliser des analyses plus approfondies telles que: MS, DRX, AE...etc.
- Synthétiser à partir des produits obtenus des complexes, car ils sont considérés comme de bons ligands piègeurs de métaux.
- Synthétiser d'autres séries d'acides aminophosphoniques et d'esters  $\alpha$ -aminophosphonates à partir de dérivés de la m-toluidine et d'autres aminophénols.
- Des études de docking moléculaire sont souhaitables.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular Structure

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/molstr](http://www.elsevier.com/locate/molstr)

## Microwave-assisted synthesis, DFT theoretical study and biological activities evaluation of two phosphonylated m-toluidine derivatives

Ines Haddadi<sup>a,b,\*</sup>, Abdelkader Hellal<sup>a,b,\*</sup>, Imene Kirouani<sup>a,b</sup>, Houdheifa Layaida<sup>a,b</sup>,  
Chawki Bensouici<sup>c</sup>

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

<sup>b</sup> Département de chimie, Faculté des sciences, Université Ferhat Abbas-Sétif-1, Algeria

<sup>c</sup> Biotechnology Research Center, Ali Mendjli Nouvelle Ville UV03, Constantine, Algeria

### article info

#### Article history:

Received 12 October 2021

Revised 11 November 2021

Accepted 14 November 2021

#### Keywords:

A-aminophosphonate ester

A-aminophosphonic acid

Dft

Antioxidant

Antimicrobial

Anti-ache

Anti-buche

### abstract

An easy and efficient microwave-assisted method has been developed for the synthesis of two phosphonylated molecules: *O*-aminophosphonic acid (MTA) and *O*-aminophosphonate ester (MTE). To achieve these, we have synthesized the products from m-toluidine, under microwave conditions. All of the obtained compounds were characterized by Microanalysis, UV-Vis, FT-IR, and <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>31</sup>P NMR spectroscopic methods. The spectral results are in good line with the proposed structures. Density Functional theory (DFT) calculations were carried out using Gaussian09 program package, using 6-31G++(d,p) basis set. The frontier orbital energies were presented and have been used to predict global reactivity indices. Results showed that MTE is more reactive and less stable than MTA. The Mulliken atomic charges, dipole moment and thermodynamic proprieties were also calculated and discussed. In addition, the target compounds were evaluated for their in vitro antioxidant, antimicrobial and antienzymatic activities. The biological assays indicated that these compounds displayed potent inhibitory activity toward acetylcholinesterase (MTE: 92.71±0.91%, MTA: 67.32±0.52%) and butyrylcholinesterase (MTE: 79.16±0.47% and MTA 34.80±0.76%). It was also found that they act as excellent antiradical agents (ABTS: MTA/226.077±0.29 µg/ml, MTE/ 535,993±0.30 µg/ml and DPPH: MTA/311.853 ± 0.14 µg/ml, MTE/621.627 ± 0.12 µg/ml). In addition, these compounds exhibited the highest antibacterial and antifungal properties.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

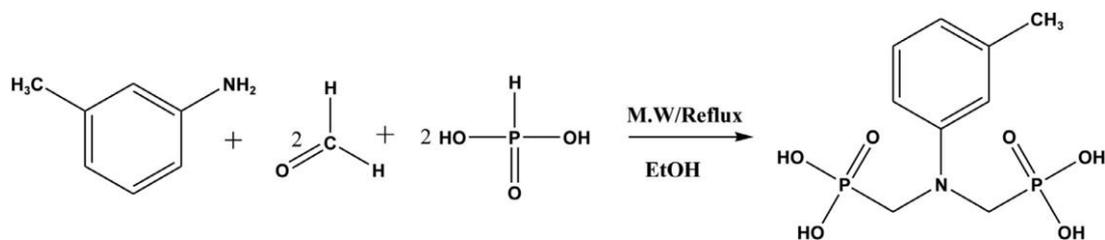
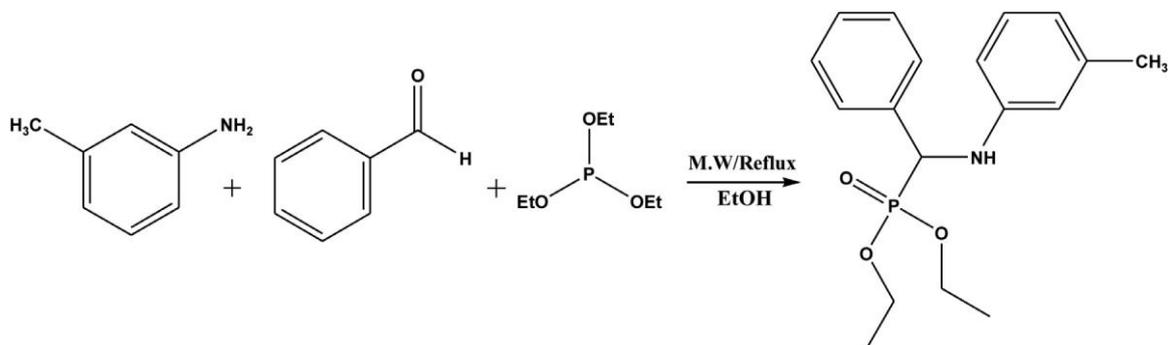
*O*-Aminophosphonate esters and *O*-aminophosphonic acids are an important class of biological active compounds, which have received considerable attentions [1–3]. These derivatives are considered to be phosphorus analogues of aminoacids [4]. They have attracted a lot of attention in medicinal chemistry because of their low toxicity and high biological activities. The phosphonic unit was established as a bio-isostere of carboxylic moiety. This characteristic explains the variety of biological activities [5]. They are important targets in the development of antioxidants, antibiotics, antiviral, antihypertensives, antitumor agents due to their inhibitory effect on GABA receptors, enzyme inhibitors and antimetabolites [6–18]. A large number of methods for the preparation of di-verse *O*-aminophosphonate esters and *O*-aminophosphonic acids

have been published since the first synthesis by Fields [19]. Among the versatile procedures, the Moedritzer-Irani reaction, which uses phosphorous acid, formaldehyde, and an amine to produce *O*-aminophosphonic acids [20]. The Moedritzer-Irani reaction has the advantage of leading directly to the free acids by not needing a tedious deprotection of aminophosphonates [21,22]. However, the most notable route of *O*-aminophosphonate esters synthesis is the Kabachnik-Fields reaction which was discovered in 1952 independently by Kabachnik and Fields [19,23]. This reaction is a one-pot three-component procedure using a carbonyl compound, an amine, and a dialkyl/trialkyl phosphite.

In light of the immense importance of these compounds and following with our previous works in the synthesis, theoretical studies and biological activities of aminophosphonates and in order to see the effects of phosphonic/phosphonate functions in the structural, electronic, thermodynamic proprieties and their biological activities, herein we report the synthesis of two phosphonylated compounds, according to Irani-Moedritzer reaction and Kabachnik-Fields reaction, by using conventional and microwave

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [ines.haddadi2121@yahoo.com](mailto:ines.haddadi2121@yahoo.com) (I. Haddadi), [abdelkader.hellal@univ-setif.dz](mailto:abdelkader.hellal@univ-setif.dz) (A. Hellal).

Scheme 1. Synthesis of the  $\alpha$ -aminophosphonic acid (MTA).Scheme 2. Synthesis of the  $\alpha$ -aminophosphonate ester (MTE).

assisted methods. In addition, to make a comparison between acid (MTA) and ester (MTE) structures, a complete theoretical study was performed utilizing DFT/B3LYP/6-31G++(d,p) method. Moreover, we aimed in this investigation to evaluate its *in vitro* inhibitory power towards the enzymes AChE and BuChE. The antimicrobial and antioxidant activities were also carried out.

## 2. Experimental details

### Material and methods

All the reagents and solvents were purchased from Merck and Sigma-Aldrich, and were used without any further purification. Melting points were recorded in the Kofler bank. The progressing of the reactions was carried out by Thin Layer Chromatography, performed on silica gel plates. The percentages of carbon, hydrogen and nitrogen were determined by Microanalyses (C, H and N) using Perkin Elmer 2400 CHN Elemental Analyzer. The UV-Vis spectra were recorded on the Jasco-630 type spectrometer in the wavelength range 200–800 nm. FTIR spectra were recorded on Shimadzu FTIR 8400S spectrometer in the wavelength range 4000–600  $\text{cm}^{-1}$ . The  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) and  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) spectra were recorded on a Bruker Ultra Shield Plus-400 MHz spectrometer, operating with TMS as the internal standard. Chemical shifts are given in parts per million (ppm).  $^{31}\text{P}$  NMR chemical shifts were referenced to external  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (85% w/w). Multiplicities are shown as the abbreviations: s (singlet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet). The microwave irradiated synthesis was performed in microwave oven (operating between 100 and 700 W).

### Synthesis of MTA and MTE

The main way of direct access to these compounds is a one-pot reaction of three reagents via Moedritzer–Irani reaction [20] and Kabachnik-Fields reaction [19,23] (Scheme 1 and 2).

### Synthesis of $\alpha$ -aminophosphonic acid (MTA) by conventional method

A mixture of 0.01 mol m-toluidine, dissolved in 10 ml ethanol, 0.02 mol  $\text{H}_3\text{PO}_3$  and 0.02 mol formaldehyde were introduced into a three-necked flask. All were placed in the flask heater with stirring at a temperature of 74–76  $^\circ\text{C}$  for 4–5 h. The progress of the reaction is followed by TLC. At the end of the reaction, the solvent was removed in a rotary evaporator.

### Synthesis of $\alpha$ -aminophosphonic acid (MTA) by microwave method

In a 10 ml quartz tube, we have placed 0.001 mol m-toluidine with 0.5 ml EtOH and 0.002 mol phosphorous acid ( $\text{H}_3\text{PO}_3$ ). The mixture was irradiated for 2 min at 100 W. Then we have added dropwise using a pipette 0.004 mol of formaldehyde. The solution is placed in a microwave for another 3 min until the volume of solvent decreases and new product is formed.

### Synthesis of $\alpha$ -aminophosphonate ester (MTE) by conventional method

In a three-neck flask,  $10^{-2}$  mol ethanolic solution of m-toluidine and  $10^{-3}$  mol triethylphosphite were introduced. The mixture is stirred for 1 hour; then  $10^{-2}$  mol benzaldehyde was added to the mixture. The mixture was allowed to be refluxed for 4 h at 74–76  $^\circ\text{C}$ . The progress of the reaction was monitored by TLC. At the end of the reaction, the product was recovered.

### Synthesis of $\alpha$ -aminophosphonate ester (MTE) by microwave method

The same procedure as in the case of aminophosphonic acid was followed using m-toluidine, triethylphosphite and benzaldehyde.

All synthesized compounds were analyzed by Microanalysis, FT-IR, and  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopic methods, which allowed their identifications.

The spectra data of the compounds are as follows: ((Phosphonomethyl-m-tolyl-amino)-methyl)-phosphonic acid (MTA): Mol.Wt: 295.17; mp 198–200  $^\circ\text{C}$ . IR: 1376 (P-C), 1253  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{P}=\text{O}$ ), 2920  $\text{cm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$ ).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ ),  $\delta$ (ppm):

2.09–2.44 (s, 3H, P-CH), 8.2–9.0 (s, 6H, P-O-H);  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ 54–56 (s, CH<sub>2</sub>),  $^{31}\text{P}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ : 22.36–22.64 (s); Anal. cald. for C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>6</sub>P<sub>2</sub>: C, 36.62; H, 5.12; N, 4.75, Found: C, 35.92; H, 5.08; N, 4.88.

(Phenyl-m-tolylamino-methyl)-phosphonic acid diethyl ester (MTE): Mol.Wt: 333.36; mp > 200 °C. IR: 1368 (P-C), 1259 cm<sup>-1</sup> (P = O), 2860 cm<sup>-1</sup>(CH<sub>2</sub>),  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ (ppm): 2.66–2.84 (s, 3H, P-CH);  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ 71–73(s, CH<sub>2</sub>),  $^{31}\text{P}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ : 28.6 (s); Anal. cald. for C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>3</sub>P: C, 64.85; H, 7.26; N, 4.20, Found: C, 63.57; H, 6.90; N, 4.96.

#### Quantum chemical calculations

All quantum chemical calculations were performed using DFT method in Gaussian 09 software [24]. The geometries were optimized at the Becke-3 Lee-Yang Parr (B3LYP) functional [25] with standard 6–31+ +G(d,p) basis set [26]. Polarized Continuum Model was used for modeling the molecules in ethanol solution [27]. Vibrational frequencies were computed to ensure no imaginary frequency for the optimized structures. The geometries of the prepared compounds were optimized to minimize the molecular energies. Geometrical parameters (bond lengths and angles) and Frontier Molecular Orbitals levels were calculated by basis set pointed before. Mulliken atomic charges and dipole moments have been calculated at the same level of theory. To calculate the chemical reactivity, global reactivity descriptors were determined. In particular, the energy gap,  $E_{\text{LUMO}}$ ,  $E_{\text{HOMO}}$ , electronegativity ( $\chi$ ), global softness (S) and global electroplicity index ( $\omega$ ). These descriptors are all determined from the optimized molecules.

#### Antioxidant activity assay

##### DPPH radical scavenging

The antioxidant activity of the synthesized molecules was tested using the free radical compound 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) according to the procedure described by Y.R. Lu et al.(2013) [28]. The DPPH radical scavenging activity assay was performed with trivial adjustments. Different concentrations of the synthesized molecules (200–1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were used. The DPPH solution was prepared by dissolving 6.0 mg of the compound in 100 mL of methanol. Then, 1 mL of each concentration was added to 2 mL of the prepared DPPH solution. Finally, the control was prepared by adding 1 mL of methanol to 2 mL of DPPH. Ascorbic acid (AA) was used as the positive control. The mixture was shaken vigorously and incubated in the dark for 30 min. The absorbances of the resulting solutions were spectrophotometrically examined at 515–517 nm. The scavenging activities of each concentration of the DPPH radicals were calculated by:

$$\text{IC}\% = 100[(A_c - A_s)/A_c] \quad (1)$$

Where,  $A_c$  is Absorbance of control reaction and  $A_s$  is Absorbance in presence of test or standard sample. All samples were prepared and measured in triplicate.

##### ABTS<sup>•+</sup> radical scavenging

To determine the antioxidant activities of the synthesized molecules, we followed the ABTS method of M.B. Arnao et al.(2021) [29]. The ABTS method is based on the ability of hydrogen or electron-donating antioxidants to decolorize the performed radical monocation of 2, 2<sup>r</sup>-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) generated from the oxidation of ABTS with potassium persulfate [30]. The ABTS free radical scavenging activity of the tested samples (MTA and MTE) and Ascorbic acid standard was investigated by using the method described in the literature [31].

7 mM ABTS solution was dissolved in water with 2.4 mM potassium persulfate. The mixture was stored in the dark to react for 14–16 h at room temperature before use. The ABTS solution was then diluted by mixing 100  $\mu\text{L}$  ABTS solution with 6 mL methanol to obtain an absorbance of  $0.705 \pm 0.001$ . Then, 50  $\mu\text{L}$  of tested sample solutions at different concentrations were added to 1 mL of ABTS solution and incubated for 15 min at room temperature. The absorbance was recorded at 743 nm using a UV spectrophotometer. The IC<sub>50</sub> and the percent ABTS scavenging effect results were calculated like the same method of DPPH radical scavenging activity.

#### Enzyme inhibition studies

The AChE and BuChE inhibition activities were performed according to the method of Ellman et al., (1961) [32] with slight modifications. For this, all synthesized molecules were dissolved in DMSO, then 100  $\mu\text{L}$  test compounds (at 10<sup>-3</sup> M and 10<sup>-4</sup> M concentrations) was mixed with 100  $\mu\text{L}$  enzyme (AChE and BuChE) and incubate at 37 °C for 10 min. After incubation 0.5 mL sodium phosphate buffer (50 mM) (pH8.0), 50  $\mu\text{L}$  DTNB (5,5<sup>r</sup>-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) followed by addition of 50  $\mu\text{L}$  substrate acetylthiocholine iodide and butyrylthiocholine iodide for AChE and BuChE, respectively. After 30 min of incubation at 37 °C, the absorbance was measured at 410 nm using UV/VIS spectrophotometer. All experiments were carried out with their respective controls in triplicate.

The% of inhibition was calculated by the following formula;

$$\% \text{ Inhibition} = ((A-B)/A).100 \quad (2)$$

Where A is the optical density of blank and B is the optical density of sample.

Galantamine in this process was employed as a positive control. All tests were repeated three times one after the other.

#### Antimicrobial activity

##### Antibacterial activity

Antibacterial activity was determined according to disk diffusion method against four bacterial strains Staphylococcus aureus (ATCC 29213), Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853), Escherichia coli (ATCC 25922) and Bacillus cereus (ATCC 11778) [33]. Bacterial medium, Mueller Hinton Broth (Accumix® AM1072), was prepared and autoclaved for 20 min at 121 °C and 15PSI. 30 mL of the sterilized medium was poured in the petri-plates and seeded with respective bacterial strains. 20  $\mu\text{L}$  of each concentration (100–1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was applied on disks with the help of micropipette. Ampicillin was used as reference antibiotic, while solvent, Dimethyl sulfoxide (DMSO), was used as negative control. After incubation of 24 hr at 37 °C, the zone of inhibition was measured.

##### Antifungal activity

Antifungal activity was determined against two different fungal strains: Candida albicans (ATCC 10231), Candida tropicalis (DSM 11953) and A. niger (DSM 737), by using the method of Samina et al.,(2009) with minor modification [33]. Sterilized medium, Sabouraud Dextrose Broth (Himedia ME033), of 30 mL was poured aseptically in autoclaved petri plates and seeded with the respective fungal strain. After the solidification of the medium disks were placed on it and 20  $\mu\text{L}$  of concentration sample (200–1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was applied on each disk. The plates were incubated at 25 °C and the zone of inhibition was measured with Vernier caliper after 48 h. Nystatin was used as standard antifungal agent.

**Table 1**

Yields and time of MTA and MTE synthesis under conventional and microwave irradiation conditions.

Products	Conventional	Microwave
MTA Time	4–5h	4–8min
Yield	66%	87%
MTE Time	4–6h	5–10min
Yield	70%	92%

### 3. Results and discussion

#### Synthesis

The  $\alpha$ -aminophosphonic acid (MTA) and  $\alpha$ -aminophosphonate ester (MTE) were prepared from *m*-toluidine under microwave irradiation and conventional heating, as shown in Scheme 1 and Scheme 2. The comparison between the yields and time spent on the preparation of these molecules are presented in Table 1. The results demonstrated that the microwave preparation was faster (4–8 min/MTA and 5–10 min/MTE) and more productive (87%/MTA and 92%/MTE) and consumes less solvent, making it more suitable for principles of green chemistry. Whereas similar reactions under conventional heating (steam bath) at refluxed temperature gave less yields (66%/MTA and 70%/MTE) with comparatively longer reaction time periods ( $\approx 5$ hr/MTA and  $\approx 6$ hr/MTE).

The compounds obtained from microwave-assisted preparation have the same physical properties (color, shape, melting point) comparing with those synthesized by conventional preparation. The isolated molecules from both methods exhibited one spot on the TLC chart indicating the high purity of these compounds. The synthesized MTA was found to be soluble in water, ethanol and methanol. Whereas, the MTE was found to be soluble in methanol, acetone, acetonitrile, chloroform, DMF and DMSO at room temperature, also soluble in hot ethanol. All the synthesized compounds were adequately characterized by their elemental analyses and spectral IR, NMR spectroscopic methods. The percentages of carbon, hydrogen and nitrogen were determined by using CHN analyzer. The found and calculated data were in good agreement with the proposed molecular formulae. All the structures of the above compounds were in good agreement with spectral and analytical data. The UV–Vis spectra of MTA spectrum showed two absorption bands, one located at  $\lambda_{\max} = 246.34$  nm and the other located at  $\lambda_{\max} = 290.79$  nm. Whereas, the MTE spectrum has two bands, one absorption band located at  $\lambda_{\max} = 236.65$  nm, another band at  $\lambda_{\max} = 287.32$  nm. From the infrared spectra of MTA and MTE we can easily detect the disappearance of the bands of the primary amine function and the appearance of the absorption bands attributable to the P–OH, P–C groups, P=O and OH of phosphonic group. All the synthesized compounds showed carbon absorption bands ( $sp^3$ ) at  $2922$ – $2860$   $cm^{-1}$  due to the presence of the methyl group in the (Meta) position and also to the substitution of the methyl-phosphono groups.  $\alpha$ -Aminophosphonic acid (MTA) exhibits characteristic bands for the phosphonic –OH function at  $3200$ – $3600$   $cm^{-1}$ . The peak at  $1440$   $cm^{-1}$  is due to the stretching of the –P(O)–OH function. The absorption bands at  $1253$   $cm^{-1}$  and  $1095$   $cm^{-1}$  are assigned to the stretching modes of P=O and P–O for MTA and MTE, respectively. The strong peak at  $\approx 1370$   $cm^{-1}$  is attributed to the bending of the P–CH<sub>2</sub> bond which could be used to confirm the formation of a bond between phosphorous acid (or triethylphosphite) and methanal (or Benzaldehyde).

NMR spectral characteristics of  $\alpha$ -aminophosphonic acids and aminophosphonate esters are an important technique for determination of structure and identification of new compounds. The structures of MTA and MTE were confirmed by NMR analysis. The

**Table 2**

Optimized geometric parameters (bond lengths) of some bonds of MTA and MTE.

MTE		MTA	
Bond	Length (Å)	Bond	Length (Å)
C3–N10	1.3943	C2–N15	1.4148
C5–C44	1.5122	C4–C11	1.5122
N10–C12	1.4476	N15–C16	1.4529
C12–P25	1.8547	N15–C19	1.4523
P25=O26	1.4902	P22–O32	1.4872
		P23–O33	1.5020
P25–O27	1.627	P22–O26	1.6231
P25–O28	1.6179	P23–O28	1.6146

**Table 3**

Optimized geometric parameters of some angles of MTA and MTE.

MTE		MTA	
Bond	Angle (°)	Bond	Angle (°)
C3–N10–C12	123.8556	C2–N15–C16	121.9193
		C2–N15–C19	120.2658
N10–C12–P25	106.4344	N15–C16–P22	118.1096
		N15–C19–P23	112.7085
C12–P25–O26	117.5126	C19–P23–O33	114.3736
C12–P25–O27	99.9958	C16–P22–O32	112.2428

<sup>1</sup>H NMR spectra further supported for their structures and showed singlet at near  $\delta 2.09$ – $2.44$  ppm for MTA and also showed singlet in the region  $\delta 2.66$ – $2.84$  ppm for MTE due to methylene protons. On the other hand the phosphonic protons of MTA appeared as singlet in the region  $\delta 8.2$ – $9.0$  ppm. Formation of the P–C–N fragment is confirmed by <sup>13</sup>C NMR spectra of compounds MTA and MTE, in which the phosphonic C-atom signal appear at ( $\delta C 71$ – $73$  ppm) and ( $\delta C 54$ – $56$  ppm) for MTE and MTA, respectively. The <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy showed singlet in the region  $\delta 22.36$ – $22.64$  ppm for MTE and  $28.6$  ppm for MTA. These results confirm, in both the cases, the successful synthesis of  $\alpha$ -aminophosphonic acid (MTA) and aminophosphonate (MTE) with high purity.

#### Computational results

DFT has become an effective tool for determining structure, electronic and thermal properties of molecules, etc. In the present study, all DFT calculations were performed using Gaussian09 with the level of theory DFT/B3LYP/6–31G++(d,p). From our previous work and based on low energy criteria, it was found that geometries of aminophosphonic acids obtained using the Becke, 3-parameter, Lee–Yang–Parr (B3LYP) with 6–31G++(d,p) level of theory showed better stability.

#### Optimization of structures

In this part, we presented the results of theoretical calculations by the DFT method in order to determine the structural and energetic properties of the synthesized molecules. In this point, we have studied the optimization of the geometric shapes of MTA and MTE. The optimization of the geometry was carried out by minimizing the energy (The most stable structures correspond to the lowest energy). We have used DFT method at the B3LYP level with the base 6–31G++(d,p) to optimize the structures and determine certain geometric parameters (lengths of bonds and angles). The optimized structures of each molecule are shown in (Fig. 1). The selected calculated geometric parameters of the molecules are listed in Tables 2 and 3. After the optimization of the molecular geometry, we have made a comparative study of some geometric parameters. C5–C44 (MTE) and C4–C11 (MTA) bonds have the same length value ( $\approx 1.5122$  Å). Therefore, the substitution by an ester or acid function has no influence on the geometry of the methyl

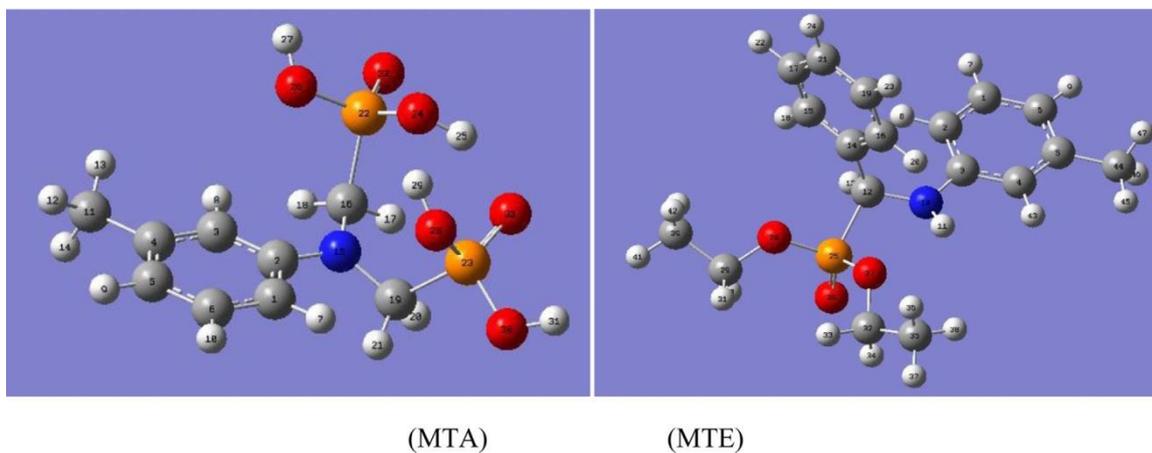


Fig. 1. Optimized structures of MTA and MTE at B3LYP/6–31G(d,p) level.

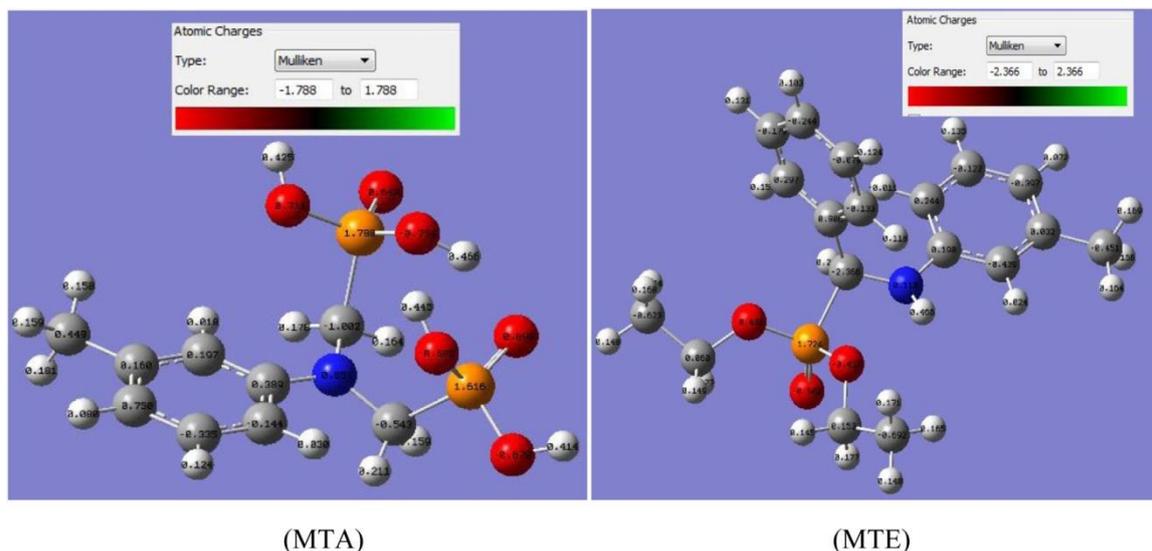


Fig. 2. Mulliken atomic charges of MTA and MTE calculated at B3LYP/6–31G(d,p) level.

group attached to the aromatic cycle. C3-N10 bond is shorter in the case of MTE ( $1.3943\text{Å}$ ) than that of MTA. The C12-P25 ( $1.8547\text{Å}$ ) and P25 = O26 ( $1.4872\text{Å}$ ) bonds of MTE are longer than those of MTA. The P-O bond lengths in the two compounds are similar. On the other hand, all C–C–C and C–C–H angles are equal to  $\approx 120^\circ$ . The benzene ring is a regular plane, the six hydrogen atoms also belong to the plane of the ring. The (C2-N15-C16) angle of MTA ( $121.919^\circ$ ) is less than that of MTE (C3-N10-C12 =  $123.855^\circ$ ), this is because of the presence of more oxygen atoms which are more electronegative.

#### Mulliken atomic charges analysis

Mulliken atomic charges have an important role in the application of quantum chemical calculations to the molecular system because atomic charges affect dipole moment, molecular polarizability, electronic structure, and many properties of molecular systems. The distribution of charges over the course of the atoms suggests the formation of donor and acceptor involving the transfer of charge in the molecule and in a chemical reaction [34]. The Mulliken atomic charges for the MTA and MTE compounds calculated at the B3LYP/6–31G(d,p) level are presented in Fig. 2 and Table 4. From the Mulliken charges distribution, we have observed that the C2, C3, C4, P22, P23, H atoms and phosphorus atoms are all electropositive in both molecules. While, all nitrogen and oxy-

Table 4

Distribution of Mulliken atomic charges of MTE and MTA.

MTA		MTE	
Atom	Charge	Atom	Charge
C1	-0.144079	C1	0.665643
C2	0.389249	C2	-0.632028
C3	0.197240	C3	-0.804281
C4	0.159645	C4	0.240713
C5	-0.749611	C5	0.617488
C6	-0.334726	C6	-0.622222
H8	0.017976	H8	-0.118439
C11	-0.448954	H11	0.398027
H12	0.159323	C12	-2.213893
N15	-0.051034	C15	0.210053
H18	0.177524	H18	0.159930
C19	-0.543368	C19	0.019498
H20	0.159158	H20	0.102466
H21	0.211309	C21	-0.195225
P22	1.788345	H22	0.121357
P23	1.616025	H23	0.140470
O24	-0.753508	H24	0.114381
O26	-0.711303	O26	-0.690919
H27	0.424727	O27	-0.421862
O28	-0.605103	O28	-0.441008
H29	0.445479	C29	0.096247

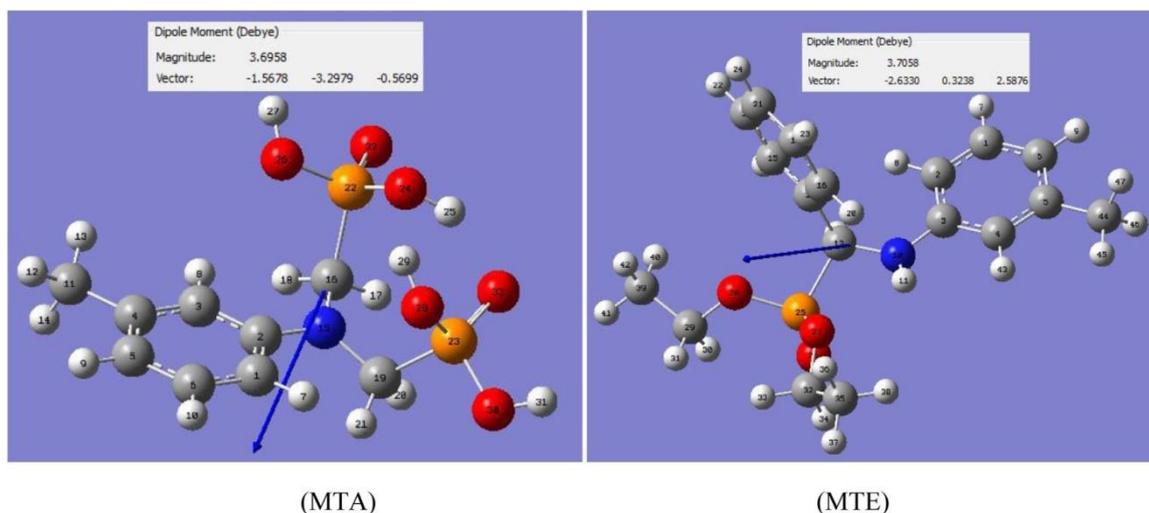


Fig. 3. Dipole moments of MTA and MTE calculated at B3LYP/6-31G(d,p) level.

Table 5

Electrical dipole moments of MTE and MTA.

Parameters	MTA	MTE
$\mu_x$	-1.5678	-2.6330
$\mu_y$	-3.2980	0.3238
$\mu_z$	-0.5699	2.5876
$\mu_{total}$	3.6959	3.7058

Table 6

Energies of HOMO, LUMO, energy gap and global chemical reactivity indices of synthesized MTA and MTE.

Molecular energy (a.u.)	MTA	MTE
$E_{LUMO}$	-0.03152	-0.02415
$E_{HOMO}$	-0.21601	-0.19986
Energy gap( $\Delta$ )	0.18449	0.17571
Ionization potential (IP)	0.21601	0.19986
Electronic Affinity (EA)	0.03152	0.02415
Global hardness ( $\eta$ )	0.092245	0.087855
Global softness (S)	5.420348	5.69119
Chemical Potential ( $\mu$ )	-0.123765	-0.11201
Electronegativity ( $\chi$ )	0.123765	0.11201
Electrophilicity ( $\omega$ )	0.08303	0.071403

gen atoms are electronegative in both cases and constitute strong nucleophilic sites.

#### Dipole moments

DFT was also used to calculate the dipole moment. The dipole moment in a molecule is an important electronic property that results from the non-uniform distribution of charges on the different atoms. It is mainly used to study intermolecular interactions involving dipole-dipole forces of Vander Waals type, etc. The total dipole moment in a Cartesian coordinate system is defined by:

$$\mu = (\mu_x^2 + \mu_y^2 + \mu_z^2)^{1/2} \quad (3)$$

Table 5 presents the components of the moment  $\{\mu_i (i = x, y, z)\}$  and the total dipole moment  $\mu_{tot}$  for the two compounds MTA and MTE. Table 5 shows that the calculated values of dipole moments in the case of MTE (3.7058D) are quite superior to MTA (3.6958D) (Fig. 3). The dipole moment is greater in both molecules and can be explained by the difference in electronegativity caused by oxygen, nitrogen and phosphorus atoms. The higher value of dipole moments is mainly attributed to an overall imbalance of charge on one side of a molecule to the other.

#### Frontier molecular orbital analysis

The frontier molecular orbital's (HOMO and LUMO) of a chemical species are very important in quantum chemistry [35,36] and plays a significant role in the electrical and optical properties and also in chemical reactions. The HOMO represents the ability to donate electrons, while LUMO as an electron acceptor [37-39]. This electronic absorption corresponds to the transition from the ground to the first excited state. Highest occupied molecular orbital (HOMO) and lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) are been computed using B3LYP level 6-31++(d,p) of DFT. The HOMO and LUMO plots of MTA and MTE are shown in Fig. 4. The green

and red regions show MO with totally opposite phases. The positive phase is represented in red color and the negative phase is represented in green color.

In MTA molecule, it is found that the LUMO is localized mainly on phosphonic moiety, whereas the HOMO is also relocated on the whole of the p-conjugate system. For MTE compound, it is clear from the HOMO-LUMO figures that HOMO is mainly situated over phenyl ring atoms attached to  $-CH_3$  while LUMO is mainly localized on the second phenyl atoms. These indicate that, the electron density transfer from the HOMO to the LUMO are mainly derived from the electronic transitions of  $n \rightarrow \pi^*$  [40].

Higher values of  $E_{HOMO}$  indicate a better tendency towards the donation of electrons, As can be seen in Table 6 that the molecule (MTA) is the most molecule has the ability to accept electrons while (MTE) has the highest HOMO energy ( $E_{HOMO} = -0.19986$  a.u.) that allows him to be the best electron donor molecule.

The difference between HOMO and LUMO orbital is called as energy gap  $\Delta E$  that is an important parameter of the chemical reactivity and stability of structures. For a system, the lower value of  $\Delta E$  makes it more reactive or less stable, while a high value of the energy gap indicates that the molecule shows high chemical stability and less reactivity. The calculations show that the energy gap ( $\Delta E$ ) of MTE and MTA are, respectively, 0.18449 a.u. and 0.17571 a.u. As shown in Table 6, an ester compound (MTE) has a lower energy gap than acid molecule (MTA). So MTE is more reactive and less stable than the other molecule, this may be due to the existence of the phosphonate function.

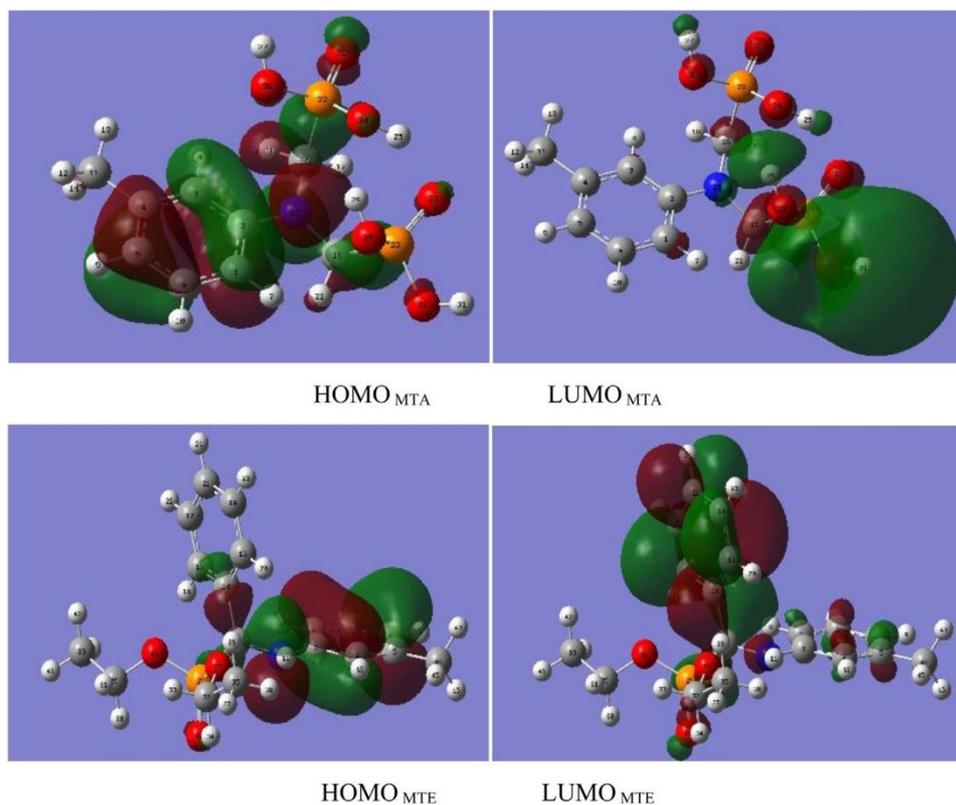


Fig. 4. HOMO-LUMO molecular orbitals of MTA and MTE calculated at B3LYP/6-31G(d,p) level.

#### Global reactivity descriptors

The molecular orbital analysis played a crucial role in determining chemical reactivity as well as molecular chemical stability involving various possible conformers. The chemical reactivity and stability of each designated molecule depend on the eigenvalue of HOMO-LUMO and energy gap [41]. In order to investigate the influence of electronic effect of substituents on the global reactivity descriptors, such as electronic chemical potential ( $\mu$ ), chemical hardness ( $\eta$ ), chemical softness (S) global electrophilicity ( $\omega$ ). These descriptors are all determined from the optimized molecules.

DFT-based chemical reactivity and stability descriptors were calculated as in Eqs. (4)–(10) according the Koopman's theorem [42]:

$$IP = -E_{HOMO} \quad (4)$$

$$EA = -E_{LUMO} \quad (5)$$

$$\eta = E_{LUMO} - E_{HOMO} \quad (6)$$

$$\omega = \mu^2/2\eta \quad (8)$$

$$\mu = (E_{HOMO} + E_{LUMO})/2 \quad (9)$$

$$\chi = -\mu = (IP + EA)/2 \quad (10)$$

Stereochemical characteristics of a compound can affect its reactivity and stability. In this point, the global reactivity descriptors give relevant information about compound stability and reactivity. All electronic parameters were calculated based on full optimized geometries.

The Ionization potentials (IP) and Electron affinities (EA) were obtained from the HOMO-LUMO values with change of sign [43].

The Ionization potential of a molecule is the energy that must be supplied to a neutral atom to pull out an electron and form a positive ion. While, (EA) refers to the ability of a neutral atom or molecule to capture an extra electron. Molecule with a low (IP) value has a better electron donor character, those with a high (AE) value a good electron acceptor character. As can be seen in Table 6, the  $IP_{MTA}$  and  $IP_{MTE}$  are (0.21601 a.u.) and (0.19986 a.u.), respectively. The  $IP_{MTE}$  is lower than  $IP_{MTA}$ . According to the ionization potential results, MTE requires less energy to remove an electron in the ground state. This indicates that MTE (electrodonating) is likely to give up electrons. In the analysis of the Electron affinity, it was found that electronic affinity (AE) of MTA is significantly greater than those of MTE ( $AE_{MTE}$ ). This indicates that this latter one (with phosphonate moiety) is the unique good electrodonnor. But the phosphonic molecule has shown to be bad electron donor.

Global hardness ( $\eta$ ) and Softness (S) are essential properties to measure reactivity and the molecular stability of molecules. Chemical hardness measures the resistance to change in the electron distribution or charge transfer. Chemical hardness corresponds to the gap between the HOMO and LUMO. The larger the energy gap, the molecule is harder and more stable/less reactive [35]. As shown in Table 6, it can be seen that MTA is the most stable, because it presents the highest value of hardness and MTE has the lowest value of hardness. Therefore, the MTE molecule will react easier with other systems, given that the softness is the reciprocal of hardness.

Electrophilicity index ( $\omega$ ) measures the capacity of a species to accept electrons (the electrophilic tendency of molecule). It is a measure of the stabilization in energy after a system has accepted additional amount of electronic charge from the environment [44]. The global electrophilicity index measures the stabilization in energy when the system acquires an additional electronic charge from the environment [45]. Table 6 shows that MTA has

high electrophilicity index value (0.08303 a.u.) than MTE. High values of electrophilicity index increases electron accepting abilities of the molecules. Thus, electron accepting abilities of compounds are arranged in following order: MTA > MTE. This is in good agreement with the predicted (EA). Furthermore, the electrophilicity index indicates that MTA is the most stable molecule when it receives electron charge from the external environment.

The aminophosphonate ester (MTE) (with two linked benzene rings) exhibit a rich reactivity due to the electrophilic character of the two phenyl rings and the nucleophilic character of the phosphorous and nitrogen atoms. Thus, the carbon–nitrogen and carbon–phosphorus double bond are easily attacked by a variety of nucleophiles and electrophiles.

The chemical potential ( $\mu$ ) is used to describe the escaping tendency of electrons from an equilibrium system. The greater the electronic chemical potential, the less stable or more reactive is the compound [46]. The chemical potential obtained for the (MTE) at 6–31++G(d, p) basis set is (–0.11201 a.u.) which is in close agreement with the predicted values of global hardness. Thus, the above result predicts the low stability nature of the MTE.

Electronegativity is the measure of an atom, molecule or solid substance to attract electrons to itself. The first connection of the electronegativity ( $\chi$ ) concept with quantum mechanics within density-functional theory (DFT) is assigned to Parr et al. [47]. Furthermore, it was proposed that ( $\mu$ ) is the negative of electronegativity ( $\chi$ ), which helped to establish a direct connection with chemical reactivity [47]. Higher is the electronegativity of the species, greater is its electron accepting power or rather the electrophilicity. The Table 6 shows the order of electronegativity as MTA > MTE. The values of electronegativity indicate that MTA has the highest tendency to attract electrons; hence, this compound would be energetically favored for a nucleophilic attack.

#### Molecular electrostatic potential surface (MESP)

Molecular electrostatic potential (MESP) at a point in the space around a compound gives an information about the net electrostatic effect produced at that point by total charge distribution (electron + nuclei) of the molecule [48], and correlates with the dipole moments, electronegativity, partial charges chemical reactivity of the molecule.

The molecular electrostatic potential surface, MESP shows the shape, size and electrostatic potential values of the molecule and is plotted for the MTE and MTA molecules. MESP mapping is very useful in investigating the physicochemical properties of molecular structure. A portion of the molecule with negative electrostatic potential is sensitive to electrophilic attack and. The red and blue regions on the MESP map correspond to the negative and positive potential regions and refer to electron rich and electron deficient regions, respectively. The green color indicates neutral electrostatic potential. In this study, MESP were mapped for the MTE and MTA molecules as shown in Fig. 5, which indicates the electrostatic potentials at the surface for the molecules which are shown by different colors. The MESP maps show that there are negative potential zones characterized by red color around the oxygen atoms. A relatively larger region around the oxygen atoms of the P = O functions, reflects by the yellowish blobs, represents the most negative potential region (dark red) and is permissible for electrophilic interaction. The hydrogen atom carries the maximum force of the positive charge (dark blue), while the neutral potential is localized on the aromatic ring surfaces and represented by green color.

#### Thermodynamic properties

Another use of the DFT calculations is the prediction of the thermodynamic properties of different compounds [49]. For this purpose, standard thermodynamic functions including heat capacity ( $C_p^\circ$  and  $C_v^\circ$ ), enthalpy ( $H^\circ$ ) and entropy ( $S^\circ$ ) of the title MTA

and MTE at different temperatures were calculated at DFT/B3LYP and obtained from theoretical harmonic frequencies are shown in Fig. 6 and 7. All these thermodynamic data would be helpful in providing information for further study of the two isomers which can be useful to determine the directions of chemical reactions according to the second law of thermodynamics. As shown in Table 7 and 8, calculated heat capacity ( $C_p^\circ$  and  $C_v^\circ$ ), Enthalpy (H), Internal Energy (U) and Entropy (S) thermodynamic functions for MTE and MTA are always positive in all temperature range. All these thermodynamic functions increase with the increase in temperature from 100 to 1000 K which is due to the enhancement of molecular vibrations with increasing in temperature at one atmospheric pressure [50]. Figs. 6 and 7 show that the Gibbs free energy (G) is a function of temperature for the both molecules. As is clearly seen in the figures, all curves follow similar trends as the temperature is increased, with G smoothly decreasing with the increasing of temperature. The correlations between these thermodynamic parameters and temperature (T) are plotted and fitted by quadratic equations. The fitting factor ( $R^2$ ) for  $C_p^\circ$ ,  $H^\circ$  and  $S^\circ$  for these molecules is found to be 0.99 as shown below:

For MTA:

$$CV = 31.49658 + 1.07243 * X + (-4.91105E-4) * X^2, (R^2=0.99942) \quad (11)$$

$$CP = 39.81188 + 1.07243 * X + (-4.91103E-4) * X^2, (R^2=0.99942) \quad (12)$$

$$U = 643.36225 + 0.16031 * X + (2.62212E-4) * X^2, (R^2=0.99946) \quad (13)$$

$$H = 643.36207 + 0.16863 * X + (2.62212E-4) * X^2, (R^2=0.99948) \quad (14)$$

$$S = 263.20518 + 1.28847 * X + (-3.57997E-4) * X^2, (R^2=0.99989) \quad (15)$$

$$G = 672.22267 + (-0.35773) * X + (-4.44003E-4) * X^2, (R^2=0.99993) \quad (16)$$

For MTE:

$$CV = 30.77313 + 1.35662 * X + (-5.29567E-4) * X^2, (R^2=0.99932) \quad (17)$$

$$CP = 39.0868 + 1.35662 * X + (-5.2957E-4) * X^2, (R^2=0.99932) \quad (18)$$

$$U = 1013.74395 + 0.16085 * X + (3.90816E-4) * X^2, (R^2=0.9996) \quad (19)$$

$$H = 1013.74387 + 0.16916 * X + (3.90815E-4) * X^2, (R^2=0.99961) \quad (20)$$

$$S = 315.66512 + 1.54484 * X + (-3.56497E-4) * X^2, (R^2=0.99992) \quad (21)$$

$$G = 1042.70513 + (-0.40967) * X + (-5.73192E-4) * X^2, (R^2=0.99996) \quad (22)$$

#### Vibrational analysis

After optimization, vibrational assignments of MTA and MTE were carried out by DFT calculations using the B3LYP method with a 6–31++G(d,p) basis set, using the structural geometry obtained by the same method, along with the experimental values and assignments, and these are presented in Table 9. Vibrational frequencies calculations were carried out by the VEDA 4 program [51]. The basic modes of vibration of each compound that

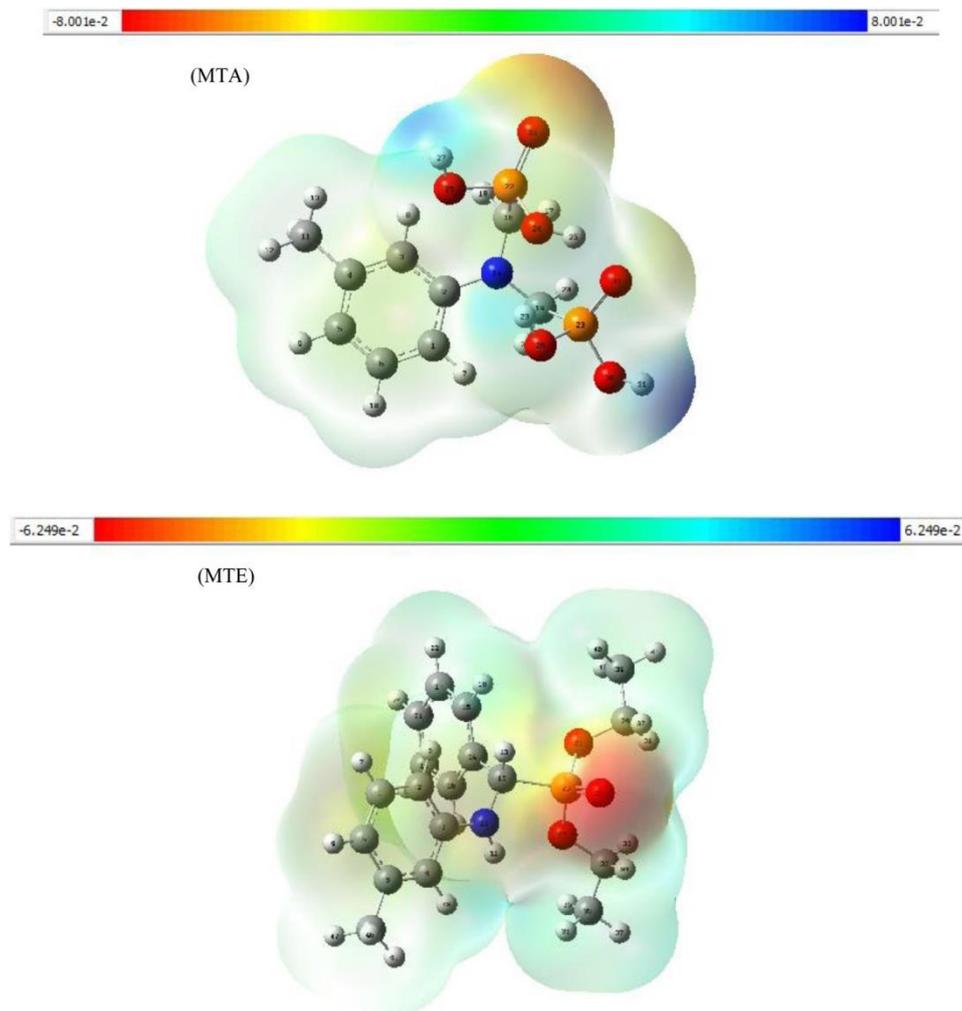


Fig. 5. Molecular electrostatic potential and contour maps of the MTA and MTE calculated at B3LYP/6–31G(d,p) level.

**Table 7**

The relationship of thermodynamic functions and temperatures of MTA.

Temperature(k)	CV(J/K.mol)	CP(J/K.mol)	U(kj/mol)	H(kj/mol)	S(J/K.mol)	G(kj/mol)
100.000	131.788	140.103	666.487	667.318	383.701	628.948
200.000	224.441	232.756	684.385	686.048	509.848	584.079
300.000	310.474	318.789	711.181	713.675	620.689	527.469
400.000	386.790	395.104	746.153	749.479	723.163	460.214
500.000	448.992	457.307	788.062	792.219	818.275	383.081
600.000	498.185	506.500	835.516	840.505	906.176	296.800
700.000	537.441	545.755	887.368	893.188	987.309	202.072
800.000	569.476	577.791	942.765	949.416	1062.344	99.541
900.000	596.185	604.500	1001.086	1008.569	1131.985	-10.217
1000.000	618.809	627.124	1061.866	1070.181	1196.878	-126.698

**Table 8**

The relationship of thermodynamic functions and temperatures of MTE.

Temperature(k)	CV(J/K.mol)	CP(J/K.mol)	U(kj/mol)	H(kj/mol)	S(J/K.mol)	G(kj/mol)
100.000	171.270	179.584	1038.353	1039.184	460.747	993.109
200.000	272.022	280.336	1060.520	1062.183	616.190	938.945
300.000	380.538	388.853	1093.080	1095.575	750.096	870.546
400.000	488.266	496.580	1136.599	1139.925	876.939	789.149
500.000	582.096	590.410	1190.256	1194.414	998.137	695.345
600.000	659.501	667.816	1252.466	1257.454	1112.860	589.739
700.000	723.011	731.326	1321.693	1327.513	1220.730	473.002
800.000	775.735	784.049	1396.709	1403.361	1321.932	345.815
900.000	820.085	828.399	1476.562	1484.045	1416.913	208.823
1000.000	857.767	866.081	1560.504	1568.819	1506.197	62.622

**Table 9**

Experimental and Calculated vibrations IR modes for MAT and MTE calculated DFT methods with 6-31G++(d,p).

Mode/Assignment	MTA		MTE	
	Frequencies(cm <sup>-1</sup> )			
	Theo.	Exp.	Theo.	Exp.
V <sub>s</sub> O-H	3610.79	3602	–	–
V <sub>s</sub> C-H, β(H-C-H),	3364.31	2970	3363	2981
V <sub>as</sub> C-H, β(H-C-C), ρ(C-C-H-C), ρ <sub>out</sub> (C-C-C-H)	3354.96	2898	3353.7	2918
V <sub>as</sub> C-H, ρ(H-C-H-C)	3342.97	2892	3351.5	2898
γ C-H, β(H-C-N)	–	–	1462.4	1433
V <sub>C</sub> -O, β(H-C-H), ρ(H-O-C-C)	1321.9	1294	1320.3	1280
α <sub>C</sub> -H, V <sub>C</sub> -N, β(C-C-N), β(C-C-H), β(C-C-H-C), ρ <sub>out</sub> (C-C-C-H)	–	–	1294.7	1286
α C-H, β(H-C-N), ρ(H-C-N-C)	1272.15	1227	1280.5	1233
V <sub>P</sub> =O	1253	1202	1242.1	1198
α C-H, β(H-C-H), ρ(H-C-N-C)	1198.82	–	1191.3	1118
ω <sub>C</sub> -H, β(H-C-C), β(H-C-H), β(H-O-C)	1140.84	1101	1145.5	1093
γ C-H, δ C-H, β(C-N-C), ρ(H-C-N-C), ρ(O-P-C-N)	1133.37	1074	1139.6	1046
V(C-O-P)	–	–	1052.9	1039
V <sub>P</sub> O/ ρ(OH)HOP=O	720	717	920	912
V <sub>P</sub> -CH <sub>2</sub>	711	709	722	718

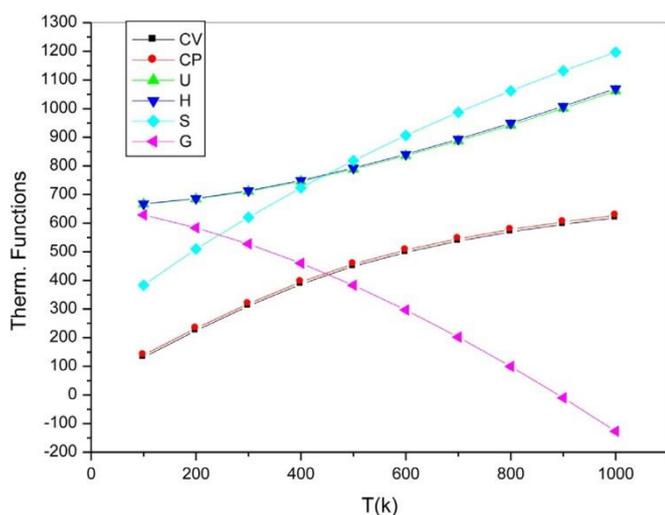


Fig. 6. Temperature dependence of thermodynamic functions and MTA.

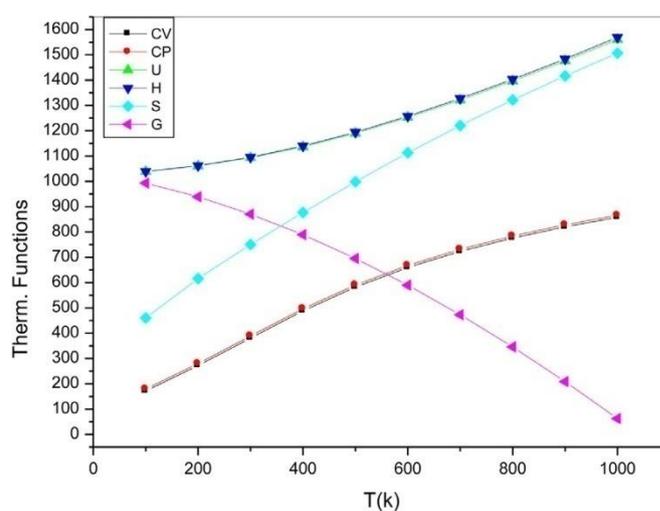


Fig. 7. Temperature dependence of thermodynamic functions and MTE.

are calculated according to the rule  $(3N-6_{\text{vib}})$ . For the MTA we have found 93  $((33 \times 3) - 6 = 93)$  and the MTE we have found 135  $((47 \times 3) - 6 = 135)$ . All vibrations are active in IR and all frequencies are assigned in terms of fundamental, harmonic and combination bands. The experimental and theoretical spectra of MTA and MTE are shown in Figs. 8 and 9. In general, the absorption frequencies obtained from experiment and theory are in good agreement. Our special attention is to characterize modes that are associated with the phosphonic/phosphonate group vibrations. Phosphonic acids can be characterized by the  $P=O$  stretching,  $V(P=O)$ ,  $VP-O(H)$  stretching,  $V(P-O)$ , and  $P-C$  stretching,  $V(P-C)$ , vibrations. In the present investigation, the calculations show  $O-H$  stretching ( $VP-O(H)$ ) vibrations of MTA at  $3610.79 \text{ cm}^{-1}$  and this is in close agreement with the experimental values of  $3602 \text{ cm}^{-1}$ . Most of the vibrations calculated in the range of  $1270-1100 \text{ cm}^{-1}$  are assigned to  $V(P=O)$  and  $V(P-O)$  bending modes, while the experimentally observed values are at  $1265$  to  $1163 \text{ cm}^{-1}$ . MTE gives rise to several vibrational bands. The  $1242$  and  $1206 \text{ cm}^{-1}$  spectral features are primarily due to the  $P=O$  stretching vibrations  $V(P=O)$ , whereas the  $920-910$  and  $820-813 \text{ cm}^{-1}$  bands are assigned to the  $P-O$  stretching mode  $V(P=O)$ . A medium band at  $1052 \text{ cm}^{-1}$ , associated with the valence vibrations of the  $V(P-O-C)$  link. As is seen from Table 9, the predicted frequencies by B3LYP agree well with the observed ones.

### Antioxidant activity

#### DPPH radical scavenging assay

Various researchers have used scavenging effect of synthesized compounds on DPPH radical as a quick and reliable parameter to measure the in vitro antioxidant activity. DPPH radical scavenging assay has been widely used to measure the antioxidant activity of natural compounds based on their abilities to reduce radicals.  $IC_{50}$  values were calculated using linear regression, indicating the concentration of antioxidant samples necessary to quench 50% radicals in the reaction mixture.

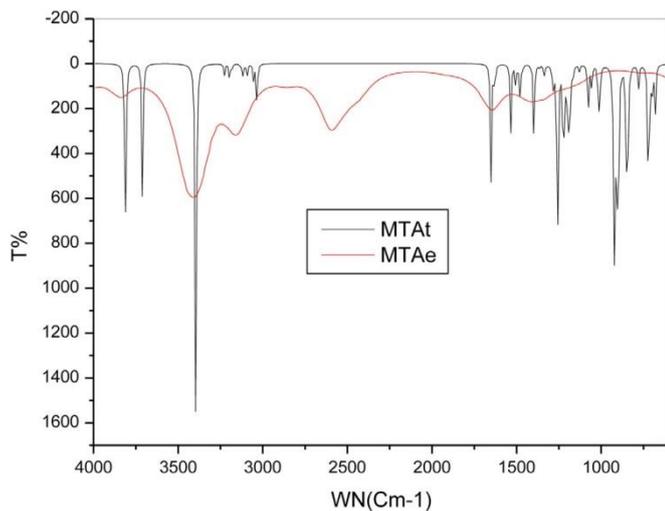
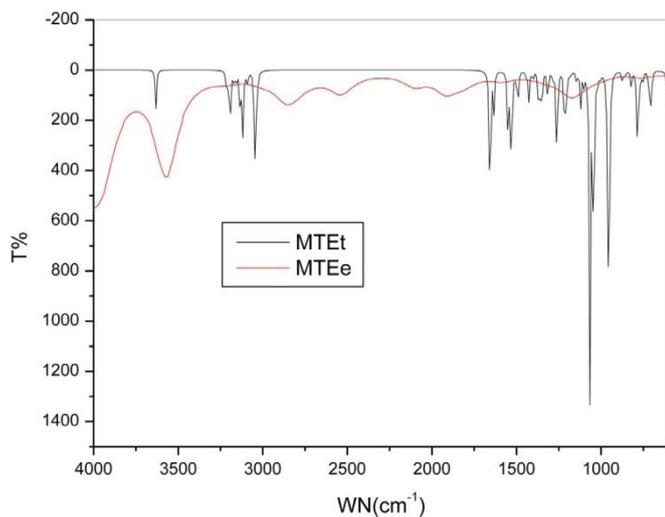
The inhibitory effects of the MTA, MTE and Ascorbic acid (AA) on DPPH radical were shown in Table 10 and Fig. 10. According to Fig. 10, all compounds show dose-dependent scavenging activity on DPPH radical. We further determined the  $IC_{50}$  values (Table 10). The MTA, AA and MTE displayed  $IC_{50}$  values of  $311.853 \mu\text{g/mL}$ ,  $457.66 \mu\text{g/mL}$  and  $621.627 \mu\text{g/mL}$ , respectively. The discoloration from purple DPPH radical solution to yellow may be ascribed to hydrogen donation from the  $(O-H)$  of phosphonic (MTA) and carboxylic (AA) groups.

#### ABTS radical scavenging assay

The ABTS test has almost the same principle as the DPPH test, but the  $ABTS^{\bullet+}$  has higher reactivity than  $DPPH^{\bullet}$ . The antioxi-

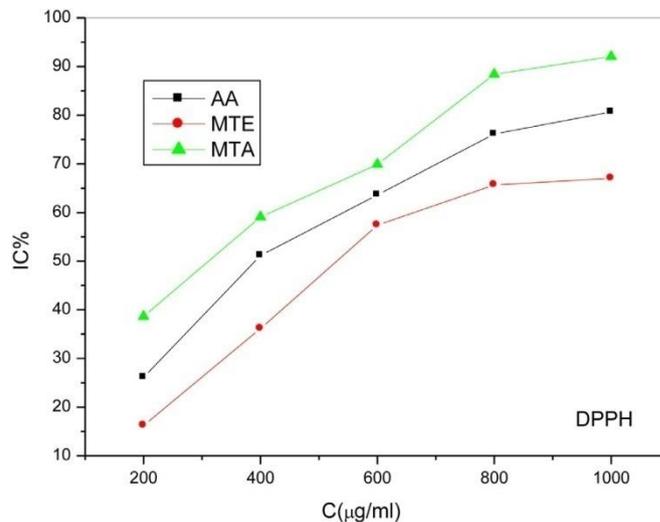
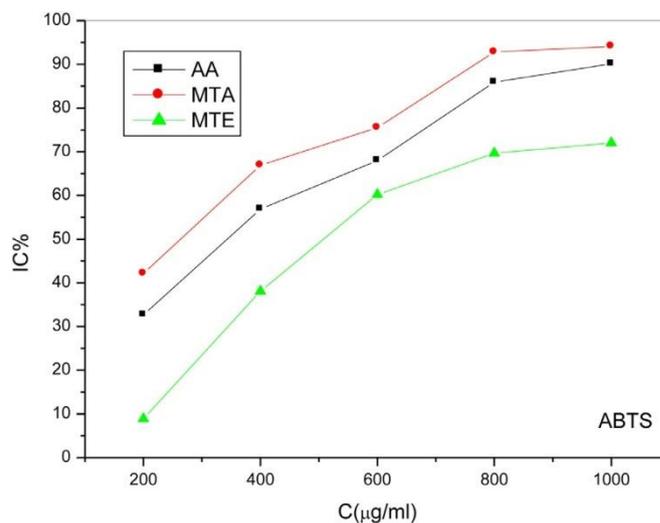
**Table 10**Percentage inhibition and IC<sub>50</sub> values of MTA, MTE and Ascorbic acid by ABTS assay and DPPH assay.

Concentration	Ascorbic Acid		MTE		MTA	
	( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ABTS assay	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> DPPH assay	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> ABTS assay	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> DPPH assay	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> ABTS assay	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> DPPH assay
200	32.67	26.136	28.91	16.250	42.12	38.636
400	56.87	51.136	38.09	36.136	66.87	59.090
600	67.98	63.636	60.16	57.386	75.54	69.886
800	85.90	76.136	69.67	65.681	92.81	88.409
1000	90.13	87.50	72.02	67.045	94.11	92.045
IC <sub>50</sub>	367.861±0.36 (R <sup>2</sup> =0.97632)	457.661±0.25 (R <sup>2</sup> =0.9663)	535.993±0.30 (R <sup>2</sup> =0.96487)	621.627 ± 0.12 (R <sup>2</sup> =0.94861)	226.077±0.29 (R <sup>2</sup> =0.96109)	311.853 ± 0.14 (R <sup>2</sup> =0.98073)

**Fig. 8.** Simulated (MTAt) and experimental (MTAe) IR spectra of MTE at B3LYP/6-31G(d,p) level.**Fig. 9.** Simulated (MTEt) and experimental (MTEe) IR spectra of MTE at B3LYP/6-31G(d,p) level.

dant reduces ABTS<sup>•+</sup> to ABTS according to the following reaction:  
 $\text{ABTS}^{\bullet+} + \text{AH} \rightarrow \text{ABTS} + \text{A}^{\bullet} + \text{H}^+$

Results of ABTS assay are presented in Table 10 and Fig. 11. It is observed that the IC<sub>50</sub> values of the synthesized compounds decrease in the following order: MTE>AA>MTA. We know that the smaller the IC<sub>50</sub> value, greater is the antioxidant activity of the compound. So, the order of Antioxidant activity is MTA>AA>MTE. From the calculation of IC<sub>50</sub> values, we can conclude that MTA has better antioxidant activity than MTE. Similar to DPPH Assay, com-

**Fig. 10.** Evolution of the percent inhibition (%) of MTE, MTA and Ascorbic Acid by DPPH assay.**Fig. 11.** Evolution of the percent inhibition (%) of the MTE, MTA and Ascorbic Acid by ABTS assay.

ound MTA is found to have the lowest IC<sub>50</sub> value and thus the highest antioxidant activity followed by compound MTE.

#### Antimicrobial activities

The antimicrobial activities of all synthesized compounds (MTA and MTE) were studied and antimicrobial inhibition zones (mm) were determined using the disk-diffusion method. The antibacterial and antifungal inhibition zones (mm) of the tested compounds are given in Tables 11 and 12, respectively. Amicilin and nystatin

**Table 11**  
Antibacterial activity of MTA and MTE.

Sample	Zone of inhibition (mm)											
	Bacterial strains S. aureus			P. aeruginosa			E. coli			B. cereus		
Conc. ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	100	500	1000	100	500	1000	100	500	1000	100	500	1000
MTA	11.12 $\pm$ 0.7	14.0 $\pm$ 0.7	18.6 $\pm$ 0.2	11.1 $\pm$ 0.5	10.0 $\pm$ 0.7	15.5 $\pm$ 2.1	NIL	08.17 $\pm$ 0.5	10.0 $\pm$ 0.7	NIL	10.0 $\pm$ 0.7	NIL
MTE	15.4 $\pm$ 0.4	18.1 $\pm$ 0.9	25.5 $\pm$ 1.1	15.4 $\pm$ 0.4	17.8 $\pm$ 0.6	17.5 $\pm$ 1.1	12.6 $\pm$ 0.4	17.1 $\pm$ 0.9	27.5 $\pm$ 1.1	12.4 $\pm$ 0.4	18.1 $\pm$ 0.9	22.5 $\pm$ 1.1
Ampc.	28.5 $\pm$ 1.1	33.2 $\pm$ 1.0	39.3 $\pm$ 1.3	25.5 $\pm$ 1.1	29.2 $\pm$ 1.0	36.7 $\pm$ 1.3	16.9 $\pm$ 1.1	25.2 $\pm$ 1.0	33.3 $\pm$ 1.3	13.5 $\pm$ 1.1	23.2 $\pm$ 1.0	31.3 $\pm$ 1.3

**Table 12**  
Zone of inhibition in (mm) formed on the different fungus by MTA and MTE.

Sample	Zone of inhibition (mm)								
	Fungal strains Candida albicans			Candida tropicalis			Niger		
Conc. ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	200	500	1000	200	500	1000	200	500	1000
MTA	8.12 $\pm$ 0.7	11.0 $\pm$ 0.7	14.6 $\pm$ 0.2	7.1 $\pm$ 0.5	10.0 $\pm$ 0.7	41.3 $\pm$ 1.3	NIL	10.0 $\pm$ 0.7	12.1 $\pm$ 0.9
MTE	15.4 $\pm$ 0.4	18.1 $\pm$ 0.9	25.5 $\pm$ 1.1	9.1 $\pm$ 0.5	12.1 $\pm$ 0.9	15.4 $\pm$ 0.4	10.4 $\pm$ 0.4	13.1 $\pm$ 0.9	17.5 $\pm$ 1.1
Ampc.	22.5 $\pm$ 1.1	31.2 $\pm$ 1.0	40.3 $\pm$ 1.3	23.5 $\pm$ 1.1	35.2 $\pm$ 1.0	42.5 $\pm$ 1.1	32.5 $\pm$ 1.1	39.2 $\pm$ 1.0	41.3 $\pm$ 1.3

reference compounds, respectively, for all microorganisms used in this work to compare and to check the reliability of the method used. The in vitro antimicrobial screening effects of the investigated compounds were tested against some bacterial and fungal species by the disk diffusion method. Here we aimed to check the anti-bacterial potential of MTE and MTA against two species of Gram-positive bacteria (*S. aureus* and *P. aeruginosa*) and two species of Gram-negative bacteria (*E. coli* and *B. cereus*). The results of the antibacterial activity are given in Table 11. Results showed that all bacterium were inhibited by synthesized compounds. MTE was found to be highly active in the bacterial species of *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *B. cereus*. However, MTA has moderate activity in the same species. It was observed that the MTE was more active against Gram-negative strains than Gram-positive. Again, the comparison of the above results with amoxicillin antibacterial standards demonstrates that *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* and *B. cereus* are highly active.

Antifungal activity of the MTA and MTE compounds were also determined at three different doses (100, 200, 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) against three pathogenic fungi. The disk diffusion method was used to check the sensitivity of the isolated strains (*C. albicans*, *C. tropicalis* and *A. niger*) to different antifungal agents. At lower doses all these strains were almost insensitive, but at higher doses the compounds showed moderate to high activity, whereas MTE with *C. tropicalis* shows high activity followed by *C. albicans* and *A. niger* (Table 12). MTA poses higher activity in *C. albicans* specie. The inhibition zone values of MTA and MTE are smaller than that for nystatin. The results on antifungal standard nystatin indicate that *C. albicans* is more active than *A. niger* and *C. tropicalis*.

Understanding the role of chemical structure on influencing biological activity is very important. The estimation of lipophilicity is vital in predicting whether molecules will pass through several membranes of the biological organs. The lipophilicity of molecule modifies the diffusion of bioactive molecules through the apolar cell membranes. This property is usually characterized by the partition coefficient ( $\log P$ ). This quantitative descriptor of lipophilicity is one of the key determinants of biological properties. Knowing the exact values for this parameter, it is possible to explain the antimicrobial activity of the molecule. The lipophilicity parameters, based on  $\log P$ , for the MTE and MTA compounds were theoretically calculated using HyperChem 7.5 (HyperCube Inc., Version 7.5) [52] (Table 13).

From Table 13, it is clear that compound MTE showed the highest lipophilicity than the other molecules. For the antibacte-

**Table 13**  
Calculated partition coefficient  $s(\log P)$  of MTA, MTE, Ampicillin and Nystatin molecules.

Compounds	LogP
MTA	-0.54
MTE	1.58
Ampicillin	1.35
Nystatin	0.52

**Table 14**  
AChE and BuChE enzyme inhibitions by synthesized MTA and MTE.

Sample	Enzyme Inhibition (%)	
	AChE% Inhibition	BuChE% Inhibition
MTA	67.32 $\pm$ 0.52	34.80 $\pm$ 0.76
MTE	92.71 $\pm$ 0.91	79.16 $\pm$ 0.47
Galantamine	83.09 $\pm$ 0.80	75.77 $\pm$ 0.98

rial activity, the comparison of lipophilicity revealed the order: MTE > Ampicillin > MTA and the antifungal activity show the order MTE > Nystatin > MTA. It can be concluded that a strong influence of the partition coefficient,  $\log P$ , for antimicrobial activity. This evidence was clearly described in the lipid theory advanced by Meyer and Overton. According to this theory,  $\log P$  is a measure of hydrophobicity, which is important not only for the penetration and distribution of a drug, but also for the interaction of the drug with receptors. Therefore, it can be suggested that lipophilic properties should be checked in the design of potent antibacterial agents as they are deciding factors for their activity.

#### Acetylcholine/butyrylcholine esterase study

To determine the potential interest of the MTA and MTE synthesized, AChE and butyrylcholinesterase (BuChE) inhibitory potency was evaluated according to a modified Ellman method. All the obtained compounds were tested at  $10^{-3}$  M concentration and the AChE/BuChE inhibitory results are outlined in Table 14. As shown in Table 14, all the synthesized compounds gave moderate to good enzyme inhibition activity. MTE with 92.70 $\pm$ 0.9% and 79.1  $\pm$  0.4% inhibition values showed the best anti-AChE and anti-BuChE activities among tested compounds. MTA also showed strong activity

in AChE and BuChE enzymes inhibitory activity ( $67.3 \pm 0.5\%$  and  $34.8 \pm 0.7\%$  inhibition). We can say that MTE showed better activity than MTA looking at Table 14.

#### 4. Conclusion

In conclusion, we have synthesized two phosphorylated molecules; *O*-aminophosphonic acid (MTA) *O*-aminophosphonate ester (MTE) by an easy and efficient microwave-assisted method with good yields (87%/MTA and 92%/MTE) in few minutes (4–8 min/MTA and 5–10 min/MTE). All of the obtained compounds were characterized by spectroscopic methods. The spectral results are in good line with the proposed structures. The synthesized compounds was subjected to computational studies by using B3LYP/6–31G++(d,p) level theory by (DFT) calculations. Results shows that MTE has low energy gap, low hardness, greater softness and higher electrophilicity and MTA has high energy gap, high hardness and low softness. So, it clear that aminophosphonic acid (MTA) is the most stable and the least reactive than that other molecule. In addition, the target compounds were evaluated for their evaluated for their in vitro antioxidant, antimicrobial and antienzymatic activities. Antioxidant activities by using DPPH and ABTS assays were carried in order to compare the results obtained by both the two methods. MTA was found to have better antioxidant activity compared to MTE. The biological assays indicated that these compounds displayed potent inhibitory activity toward acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE). It was also found that they act as excellent microbial agents. These compounds exhibited the highest antibacterial and antifungal properties. The results are very encouraging, so we can say that these products are biologically active and can be used later in other applications towards drug development.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### CRediT authorship contribution statement

**Ines Haddadi:** Conceptualization, Methodology, Resources, Writing – original draft. **Abdelkader Hellal:** Conceptualization, Methodology, Validation, Software, Writing – original draft, Supervision. **Imene Kirouani:** Supervision, Investigation.

#### Acknowledgement

The authors wish to acknowledge department of Chemistry, Faculty of Sciences. University of Sétif 1-Algeria.

#### References

- M.A. Didi, D. Villemin, Phosphonic and Aminophosphonic acids. Synthesis and Applications, Editions Universitaires Européennes, OmniScriptum Publishing, Saarbrücken, Germany, 2018 ISBN 978-620-2-27586-6.
- K.D. Troev, Chemistry and Application of H-Phosphonates, Elsevier, Amsterdam. The Netherlands, 2006 ISBN 9780444527370.
- V.P. Kukhar, H.R. Hudson, Aminophosphonic and Aminophosphinic Acids: Chemistry and Biological Activity, John Wiley, Chichester, UK, 2000 ISBN 0-471-89149-1.
- C.S. Rye, J.B. Baell, Phosphate isosteres in medicinal chemistry, *Curr. Med. Chem.* 12 (2005) 3127–3141.
- M. Maslanka, A. Mucha, Recent developments in peptidyl diaryl phosphonates as inhibitors and activity-based probes for serine proteases, *Pharmaceuticals* 12 (2019) 86.
- D. Ouimette, M. Coffey, Comparative antifungal activity of four phosphonate compounds against isolates of nine Phytophthora species, *Phytopathology* 79 (1989) 761–767.
- A. Hellal, S. Chafaa, N. Chafai, L. Touafri, Synthesis, antibacterial screening and DFT studies of series of *O*-amino-phosphonates derivatives from aminophenols, *J. Mol. Str.* 1134 (2017) 217–225.
- I. Kirouani, A. Hellal, I. Haddadi, H. Layaida, A. Madani, S. Madani, M.F. Haroun, R. Djebaili, L. Touafri, C. Bensouici, Effect of the phosphonomethylene moiety on the structural, vibrational, energetic, thermodynamic and optical properties of ((Phenylcarbamoylmethyl-phosphonomethyl-amino)-methyl)-phosphonic acid: DFT investigation, *J. Mol. Str.* 1215 (2020) 128193.
- O. Larbi Bouamrane, A. Hellal, K. Hachama, L. Touafri, I. Haddadi, H. Layaida, I. Kirouani, A. Hassani, M. Mersellem, A. Madani, C. Bensouici, Effect of the bifunctionalization of aminomethylphosphonic acid on the structural, electronic, vibrational, thermodynamic and antioxidant activity: microwave-assisted synthesis, *Density Functional Theory studies and DPPH radical scavenging activity*, *J. Mol. Str.* 1250 (2022) 131714 Part 1.
- S.S. Sonar, S.A. Sadaphal, V.B. Labade, B.B. Shingate, M.S. Shingare, An efficient synthesis and antibacterial screening of novel oxazepine *O*-aminophosphonates by ultrasound approach, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* 185 (2010) 65–73.
- M.V. Reddy, B.S. Kumar, A. Balakrishna, C. Reddy, S. Nayak, One-pot synthesis of novel amino phosphonates using tetramethylguanidine as a catalyst, *ARKIVOC* 15 (2007) 246–254.
- A.B. Danne, S.V. Akolkar, T.R. Deshmukh, M.M. Siddiqui, B.B.A.J. Shingate, One-pot facile synthesis of novel 1, 2, 3-triazole-appended *O*-aminophosphonates, *Iran. Chem. Soc.* 16 (2019) 953–961.
- M.J. Bloemink, J.J. Diederer, J.P. Dorenbos, R.J. Heetebrij, B.K. Keppler, J. Reedijk, Calcium ions do accelerate the DNA binding of new antitumor-active platinum aminophosphonate complexes, *Eur. J. Inorg. Chem.* (1999) 1655–1657.
- A. Hellal, S. Chafaa, L. Touafri, An eco-friendly procedure for the efficient synthesis of diethyl *O*-aminophosphonates in aqueous media using natural acids as a catalyst, *Korean J. Chem. Eng.* 33 (8) (2016) 2366–2373.
- A. ripolszky, E. Tóth, P.T. Szabó, L. Hackler, B. Kari, L.G. Puskás, E. Bálint, Synthesis and In Vitro Cytotoxicity and Antibacterial Activity of Novel 1,2,3-Triazole-5-Yl-Phosphonates, *Molecules* 25 (2020) 2643.
- X. Rao, Z. Song, L. He, Synthesis and antitumor activity of novel aminophosphonates from diterpenidehydroabietylamine, *Heteroatom Chem* 19 (2008) 512–516.
- Y. Xu, K. Yan, B. Song, G. Xu, S. Yang, W. Xue, Synthesis and antiviral bioactivities of *O*-aminophosphonates containing alkoxyethyl moieties, *Molecules* 11 (2006) 666–676.
- M. Mehri, N. Chafai, L. Oukel, K. Benbouguerra, A. Hellal, S. Chafaa, Synthesis, electrochemical and classical evaluation of the antioxidant activity of three *O*-aminophosphonic acids: experimental and theoretical investigation, *J. Mol. Str.* 1171 (2018) 179–189.
- E.K. Fields, The synthesis of esters of substituted aminophosphonic acids, *J. Am. Chem. Soc.* 74 (1952) 1528.
- K. Moedritzer, R. Irani, The direct synthesis of *O*-aminomethylphosphonic acids. Mannich-type reactions with orthophosphorous acid, *J. Org. Chem* 31 (1966) 1603–1607.
- D. Villemin, M.A. Didi, Aminomethylenephosphonic acids syntheses and applications (a review), *Orient. J. Chem.* 31 (2015) 1–12.
- K. Justyna, J. Malolepsza, D. Kusy, W. Maniukiewicz, K.M. Błażewska, The McKenna reaction—Avoiding side reactions in phosphonate deprotection, *Beilstein J. Org. Chem.* 16 (2020) 1436–1446.
- M.I. Kabachnik, T.Y. Medved, N.M. Dyatlova, O.G. Arkhipova, M.V. Rudomino, Organophosphorus complexes, *Russ. Chem. Rev.* 37 (1968) 503–518.
- M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery, J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, O. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, Gaussian 09, Revision A. 02, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, *Phys. Rev.* 37 (2) (1988) 785–789 B.
- A.D. Becke, Density-functional thermochemistry III. The role of exact exchange, *J. Chem. Phys.* 98 (7) (1993) 5648–5652.
- J.M. Herbert, Dielectric continuum methods for quantum chemistry, *WIREs Comput Mol Sci* 11 (2021) e1519.
- Y.R. Lu, A. Aktumsek, L.Y. Foo, Antioxidant and Radical Scavenging Activities of Polyphenols from Apple Pomace, *Food. Chem.* 68 (2013) 81–85.
- M.B. Arnao, A. Cano, M. Acosta, The hydrophilic lipophilic contribution to total antioxidant activity, *Food Chem* 73 (2001) 239.
- B.Z. Kurt, I. Gazioglu, F. Sonmez, M. Kucukislamoglu, Synthesis, antioxidant and anticholinesterase activities of novel coumarylthiazole derivatives, *Bioorg. Chem.* 59 (2015) 80–90.
- R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggeente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay, *Free. Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 1231–1237.

- [32] Ellman G.L., Courtney K.D., Andres Jr. V., Featherstone R.M., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*;7(2):88–95(1961).
- [33] S. Shahid, M.A. Raza, S. Ur-Rehman, *Afr. J. Biotechnol.* 8 (2009) 19.
- [34] R.S. Mulliken, *J. Chem. Phys.* 23 (1955) 1833–1840.
- [35] D. Cecily Mary Glory, R. Madivanane, K. Sambathkumar, Electronic Structure Investigations of 3 and 5- Diamino-1,2,4-Tria-zole By UV-Visible, NMR Spectral Studies and HOMO-LUMO Analysis by AB Initio and DFT Calculations, *Elixir Comp. Chem.* 89 (2015) 36730–36741.
- [36] R.G. Pearson, Absolute electronegativity and hardness: applications to organic chemistry, *J Org Chem* 54 (1989) 1423–1430.
- [37] M. Khalid, H. Munnazza Lodhi, M.U. Khan, M. Imran, Structural parameter–modulated nonlinear optical amplitude of acceptor– $\pi$ –D– $\pi$ –donor-configured pyrene derivatives: a DFT approach, *RSC Adv.* 11 (2021) 14237–14250.
- [38] M.U. Khan, M. Khalid, M. Ibrahim, A.A.C. Braga, M. Safdar, A.A. Al-Saadi, M.R.S.A. Janjua, First Theoretical Framework of Triphenylamine–Dicyanovinylene-Based Nonlinear Optical Dyes: structural Modification of  $\pi$ -Linkers, *J. Phys. Chem. C* 122 (2018) 4009–4018.
- [39] M.R.S.A. Janjua, M.U. Khan, B. Bashir, M.A. Iqbal, Y. Song, S.A.R. Naqvi, Z.A. Khan, Effect of  $\pi$ -conjugation spacer (CC) on the first hyperpolarizabilities of polymeric chain containing polyoxometalate cluster as a side-chain pendant: a DFT study, *Comput. Theor. Chem.* 994 (2012) 34–40.
- [40] M. Khalid, A. Ali, R. Jawaria, M.A. Asghar, S. Asim, M.U. Khan, R. Hussain, M.F. ur Rehman, C.J. Ennis, M.S. Akram, First principles study of electronic and nonlinear optical properties of A–D– $\pi$ –A and D–A–D– $\pi$ –A configured compounds containing novel quinoline–carbazole derivatives, *RSC Adv.* 10 (2020) 22273–22283.
- [41]
- R. Al-Asadi, B. Saeed, T. Fahad, Molecular structure, vibrational spectroscopic and HOMO/LUMO studies of some organotellurium compounds by quantum chemical investigations, *Eur. J. Chem.* 6 (3) (2015) 248–253.
- [42] T. Koopmans, Über die Zuordnung von Wellenfunktionen und Eigenwerten zu den Einzelnen Elektronen Eines Atoms, *Physica* 1 (1934) 104.
- [43] T.A. Koopmans, über Die Zuordnung Von Wellenfunktionen Und Eigenwerten Zu Den Einzelnen Elektronen Eines Atoms, *Physica* 1 (1934) 104–113.
- [44] P. Pérez, L.R. Domingo, A. Aizman, R. Contreras, The Electrophilicity Index in Organic Chemistry, *Theoretical Aspects of Chemical Reactivity*, 19, Elsevier, New York, NY, USA, 2007 Volume.
- [45] R.G. Parr, R.G. Pearson, Absolute hardness: companion parameter to absolute electronegativity, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 7512–7516.
- [46] R.G. Parr, W. Yang, *Density-functional Theory of Atoms and Molecules*, Oxford University Press, New York/Oxford, 1989.
- [47] R.G. Parr, R.A. Donnelly, M. Levy, W.E. Palke, Electronegativity: the density functional viewpoint, *J. Chem. Phys.* 68 (1978) 3801.
- [48] P. Thul, P. Guptav, V.J. Ram, P. Tandon, Structural and spectroscopic studies on 2-pyranones, *Spectrochim. Acta A* 75 (2010) 260.
- [49] S.Y. Ebrahimipour, I. Sheikhshoae, A. Crochet, M. Khaleghi, K.M. Fromm, A new mixed-ligand copper(II) complex of (E)-N<sup>F</sup>-(2-hydroxybenzylidene) acetohydrazide: synthesis, characterization, NLO behavior, DFT calculation and biological activities, *J. Mol. Str.* 1072 (2014) 267–276.
- [50] J.B. Ott, J. Boerio-Goates, *Calculations from Statistical Thermodynamics*, Academic Press, 2000.
- [51] M.H. Jamróz, *Vibrational Energy Distribution Analysis VEDA 4*, Warsaw, 2004–2010.
- [52] HyperChem(TM) Professional 8.0, Hypercube, Inc., 1115 NW 4th Street, Gainesville, Florida 32601, USA.

قما خلال هذا العمل بتطوير عملية تحضير نالذة مشتقات ألفا-أمينوفوسفونيت: استرانيين ألفا-أمينوفوسفونيت وحمض ألفا-أمينوفوسفونيك بطريقتين: طريقة الرجاء الكالسيلية وطريقة الميكروويف بهدف اختيار الطريقة المناسبة من حيث المردود وزمن التفاعل من خلال دراسة مقارنة. تم تصنيع حمض ألفا-أمينوفوسفونيك (MTA) واسنر ألفا-أمينوفوسفونيت (MTE) من م-تولويدن، في حين تم تصنيع إسنر ألفا-أمينوفوسفونيت من 2-أمينو-5-مثنيلفينول. تم نسخ بخص جمنع المركبات التي تم الحصول عليها بطرق التحليل المجهرية الطيفية UV-Vis، FT-IR، <sup>1</sup>H-NMR و<sup>31</sup>P-NMR. نتائج التحليل تتفق بشكل جيد مع الهياكل المقترحة. تم إجراء حسابات نظرية DFT باستخدام برنامج Gaussian09، بواسطة الأساس 6-31G++(d,p). تم عرض طاقات المدارات المحددة واستخدامها للتنبؤ بمؤشرات التفاعل العالمية. كما تم حساب ومناقشة الشحنات الذرية لموليدن والعزم ثنائي القطب والخصائص الديناميكية الحرارية. بالإضافة إلى ذلك، تم تقييم المركبات المستهدفة لنشاطها المضاد للأكسدة، والمضادة للميكروبات، والألزيمية في المختبر. أشارت الاختبارات البيولوجية إلى أن هذه المركبات أظهرت نشاطاً مضاداً للزيم الأستيل كولينيريل ولولين ستراتاز. لؤد أثبتت أيضاً أنها عوامل مضادة للأكسدة ممتازة، وتمتلك خصائص رائعة مضادة للبكتيريا والفطريات.

الكلمات المفتاحية: ألفا-أمينوفوسفونيت، الميكروويف، DFT، مضادات الأكسدة، مضاد للجراثيم، مضاد للفطريات.

### Résumé :

Au cours de ce travail, une synthèse de trois dérivés d' $\alpha$ -aminophosphonates a été mise au point : deux esters  $\alpha$ -aminophosphonates et un acide  $\alpha$ -aminophosphonique. Les dérivés ont été synthétisés par deux méthodes: une méthode classique à reflux et une autre sous micro-ondes dans le but de choisir la bonne méthode en termes de rendement et de temps de réaction par une étude comparative. L'acide  $\alpha$ -aminophosphonique (MTA) et l'ester  $\alpha$ -aminophosphonate (MTE) ont été synthétisés à partir de la m-toluidine, tandis que l'ester  $\alpha$ -aminophosphonate a été synthétisé à partir du 2-amino-5-méthylphénol. Tous les composés obtenus ont été caractérisés par des méthodes spectroscopiques de microanalyse : UV-Vis, FT-IR, la <sup>1</sup>H-RMN et la <sup>31</sup>P-RMN. Les résultats d'analyses sont en bon accord avec les structures proposées. Les calculs de la théorie DFT ont été effectués à l'aide du logiciel Gaussian09, en utilisant la base 6-31G++(d,p). Les énergies des orbitales limites ont été présentées et utilisées pour prédire les indices de réactivité globale. Les charges atomiques de Mulliken, le moment dipolaire et les propriétés thermodynamiques ont également été calculés et discutés. En outre, les composés cibles ont été évalués pour leurs activités antioxydantes, antimicrobiennes et enzymatiques *in vitro*. Les tests biologiques ont indiqué que ces composés présentaient une puissante activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase. Ils se sont également révélés être d'excellents agents antioxydants, possédant des propriétés antibactériennes et antifongiques remarquables.

**Mots clés :**  $\alpha$ -aminophosphonate, micro-ondes, DFT, anti-oxydante, antibactérienne, antifongique.

### Abstract:

During this work, a synthesis of three  $\alpha$ -aminophosphonate derivatives was developed: two  $\alpha$ -aminophosphonate esters and an  $\alpha$ -aminophosphonic acid. The derivatives were synthesized by two methods: a classic reflux method and another under microwave with the aim of choosing the right method in terms of yield and reaction time through a comparative study.  $\alpha$ -Aminophosphonic acid (MTA) and  $\alpha$ -aminophosphonate ester (MTE) were synthesized from m-toluidine, while  $\alpha$ -aminophosphonate ester was synthesized from 2-amino-5-methylphenol. All the compounds obtained were characterized by spectroscopic microanalysis methods: UV-Vis, FT-IR, <sup>1</sup>H-NMR and <sup>31</sup>P-NMR. The analysis results are in good agreement with the proposed structures. The DFT theory calculations were carried out using the Gaussian09 software, using the 6-31G++(d,p) basis. The energies of the limiting orbitals were presented and used to predict global reactivity indices. Mulliken atomic charges, dipole moment and thermodynamic properties were also calculated and discussed. Additionally, the target compounds were evaluated for their antioxidant, antimicrobial, and enzymatic activities *in vitro*. Biological assays indicated that these compounds exhibited potent acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity. They have also proven to be excellent antioxidant agents, possessing remarkable antibacterial and antifungal properties.

**Key words:**  $\alpha$ -aminophosphonate, microwave, DFT, antioxidant, antibacterial, antifungal.