

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

École Nationale Polytechnique d'Alger

Département du Génie de l'environnement

Laboratoire de Bioengineering et Génie des Procédés



Thèse de Doctorat en Sciences

Spécialité : Génie de l'Environnement

Présentée par :

M^{me} HAMDI Nejla

Synthèse non conventionnelle de nouvelles séries hétérocycliques potentiellement actives. Caractérisation des fluorophores et optimisation de la réaction de radioiodation

Soutenue publiquement le : 12/03/2020 devant le jury composé de :

Président :	Mr N. Mameri	Professeur	ENP
Rapporteurs :	Mr H. Grib	Professeur	ENP
	Mme M.Makhloufi-Chebli	Professeur	UMMTO
Examineurs :	Mr M. Drouiche	Professeur	ENP
	Mme D. Oukacha-Hikem	MCA	UMMTO
	Mme Y. Belmiloud	Professeur	USTHB

ENP 2020

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



École Nationale Polytechnique d'Alger

Département du Génie de l'environnement

Laboratoire de Bioengineering et Génie des Procédés



Thèse de Doctorat en Sciences

Spécialité : Génie de l'Environnement

Présentée par :

M^{me} HAMDI Nejla

Synthèse non conventionnelle de nouvelles séries hétérocycliques potentiellement actives. Caractérisation des fluorophores et optimisation de la réaction de radioiodation

Soutenue publiquement le : 12/03/2020 devant le jury composé de :

Président :	Mr N. Mameri	Professeur	ENP
Rapporteurs :	Mr H. Grib	Professeur	ENP
	Mme M.Makhloufi-Chebli	Professeur	UMMTO
Examineurs :	Mr M. Drouiche	Professeur	ENP
	Mme D. Oukacha-Hikem	MCA	UMMTO
	Mme Y. Belmiloud	Professeur	USTHB

ENP 2020

Dédicaces

Je dédie ce travail :

A mes très chers parents

A mon fils

A mes frères

A toute ma famille

A mes ami(e)s

A tous ceux qui aiment la science

REMERCIEMENTS

*Une grande partie de ce travail a été effectuée au Laboratoire de Chimie organique appliquée (groupes hétérocycles) de l'Université U.S.T.H.B d'Alger, je remercie tous les membres du laboratoire ainsi que son directeur Madame le Professeur **Baya Boutemeur***

*J'exprime mes profonds remerciements et ma vive connaissance à Monsieur **H.Grib**, Professeur à l'École Nationale Polytechnique (ENP) pour la confiance, la sympathie et la disponibilité qu'il m'a témoignée durant mon parcours de la post-graduation ainsi que pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique.*

*J'adresse mes sincères remerciements à Madame **M.Makhloufi-Chebli**, Professeur à l'université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou UMMTO pour avoir co-dirigé ce travail, je tiens à lui exprimer ma profonde et sincère gratitude pour l'attention et l'intérêt constants qu'elle a porté à mon travail de recherche: son soutien, ses conseils avisés, sa rigueur et sa passion dans le domaine de la recherche m'ont permis d'apprendre énormément à ses côtés. Elle s'est dépensée, sans compter, notamment en effectuant, avec une ardeur soutenue, les caractérisations de tous mes produits à l'Université d'Aveiron (Portugal), je ne la remercierai jamais assez. Mes remerciements vont aussi à Monsieur le Professeur **M. S. Artur Silva**, Professeur à l'Université d'Aveiro au Portugal qui a mis à la disposition de Mme Makhloufi tout le matériel nécessaire pour la caractérisation de mes produits.*

*Je remercie vivement Monsieur **N.Maméri**, Professeur à l'École Polytechnique d'Alger qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider le jury et de valoriser de sa précieuse présence mon modeste travail.*

*J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur **M.Drouiche**, Professeur à l'École Polytechnique d'Alger d'avoir accepté d'examiner cette thèse, pour l'honneur qu'il me fait d'accepter d'être membre de ce jury.*

*Que Madame **D.Oukacha-Hikem**, MCA à l'université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou UMMTO, trouve ici mes sincères remerciements, pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant d'être membre de ce jury.Elle m'honore de sa présence.*

*J'exprime également ma toute grande reconnaissance à Madame **Y.Belmiloud**, Professeur à la faculté de Chimie de l'USTHB d'Alger, qui en acceptant de juger mon travail, ne peut trouver en ces lignes que mes sincères et chaleureux remerciements.*

*Je souhaite faire part de ma plus profonde gratitude à chacun des membres de ma famille. Je ne remercierai jamais assez **mes chers parents** que j'espère avoir rendu fiers de moi. Ce travail n'aurait jamais pu aboutir sans leur soutien et leur confiance, je leur dédie donc cette thèse.*

*Je tiens à remercier profondément **mes frères Safouane et Adel** qui m'ont toujours soutenue et encouragée.*

ملخص :

تم استعمال مؤشرات التفاعل النظرية في تجارب الأيودة الباردة لمجموعة من مشتقات الكومارين . وقد تمت تجارب تحسين الأيودة باليود المشع على مركب (2-hydroxybenzoyl) coumarine 3- كما تمت تجارب الأيودة على مشتقات الكومارين التي بينت الحسابات النظرية أن لها خاصية نيوكوفيلية معتبرة بينت التجارب أن التفاعل لا يتم مع المركبين 5 و 6 بل هناك تفاعل تعلق داخل الجزيء ليعطي المركبين 7 و 8 . وتعتبر الطريقة المقترحة في البحث ناجحة في تجارب الأيودة باليود لأنها اقتصادية و محترمة للبيئة. تمت دراسة سلوك للمركبات 5 و 6 في مذيبات مختلفة في درجة حرارة الغرفة . مع المركبين 5 و 6 ظهرت الانبعاثات في 371 نانومتر و 422 نانومتر مع فارق Stokes بمقدار كبير بين 45 و 74 نانومتر . وقد لوحظت قيم أكبر لجهد ثنائي القطب في الحالة المثارة مقارنة بقيم الحالة الأساسية مما يشير إلى تنقل الشحنة داخل الجزيئات (ICT) . تم حساب الخواص الهيكلية والطيافية الإلكترونية لـ 5 و 6 في الغاز وفي المذيبات المختلفة بواسطة نموذج التواصل المستمر القابل للاستقطاب (CPCM). وتمت دراستها بحسابات DFT / TD-DFT لأخذ بعين الاعتبار التفاعل ذاتي/مذيب. كما حسبت طاقات الإثارة و قوة التذبذب ومستويات HOMO-LUMO في الطور الغازي والسائل. وعند مقارنة توزيع الشحنة الدرية لـ 5 و 6 في الحالة الأساسية والمثارة تلاحظ كذلك ظاهرة تنقل الشحنة داخل الجزيئات. وقد أجريت دراسة مضادة للبكتيريا ومضادات الأكسدة للمركبات 5 , 6, 7 و 8 وأظهرت النتائج أن 5 فقط لديه نشاط ضد سلالات جراثيم Gram+ . والمركب 7 فقط لديه نشاط مضاد للأكسدة. أما المركبان 6 و 8 فقد أظهرتا نشاطا مضادا للخلايا السرطانية.

الكلمات الدالة: 3-(2-hydroxybenzoyl) coumarine , حسابات الكيمياء النظرية , الأيودة , اليود المشع, اقتراح إستراتيجية اقتصادية وحفاظة على البيئة . سلوك المركبات في المذيبات. جهد ثنائي القطب. النشاطات البيولوجية.

Abstract:

Combination of the calculation of reactivity descriptors and the cold iodine test for some coumarin derivatives: 3-(2-hydroxybenzoyl) coumarins was used in order to optimize the radioiodination reaction. The strongly nucleophilic predicted coumarins were subjected to the action of cold iodine. With two coumarins substituted at 3 by the 2-hydroxybenzoyl group (Compounds 5 and 6), iodination did not occur but a product of intramolecular heterocyclization was obtained (compounds 7 and 8). This strategy is useful for economic and environmentally friendly radioiodination. Solvatochromic behaviour of compounds 5 and 6 has been studied in different solvents at room temperature. Both derivatives show emission at 371 nm and 422 nm with large Stokes shift of 45 and 74 nm, respectively. Higher values of dipole moment have been observed for excited state compared to the corresponding ground state values, indicating an intramolecular charge-transfer (ICT). The electronic structural and spectroscopic properties of 5 and 6 in gas and in different solvents were calculated by the conductor-like polarizable continuum model (CPCM) and have been investigated by DFT/TD-DFT calculations to account for solute-solvent interaction. Excitation energies and oscillator strengths were calculated and HOMO-LUMO levels have been investigated in gas and solvent phases. The comparison of the atomic charge distributions in the ground and excited states of both 5 and 6 rotamers implies also the intramolecular charge transfer (ICT) process during the excitation period. Antibacterial and antioxidant study was performed for compounds 5, 6, 7 and 8 and the results showed that only 5 has an antibacterial activity against the strains Gram + and only compound 7 has antioxidant activity. Compounds 6 and 8 shown a cytotoxic activity.

Keywords: 3-(2-Hydroxybenzoyl) coumarins , theoretical calculation, cold-iodination, radioiodination, ecofriendly strategy, solvatochromic method, dipole moment, biological activities

Résumé:

Une combinaison du calcul des indices de réactivité et du test à l'iode "froid" de certains dérivés de la coumarine: 3-(2-hydroxybenzoyl) coumarine a été utilisée afin d'optimiser la réaction de radioiodation. Les coumarines prédites comme fortement nucléophiles ont été soumises à l'action de l'iode froid. Avec deux coumarines substituées en 3 par le groupe 2-hydroxybenzoyl (Composés 5 et 6), il n'y a pas eu d'iodation mais un produit d'hétérocyclisation intramoléculaire a été obtenu (composés 7 et 8). Cette stratégie s'est révélée utile pour une radio-iodation économique et écologique. Le comportement solvatochromique des composés 5 et 6 a été étudié dans différents solvants à température ambiante. Les deux dérivés montrent une émission à 371 nm et 422 nm avec respectivement un décalage de Stokes important de 45 et 74 nm. Des valeurs plus élevées du moment dipolaire ont été observées à l'état excité par rapport aux valeurs correspondantes de l'état fondamental, indiquant un transfert de charge intramoléculaire (TIC). Les propriétés structurelles et spectroscopiques électroniques dans le gaz de 5 et 6 dans différents solvants ont été calculées à l'aide du modèle de continuum polarisable de type conducteur (CPCM) et ont été étudiées par des calculs DFT / TD-DFT afin de prendre en compte l'interaction soluté-solvant. Les énergies d'excitation et les forces de l'oscillateur ont été calculées et les niveaux d'HOMO-LUMO ont été étudiés en phase gazeuse et en phase liquide. La comparaison des distributions de charge atomique dans les états fondamentaux et excités des rotamères 5 et 6 implique également le processus de transfert de charge intramoléculaire (TIC) au cours de la période d'excitation. Une étude antibactérienne et antioxydante a été réalisée pour les composés 5, 6, 7 et 8 et les résultats ont montré que seul le composé 5 avait une activité antibactérienne contre les souches Gram + et que seul le composé 7 avait une activité antioxydante. Les composés 6 et 8 ont montré une activité cytotoxique.

Mot-clés: 3-(2-Hydroxybenzoyl) coumarines, calculs théoriques, iodation, radio-iodination, stratégie écologique, méthode solvatochromique, moment dipolaire, activités biologiques.

Table des matières

Liste des figures	
Liste des schemas	
Liste des tableaux	
Liste des abbreviations	
Introduction générale	14
Références bibliographiques	16

CHAPITRE I : Généralités

I.1. Généralités sur les coumarines	18
I.1.1. Intérêt biologique et médicales des coumarines	18
I.1.2. Autres applications	18
I.1.3. Valorisations des coumarines par spectroscopie UV/Vis et fluorescence	19
I.1.4. Solvatochromisme des sondes coumariniques	19
I.1.5. Activité antioxydante des coumarines	20
I.1.6. Etat de l'art de la synthèse des dérivés coumariniques à partir de la 4-hydroxycoumarine	21
I.2. Les fours à micro-ondes et leurs usages	23
I.2.1. Introduction	23
I.2.2. Les micro-ondes	23
I.2.3. Domaines d'utilisations des micro-ondes	24
I.2.4. Différence entre le chauffage par micro-ondes et le chauffage thermique en synthèse organique	25
I.3. Rappel sur la radioactivité et les rayonnements ionisants	26
I.3.1. La radioactivité	26
I.3.1.1. Notions sur la radioactivité	26
I.3.1.1.1. Généralités	26
I.3.1.1.2. Les lois de la radioactivité	28
I.3.1.1.3. Les principales transformations radioactives	29
I.3.1.1.4. Capture électronique CE et capture avec émission gamma	31
I.4. Radioprotection et gestions des déchets	32
I.4.1. Les principes de la radioprotection	32
I.4.2. Gestions des déchets radioactifs	33
I.4.3. Procédés applicables à la gestion des déchets et des effluents radioactifs	34
I.4.3.1. Les déchets solides	34
I.4.3.2. Les déchets liquides	36
I.4.4. L'utilisation des rayonnements ionisants en médecine nucléaire	36
I.5. Stratégie de marquage à l'iode	37

I.5.1. Isotopes principalement utilisés	38
I.5.2. Propriétés physico-chimiques des halogènes	39
I.5.3. Les principales réactions de marquage à l'iode	40
I.5.4. Les agents d'iodation	45
I.6. Méthode de la chimie quantique	47
I.6.1. Les indices globaux de réactivité	50
I.6.1.1. Electronegativité et potentiel chimique électronique	50
I.6.1.2. Dureté et mollesse chimiques	50
I.6.1.3. Electrophilie globale	50
I.6.1.4. Nucléophilie globale	50
I.6.2. Les indices locaux de réactivité	51
I.6.2.1. Indice de Fukui	51
I.6.2.2. Nucléophilie locale	52
I.6.3. Méthodologie de calcul	53
I.7. Valorisations des dérivés coumariniques par étude UV/Vis, fluorescence et calcul des moments dipolaires	53
I.7.1. Notions fondamentales sur la fluorescence	54
I.7.2. Rendement quantique de la fluorescence	59
I.7.3. Moment dipolaire	60
I.7.3.1. Calcul du moment dipolaire par la méthode simulation (méthode théorique)	60
I.7.3.2. Calcul du moment dipolaire par la méthode solvatochromique	60
I.8. Etude des activités biologiques, antioxydantes et cytotoxiques	61
Références bibliographiques	62

CHAPITRE II : Matériel et méthodes expérimentales

II.1. Les coumarines synthétisées	76
II.2. Les réactifs	77
II.3. Les appareils	77
II.4. Matériel biologiques et milieu de culture	79
II.5. Méthodes et techniques de purification	80
II.6. Techniques d'identification structurale	81
II.7. Synthèse des dérivés coumariniques	85
II.8. Théorie et détails de calcul des indices de réactivité	86
II.9. Iodation des composés synthétisés	87
II.10. Le marquage « froid »	88
II.11. Le marquage à l'iode 125	89
II.12. Détermination des spectres électroniques d'absorption, de fluorescence et des moments dipolaires	90
II.13. Etude de l'activité biologique	90
II.13.1. Etude de l'activité anti -bactérienne	90
II.14. Evaluation du pouvoir antiradicalaire par la méthode du DDPH	94

II.15. Etude de l'activité cytotoxique	95
Références bibliographiques	99

CHAPITRE III : Résultats et discussions

III.1. Synthèse des dérivés coumariniques	103
III.2. Approche théorique de la réactivité chimique	104
III.2.1. Méthodologies des calculs	104
III.3. Calculs des indices de réactivités globaux	105
III.4. Calculs des fonctions de Fukui et de la nucléophilie locale N_K	106
III.5. Iodation des composés 4 , 5 et 6	109
III.5.1. Iodation du composé 4	109
III.5.2. Iodation des composés 5 et 6	112
III.5.3. Mécanisme de la réaction de cyclisation	114
III.6. Marquage du composé 4 à l'iode 125	116
III.7. Calcul du rendement quantique et des moments dipolaires	118
III.7.1. Détermination des spectres électroniques d'absorption et d'émission de fluorescence	118
III.7.2. Calcul du moment dipolaire à l'état fondamental et excité par la méthode solvatochromique	123
III.7.3. Calcul du moment dipolaire par la méthode théorique (méthode de simulation)	129
III.7.3.1. La stabilité relative	129
III.7.3.2. Les moments dipolaires	131
III.7.3.3. Calculs chimiques quantiques	132
III.8. Etude de l'activité biologique	140
III.8.1. Lecture des antibiogrammes : Méthode de diffusion sur milieu solide	140
III.8.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice	142
III.9. Activité antioxydante	142
III.10. Activité cytotoxique	144
Références bibliographiques	146

Conclusion générale

Conclusion générale	150
Annexe	154

Listes des figures

Figure I.1 : Quelques coumarines simples ou fusionnées, à activité antioxydante	20
Figure I.2 : Le spectre électromagnétique	23
Figure I.3 : Bandes électromagnétiques	24
Figure I.4 : Comparaison excitation conventionnelle/excitation micro-ondes	25
Figures I.5 : Schéma illustratif d'un atome	27
Figure I.6 : Les différents isotopes de l'hydrogène	28
Figure I.7 : La décroissance radioactive	29
Figure I.8 : Emetteur B^+ de positon	31
Figure I.9 : Parcours de rayonnements α , β^- , β^+ , et γ	37
Figure I.10 : Diagramme de Jablonsky	55
Figure I.11 : La fluoréscine et un de ses dérivés	58
Figure I.12 : Coumarine 30	58
Figure II.1 : Composés étudiés	76
Figure II.2 : Développement des souches bactérienne dans les boîtes de Pétri après incubation pendant 24H	92
Figure III.1 : Structure du composé 4 iodé	109
Figure III.2 : Chromatogramme du composé 4	111
Figure III.3 : Chromatogramme du composé 4 iodé	111
Figure III.4 : Structure chimique des composés 7 et 8 obtenus après iodation	113
Figure III.5 : Les principales corrélations NOESY et HMBC du composé 8	116
Figure III.6 : Pureté radiochimique du composé 4- ^{125}I	117
Figure III.7 (a-d) : Spectres UV/vis des composés (a) 5 , (b) 6 , (c) 7 et (d) 8 dans différents solvants	120
Figure III.8 (a-d) : Spectre d'émission des composés (a) 5 , (b) 6 , (c) 7 et (d) 8 dans différents solvants	121
Figure III.9 (a-b) : Différence des Stokes en utilisant l'équation (1) dans différents solvants (a) pour 5 et (b) pour 6	126
Figure III.10 : Variation de Stokes avec $\Phi(\epsilon, n)$ en utilisant l'équation (2) dans différents solvants (a) pour 5 et (b) pour 6	126
Figure III.11 : Variation de Stokes avec la polarité microscopique du solvant (E_T^N)	

en utilisant l'équation (12) dans différents solvants pour 5 (a) et 6 (b)	128
Figure III.12 : Résonance possible des structures des coumarines 5 et 6	129
Figure III.13 : Représentation schématique des différents rotamères des coumarines 5 et 6	130
Figure III.14 : Numérotation arbitraire pour faciliter la comparaison	132
Figure.III.15a : Géométrie optimisée à l'état fondamental des composés 5 et 6 et à l'état singulet excité ainsi que la direction des moments dipolaires	133
Figure III.15b : Géométrie optimisée à l'état fondamental des composés 5 et 6 et à l'état singulet excité ainsi que la direction des moments dipolaires.	133
Figure III.16a : Représentation 3D des orbitales frontières HOMO et LUMO dans la phase gazeuse état fondamental de 5a et 6a	137
Figure.III.16.b : Représentation 3D des orbitales frontières HOMO et LUMO à l'état le plus faiblement excité de 5a et 6a	137
Figure III.17a : Surface de potentiel électrostatique moléculaire de 5a	139
Figure.III.17b : Surface de potentiel électrostatique moléculaire de 6a	139
Figure III.18 : Diamètres des zones d'inhibition des produits ainsi que les antibiotiques de référence Augmentin, acide Nalidixique et Cefoxitine	141
Figure III.19 : Variation de l'absorbance en fonction des concentrations du composé 7 et du standard (AA)	143
Figure III. 20 : Courbe de cytotoxicité pour les composés 5 , 6 et 8	145

Liste des schémas

Schéma I.1 : Sélectivité de la réaction des o-hydroxyaldéhydes avec la 4-hydroxycoumarin	22
Schéma II.1 : Synthèse de la 7-hydroxy-4-methyl coumarin 4	85
Schéma II. 2 : Synthèse des coumarines 5 et 6	86
Schéma III.1 : Synthèse des composés 7 et 8 catalysée par NaI et en présence de chloramine T	114
Schéma III.2 : Mécanisme proposé pour la formation de 6H,7H-chromeno[4,3-b]chromene-6,7-dione 7	115

Liste des tableaux

Tableau III.1 : Energies HOMO et LUMO, et indices de réactivité globaux μ , η , ω , S et N des composés 1-6 calculés avec la méthode B3LYP/6-311G(d,p)	106
Tableau III.2 : Les fonctions de Fukui nucléophiliques f_k^- et les valeurs des nucléophilies locales N_k des positions des composés 1-4 calculées en utilisant des analyses de populations différentes.	107
Tableau III.3 : Indices de Fukui Nucleophiliques, f_k^- et les nucléophilies locales, N_k , des différents sites des deux composés 5 et 6	108
Tableau III.4 : Calcul du pourcentage radiochimique du composé 4-[¹²⁵ I]	117
Tableau III.5 : Les caractéristiques spectroscopiques et photophysiques des composés 5, 6, 7 et 8 dans différents solvants	119
Tableau III.6 : Propriétés des solvants et leurs valeurs calculées des paramètres de polarité $f(\epsilon, n)$ et $\Phi(\epsilon, n)$	124
Tableau III.7 : Traitement statistique de corrélation des composés 5 et 6	127
Tableau III.8 : Moments dipolaires à l'état fondamental et excité des composés 5 et 6 avec a_0 calculé avec ChemOffice (i) et a_0 calculé avec B3LYP (ii).	129
Tableau III.9 : Energies relatives $\Delta E_{(ZPVE)}$ (kcal/mol) dans la phase gazeuse, énergies relatives ΔE_0 dans la phase solvant, moment dipolaire (Debye) calculé par la méthode DFT B3LYP / 6-31G(d)	131
Tableau III.10 : Moments dipolaires en Debye des composés 5a et 6a calculés par la méthode DFT/B3LYP et TD-DFT/B3LYP à l'état fondamental et excité dans la phase gaz et DMSO	132
Tableau III.11 : Les calculs des paramètres thermodynamiques de 5a et 6a dans la phase gazeuse et dans le DMSO	136
Tableau III.12 : Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des produits 5, 6, 7 et 8 ainsi que les antibiotiques de référence.	140
Tableau III.13 : Résultats des CMI du composé 5a	142
Tableau III.14 : Activité antiradicale du composé 7 et de l'acide ascorbique	143
Tableau III.15 : Valeurs des CI50 du composé 7 et du témoin déterminées par le test au DPPH.	143

Liste des abréviations

Bq: Becquerel
B3LYP: Becke 3 Lee-Yang-Parr
°C : Température en degrés Celsius
CAT : Chloramine T
CCM : Chromatographie Couche Mince
Ci : Curie
CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance
CPM : Coups par minute
DCM: Dichloromethane
DFT: Density Functional theory
DEPT: Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer
Hz: Hertz
HOMO: Highest Occupied Molecular Orbital
HSAB: Hard and Soft Acids and Bases
HMBC: Heteronuclear Multiple - Bond Correlation
HPLC : Chromatographie en Phase Liquide sous Haute Pression
HSQC: Heteronuclear Single-Quantum Correlation
HMBC: Heteronuclear Multiple - Bond Correlation
HRMS : Spectrométrie de masse haute résolution
ITLC: Instant Thin Layer Chromatography
IR: Infrarouge
Kev: Kilo électron volt
LUMO: Lowest Unoccupied Molecular Orbital
MeOH: Méthanol
MESP: Molecular electrostatic potential
MP: Moller-Plesset
MK: Merz-Singh-Kollman
MPA: Mulliken Population Analysis
Na₂S₂O₃: Thiosulfate de sodium
NPA: Natural Population Analysis
NOESY: Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy
ppm : Partie par million
R_f : Référence de front de migration
RMN : Résonance magnétique Nucléaire
SEA : Substitution Electrophile Aromatique
T/mn : Tours par minute
TIC : Transfert de Charge Intramoléculaire
TMS : TetraMethylSilane
UV : Ultraviolet

J: Constante de couplage exprimée en Hertz
 μM : Micromolaire
m: Mètre
mL : Millilitre
mL/mn : Millilitre par minute
mmol: Millimole
mol/L : Mole par litre
cm : centimètre
S: Singulet
d: Doublet
dd : Doublet de doublet
t: Triplet
Pf: Point de fusion
Rd : Rendement
 t_R : Temps de rétention
 δ : Déplacement chimique
s: Singulet
m: Multiplet
g : gramme
 I_f : Intensité de fluorescence
 λ_{ex} : Longueur d'onde d'excitation
 λ_{em} : Longueur d'onde d'émission
 λ_{max} : Longueur d'onde maximale
 Φ_f : Rendement quantique
 μ_g : Moment dipolaire à l'état fondamental
 μ_e : Moment dipolaire à l'état excité

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Aujourd'hui, le problème des déchets radioactifs générés par les industries (contrôle de matériaux par gammagraphie, irradiation d'aliments..), les hôpitaux et les laboratoires de recherche (radiothérapie, radiodiagnostique, radiopharmaceutique..) se pose avec de plus en plus d'acuité. En effet ces derniers occasionnent des risques aussi bien pour la santé de l'homme que pour son environnement sur lequel leur impact prend de plus en plus d'ampleur et génèrent différentes formes de pollution (sol, air, et eau).

L'industrie des radiopharmaceutiques dont l'utilisation s'élargit de plus en plus dans les services de médecine nucléaire à des fins diagnostiques et thérapeutiques, génère des déchets radioactifs solides ou liquides. Œuvrer pour la bonne gestion et la réduction de ces déchets est primordial car les rayonnements qu'ils émettent peuvent être nocifs pour l'homme et l'environnement.

Ainsi dans l'ère de la réforme environnementale, nous nous sommes intéressés à l'étude du marquage à l'iode 125 d'une série de composés de dérivés coumariniques, synthétisés en réduisant au maximum l'emploi de solvants et en utilisant des réactions rapides et efficaces réalisées sous irradiation des micro-ondes. Cette démarche effectuée selon les procédés de la chimie verte "Green chemistry", est un moyen efficace dans la limitation de la pollution d'origine chimique.

Les composés étudiés sont des coumarines, elles constituent le noyau de base de classes importantes de produits naturels et synthétiques qui manifestent des propriétés variées. Elles sont utilisées comme marqueurs fluorescents en biochimie, leur application dans de nombreux domaines de la médecine humaine, animale et de la phytochimie a permis le développement d'une recherche intense utilisant comme structure de base la 4-hydroxycoumarine.

La condensation des aldéhydes aromatiques vis-à-vis de la 4-hydroxycoumarine a fait l'objet de nombreux travaux dans la littérature [1-4]. Ces auteurs montrent que la 4-hydroxycoumarine réagit avec les aldéhydes aromatiques α -hydroxylés par une translactonisation intramoléculaire [5].

Dans notre travail nous avons utilisé cette dernière réaction pour la synthèse de quelques dérivés de la 4-hydroxycoumarine. Les composés obtenus ont été soumis aux études spectroscopiques (UV-Visible et fluorescence) et biologiques (activités antibactérienne, antioxydante et cytotoxique).

Nous nous sommes intéressés par la suite à la réaction d'iodation et de radioiodation à l'iode 125 de ces composés coumariniques. Notre objectif étant de synthétiser rapidement un

composé marqué stable, au coût le plus bas et dans le respect de l'environnement. Dans ce but nous avons utilisé dans un premier temps l'iode "froid" pour étudier la réactivité de l'ion iodonium (I^+) vis-à-vis de la coumarine puis cette même réaction a été adaptée aux contraintes du marquage radioactif.

Pour l'étude de la réactivité des coumarines nous avons essayé de tirer profit des possibilités offertes par la chimie théorique en utilisant Le GAUSSIAN-09. Ainsi nous avons déterminé les structures, les indices de réactivité, les moments dipolaires et nous avons pu discuter les mécanismes réactionnels.

Ce manuscrit s'articule sur trois chapitres:

- Le premier chapitre est consacré aux généralités sur les coumarines, leurs propriétés biologiques et spectroscopiques (fluorescence), un état de l'art sur la synthèse des composés étudiés ainsi que la synthèse par micro-ondes. Dans ce chapitre, une partie est consacrée à la radioprotection et nous abordons les stratégies de marquage à l'iode 125 afin d'explicitier les problèmes liés à la conception de composés radiomarqués. Il est aussi question de décrire les méthodes de calcul utilisées durant cette étude à l'aide du programme GAUSSIAN -09-W et de la méthode DFT (density functional theory).
- Dans le second chapitre, nous présentons la partie « matériel et méthodes expérimentales ».
- Dans le troisième chapitre, nous présentons les résultats de la synthèse, de l'étude en UV-Visible et en fluorescence, des expériences de marquage, c'est-à-dire l'étude des réactions d'iodation, à froid et à chaud, des calculs théoriques utilisés lors de l'étude spectroscopique et ceux de la prédiction de la nucléophilie des composés étudiés, ainsi que l'étude biologique des composés synthétisés.

Enfin, nous concluons ce travail en faisant ressortir les principaux résultats de ces recherches ainsi que les perspectives.

Références bibliographiques :

- [1] Cervello, J., Gil, M., de March, P., Marquet, J., Moreno-Mañas, M., Roca, J. L., and Sanchez-Ferrando, F. (1987). Use of selective heteronuclear ^{13}C - ^1H NOE measurements. A second note of warning on the assignment of structure to the products formed in the reactions between 4-hydroxy-2*H*-pyran-2-ones and carbonyl compounds. *Tetrahedron*, 43, 2381–2387. doi: 10.1016/s0040-4020(01)86824-1.
- [2] Sullivan, W.R., Huebner, C.F., Stahmann, M.A and Link, K.P.(1943). Studies on 4-Hydroxycoumarin. III. Dehydration of the Aldehyde Condensation Products *J. Am. Chem. Soc.*, 65, 2288-2290.doi:10.1021/ja01252a009.
- [3] Ribolleau, J., Deschamps-Vallet,C., Molho, D., and Mentzer,C. (1970). *Bull. Soc.Chim France*, 31-38.
- [4] Rachedi, Y., Hamdi,M., and Spécial,V. (1990). *Synth. Commun.*, 20(18), 2827-2836.
- [5] Mollo, Darinus. Patent, Fr 1216966 19600429, CAN 55:93563, AN 1961, 93563, (1984).

CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉS

I.1. Généralités sur les coumarines

La coumarine est une substance naturelle organique aromatique connue dans la nomenclature internationale comme : 2*H*-benzopyran-2-one qui peut être considérée en première approximation, comme une lactone issue de l'acide 2-hydroxy-*Z*-cinnamique. Son odeur de foin fraîchement coupé a attiré l'attention des parfumeurs sur elle dès le XIX^e siècle.

Les coumarines existent sous plusieurs structures différentes. Ils constituent une classe importante d'agents pharmacologiques possédant une gamme de différentes activités physiologiques. Cette classe fait l'objet d'une recherche intense et pourrait être une source de médicaments pour le traitement de plusieurs maladies.

La coumarine est une substance naturelle organique isolée de la fève tonka par Vogel en 1820. Elle fut synthétisée en 1868 par W.H. Perkin à partir de l'aldéhyde salicylique et d'un anhydride d'acide, à haute température en présence d'une base faible (CH₃COONa) [1]. Son nom vient de l'arbre sur lequel pousse la fève tonka, que l'on appelle *kumarù* en amérindien. Bien que ce soit la fève tonka qui l'illustre de façon significative (1 à 3%), la coumarine est contenue dans d'autres plantes et aliments comme le mélilot, la sauge sclarée, la lavande, le miel, le thé vert, la cannelle, etc... [1].

La coumarine est stockée dans la plante sous la forme de glucoside de l'acide coumarinique qui se transforme en coumarine sous l'action d'enzymes ou du soleil [2]. Elle se forme dans les feuilles et s'accumule surtout dans les racines et les écorces, ainsi que dans les tissus âgés ou lésés [2].

I.1.1. Intérêt biologique et médicale des coumarines

Les coumarines qui sont des composés aromatiques avec une structure commune de 2-*H*-benzopyran-2-one possèdent des activités biologiques multiples, telles que anti-inflammatoire, anticoagulant, antibactérien, antifongique, antiviral, anticancéreux, antihypertenseur, antituberculeux, anticonvulsivant, anti-hyperglycémiant, antioxydant, des propriétés neuroprotectrices, et anti- VIH (virus de l'immunodéficience humaine) [3].

I.1.2. Autres applications

En cosmétique : les produits naturels tels que l'huile essentielle de bergamote ont longtemps été utilisés comme photodynamisants dans les produits solaires (produit de brunissage).

Ils augmentent le nombre de mélanocytes et accroissent la production de mélanine par ceux-ci. C'est à ce titre qu'ils assurent une meilleure protection contre les radiations UV [2].

Aujourd'hui, la coumarine entre dans environ 90% des compositions et, à une concentration supérieure à 1%, dans 60% des compositions. Ce succès est dû à la capacité de la coumarine à s'associer avec d'autres produits. A côté de ces applications, on peut signaler la neutralisation de certaines odeurs : insecticides, peintures, encres ou plastiques et le masquage des odeurs d'iodoforme ou de phénols. Hors du domaine de l'olfaction, on l'utilise en électrochimie car elle améliore le dépôt de cristaux dans le zingage par exemple. Sous l'effet de la lumière et de l'oxygène de l'air, la coumarine se décompose en aldéhyde salicylique, dihydrocoumarine et acide salicylique.

I.1.3. Valorisations des coumarines par spectroscopie UV/Visible et fluorescence.

Propriétés optiques et photophysiques

Bien que la coumarine simple non substituée (2-oxo-2H-chromèn-2-one) présente une faible fluorescence, les dérivés correctement substitués produisent une fluorescence intense et ceux-ci sont largement utilisés dans différentes branches de la chimie, la biologie, la médecine et la physique [4,5].

La coumarine et ses dérivés, comme la plupart des hétérocycles, ont stimulé des recherches intéressantes en biologie comme rodenticides, en médecine comme anticoagulants [6], en imagerie médicale [7] en photochimie comme indicateurs de fluorescence [8,9] et en spectroscopie comme colorants lasers [10-12]. De nombreuses recherches concernant la fluorescence des dérivés de coumarine en solution ont abouti à des résultats intéressants [13-17]. La connaissance des propriétés photophysiques des coumarines est d'un grand intérêt depuis leurs applications importantes dans le domaine du visible comme colorants laser [13-18].

I.1.4. Solvatochromisme des sondes coumariniques

L'effet solvatochromique fait référence à un déplacement relatif de l'absorption électronique et / ou de l'émission d'une substance causée par des interactions avec son environnement. Par exemple, la coumarine-481 [19] a un maximum d'émission de 431 nm lorsqu'elle est dissoute dans l'hexane. Cette longueur d'onde d'émission passe à 480 nm lorsque le colorant est dissous dans de l'acétate d'éthyle [20]. Un décalage relatif d'un maximum d'émission ou d'absorbance à une longueur d'onde supérieure est appelé

solvatochromisme positif, ou un décalage bathochromique, tandis qu'un décalage à une longueur d'onde inférieure est appelé solvatochromisme négatif ou décalage hypsochromique.

Les interactions spécifiques régissant le solvatochromisme sont complexes et dépendent de combinaisons spécifiques de colorants (coumarine) et de solvants [21]. En termes simples, les interactions dipôle-dipôle entre le solvant et le soluté peuvent entraîner une stabilisation ou déstabilisation des états fondamentaux et / ou excités de la molécule colorant dans le soluté.

En règle générale, il est possible d'étudier une tendance solvatochrome sur une plage de polarité de solvant. Bien que le terme «polarité du solvant» soit imprécis [22], plusieurs modèles d'échelle de polarité ont été développés [22-25], afin de donner un indice de polarité pour un solvant donné. Les molécules coumarines figurent dans des études photophysiques qui explorent parfois les effets de la polarité des solvants [20, 26, 27]. La viscosité peut également jouer un rôle dans certaines molécules dérivées de la coumarine présentant un solvatochromisme [28].

I.1.5. Activité antioxydante des coumarines

Les coumarines, possèdent des propriétés très diverses (Figure I.1). Elles sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes [29].

Plusieurs coumarines simples, ou fusionnées à des chalcones ou à des benzodiazepines..., ont montré une activité antioxydante nettement supérieure ou similaire à celle de la vitamine E ou de la vitamine C [30, 31].

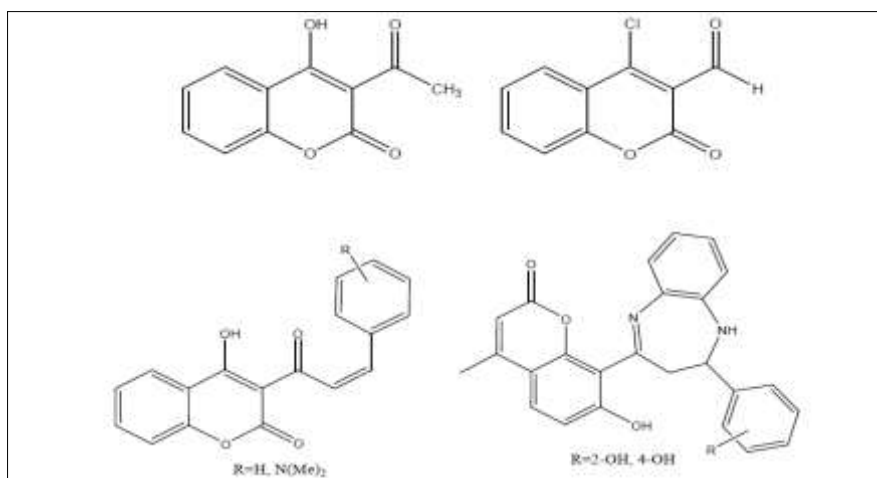


Figure I.1 : Quelques coumarines simples ou fusionnées à activité antioxydante.

I.1.6. Etat de l'art de la synthèse des dérivés coumariniques à partir de la 4-hydroxycoumarine

Un grand nombre d'études ont été menées sur la réactivité de la 4-hydroxycoumarine (**a**) vis-à-vis des ortho-hydroxy arylaldéhydes (**b**). Cette réaction est connue depuis les travaux de W. R. Sullivan et al [32]. Ces auteurs ont notamment décrit la réaction de condensation de deux dérivés o-hydroxy benzaldéhydes avec la 4-hydroxycoumarine. Ainsi, lorsqu'un mélange équimolaire du salicylaldéhyde (**b**) et de 4-hydroxycoumarine (**1**) est chauffé au reflux dans de l'éthanol, ils isolent deux produits (**c**) et (**d**) (Schéma I.1).

Les deux produits sont obtenus au cours de la réaction et leur séparation n'est pas aisée. Le composé de coloration jaune (**c**) a un point de fusion de 175 °C et (**d**) est incolore avec un point de fusion de 245 °C. Cette même réaction a été répétée par la suite par Jacques Riboulleau et al [33] dans les mêmes conditions que les auteurs [34], ils isolent (**c**) et (**d**), cependant ils notent que (**c**) précipite le premier lorsque le mélange réactionnel est refroidi dans un bain de glace. À ce stade, il convient de noter que la structure de (**c**) a été confirmée par analyse infrarouge et élémentaire. Mais en 1984, dans un avertissement (note of warning), P. de March et al [35] ont mis en cause la structure de (**c**) montrant par une analyse plus poussée (masse, RMN, ..) clairement que le produit (**c**) est en réalité un non intermédiaire supposé non isolable conduisant sans ambiguïté au produit (**e**). La formation de (**e**) peut être expliquée par une translactonisation intramoléculaire en l'absence de catalyseur. Cette réaction de translactonisation a également été revue et décrite dans notre laboratoire par M. Makhloufi et al [36]. Les auteurs ont utilisé du milieu apolaire (toluène) en présence de triéthylamine (NEt₃) ou de KF-Al₂O₃ (10%).

En 2010, Xiang-Shan Wang et al [37] ont publié un ouvrage dans lequel ils montrent que la 4-hydroxycoumarine en présence d'o-hydroxyaryaldéhydes dans l'éthanol et le catalyseur KF-Al₂O₃; donne dans ce cas un produit isolé et caractérisé ayant une structure différente de (**d**). En fait, la déshydratation dans le composé (**d**) a lieu entre le groupe OH de l'aldéhyde et le groupe OH de la coumarine, cependant dans les composés (**f**) ils décrivent la déshydratation entre les groupes OH de la 4-hydroxycoumarine (**a**). Mais le plus surprenant dans ce travail est le résultat enregistré lorsque le chlorure de triéthylbenzylammonium hydraté (TEBAC-H₂O) est utilisé comme catalyseur en milieu aqueux. En effet, les auteurs décrivent les produits dont la structure est similaire à (**c**) mais sous la forme E qui a été mentionnée ci-dessus en tant qu'intermédiaire de réaction. Le cas de R = H a été décrit ; il correspond à (**c**) sous la forme E. Le produit (**e**) et le produit (**g**) ont des points de fusion similaires. L'analyse par spectrométrie élémentaire et de masse (HRMS) ne permet pas de

différencier les deux structures de même composition $C_{16}H_{10}O_4$. Cependant, les auteurs [35, 36] ont une analyse complète de (e) (IR, RMN 1H, RMN 13C et spectrométrie de masse IE).

Toutes les données bibliographiques montrent une réactivité élevée, une sélectivité élevée de la réaction des o-hydroxyaldéhydes avec la 4-hydroxycoumarine et justifient amplement l'idée de revenir sur cette réaction.

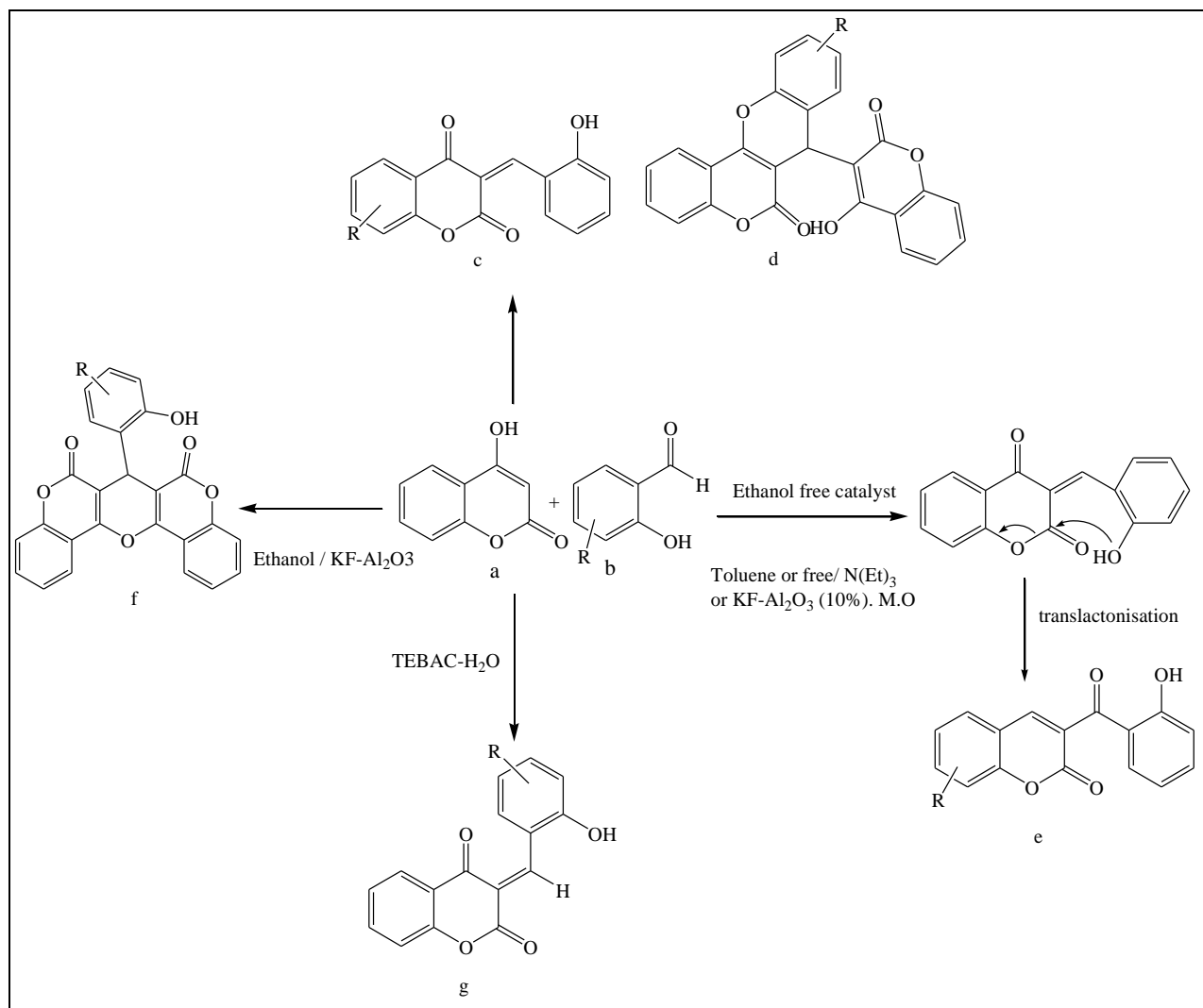


Schéma I.1. Sélectivité de la réaction des o-hydroxyaldéhydes avec la 4-hydroxycoumarine

À la lumière de ces résultats, dans le présent travail, nous avons étudié la réactivité de la 4-hydroxycoumarine vis-à-vis des o-hydroxyarylaldehydes dans les conditions opératoires adoptées et les produits résultants ont subi une réaction d'iodation.

I.2. Les fours à micro-ondes et leurs usages

I.2.1. Introduction :

La description du premier magnétron générateur des micro-ondes a été publiée en 1921 [38-40]. Il a été développé par la suite en Angleterre par Randall et Baraque dans les années 1940[41], où l'on a recours pour la première fois au rayonnement micro-ondes pour usage dans le domaine de la télécommunication [41,42]. Par la suite, son utilisation domestique, pour réchauffer rapidement les plats et les produits alimentaires s'est largement développée et s'est élargie à d'autres applications [43-56]. L'utilisation des micro-ondes dans l'industrie a débuté en 1965[57,58] et a fait son apparition dans les laboratoires au cours de l'année 1975[59], pour sécher la verrerie ou réaliser des réactions de minéralisation.

En 1986 [60,61] le four à micro-ondes s'est révélé être un bon équipement pour réaliser des synthèses organiques, remplaçant le « reflux thermique ».

I.2.2. Les Micro-ondes :

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques à haute fréquence, qui se trouvent dans la même bande que les ondes radar. Elles se situent dans le spectre électromagnétique entre 1cm à 1m [43-47,62-65](Figure I.2).

Dans le cadre des applications industrielles et scientifiques, seules quatre fréquences de micro-ondes sont autorisées, la fréquence de 2,45 GHz ($\lambda=12.2\text{cm}$), étant la plus utilisée, l'énergie du photon est de 0.0016eV. La fréquence de 915MHz ($\lambda= 32.8\text{cm}$) fait en France l'objet de quelques applications de tempérage et de décongélation dans l'industrie agroalimentaire [66].

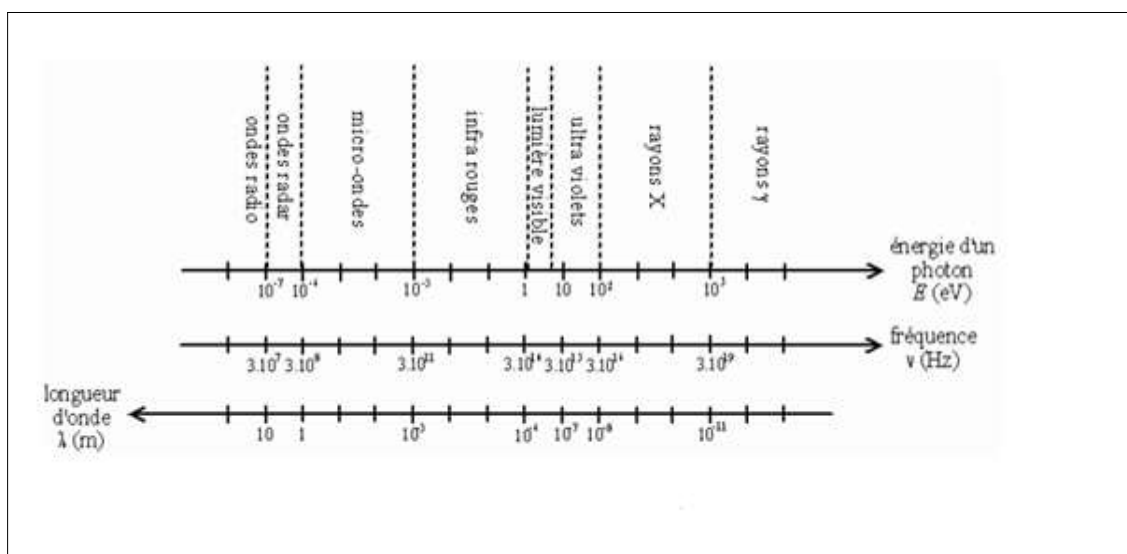


Figure I.2 : Le spectre électromagnétique

Les ondes électromagnétiques sont des champs à la fois électriques et magnétiques qui exercent une interaction réciproque (Figure I.3). Elles sont variables dans le temps et se propagent dans l'espace à la vitesse de la lumière. Le champ électromagnétique ainsi produit est défini par les vecteurs d'intensité de champ E et B.

$$E / B = \lambda C$$

E ... champ électrique

B ... champ magnétique

c ... vitesse de propagation

λ ... longueur d'onde

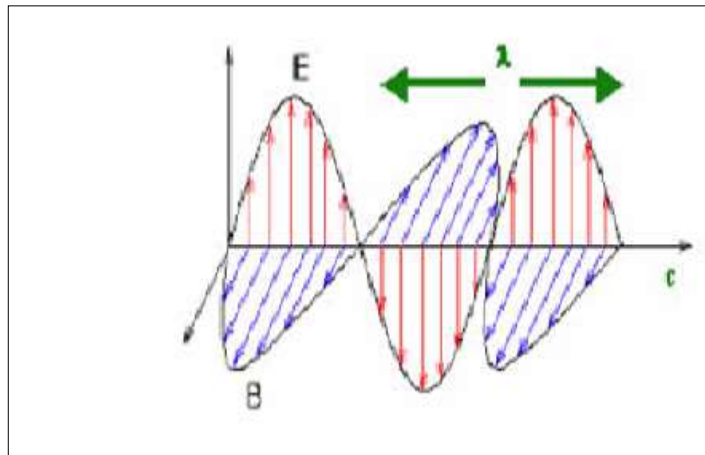


Figure I.3: Bandes électromagnétiques

I.2.3. Domaine d'utilisation des micro-ondes :

Dans l'industrie, les micro-ondes sont utilisées particulièrement dans les opérations de séchage de la matière [59]. Dans le domaine de l'agro-alimentaire, la cuisson, la conservation et la décongélation sont effectuées sous irradiation aux micro-ondes [66]. En chimie analytique (extraction des huiles...) [66,67], en biochimie (hydrolyse des protéines, stérilisation,...) [67]. Elles ont trouvé aussi une application dans «l'hyperthermie anticancéreuse», l'opération consiste à soumettre les cellules cancéreuses à une élévation de température rapide et bien localisée. Ces cellules étant plus sensibles à ce paramètre que les cellules normales. Mais en pratique l'hyperthermie est associée à la radiothérapie et augmente son efficacité. Cette technique reste très limitée car il faut disposer d'une antenne pouvant être implantée au niveau des tumeurs profondes, afin d'élever spécifiquement leur température.

Les sondes ou les antennes utilisables dans ces cas ne sont pas disponibles. Cet effet de potentialisation est aujourd'hui limité à des tumeurs superficielles (cancer du sein) [63,68,69].

Il reste bien entendu que les micro-ondes sont actuellement largement utilisées en chimie organique [62, 63, 70, 71] et nous donnons dans ce qui suit les raisons qui ont conduit les chimistes à adopter ce mode non conventionnel de chauffage pour la synthèse.

I.2.4. Différence entre le chauffage par micro-ondes et le chauffage thermique en synthèse organique : [64, 72].

Nous avons déjà signalé le pouvoir pénétrant des micro-ondes dans la matière. Il s'en suit un chauffage en profondeur et non superficiel (de l'intérieur à l'extérieur). Il s'agit dans ce cas d'un chauffage homogène, la température peut être considérée comme uniforme au sein de la matière alors que le matériau chauffé de manière conventionnelle (chauffage thermique), est chauffé de l'extérieur à l'intérieur (Figure I.4).

La rapidité du chauffage par micro-onde n'est pas à démontrer puisqu'elle est estimée à environ 10°C/s , une valeur qui n'est pas aisée à obtenir par le chauffage traditionnel au laboratoire. Mais le caractère sélectif du chauffage est à retenir en priorité. Seules les molécules polaires sont soumises à un mouvement forcé qui induit un frottement qui a pour conséquence une élévation de la température. Nous retenons donc que seules les molécules polaires sont chauffées.

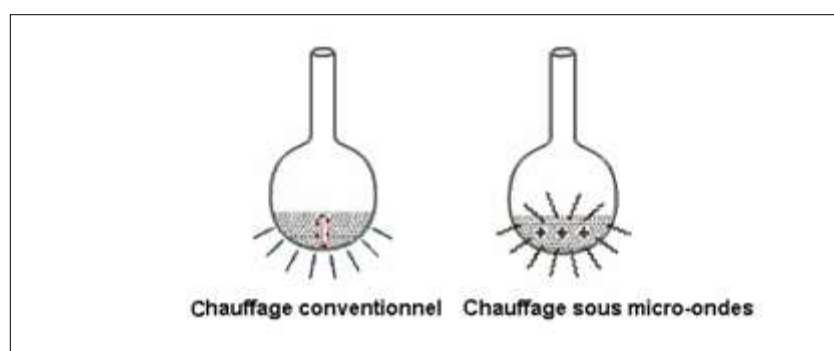


Figure I.4 : Comparaison excitation conventionnelle/ excitation micro-ondes

Le chauffage conventionnel présente des inconvénients, en effet les parois du ballon ou bûcher (en verre) sont généralement plus chaudes que le mélange réactionnel, le phénomène de surchauffe a lieu à leur contact, il s'en suit un effet néfaste préjudiciable à la stabilité des produits.

En conclusion l'utilisation des micro-ondes est adaptée aux réactions chimiques optimisées par les avantages suivants :

- ✓ Chauffage sélectif (seules les molécules polaires sont chauffées).
- ✓ Chauffage rapide (quasi-instantané, jusqu'à 10°C/seconde).
- ✓ Chauffage en profondeur.
- ✓ Chauffage homogène.

I.3. Rappel sur la radioactivité et les rayonnements ionisants

I.3.1. La radioactivité

La découverte de la radioactivité naturelle des sels d'uranium par Becquerel en 1896, puis de la radioactivité artificielle par Irène et Frédéric Joliot-Curie en 1934, ont ouvert un champ considérable d'applications médicales et industrielles [73-75].

En médecine, la radioactivité est utilisée aussi bien à des fins diagnostiques, in vivo et in vitro, qu'en réponse à des besoins thérapeutiques.

I.3.1.1. Notions sur la radioactivité :

I.3.1.1.1. Généralités [76,73, 74]

Tous les corps de la nature sont constitués d'atomes ou d'assemblage d'atomes.

Un atome : est la plus petite quantité d'un élément pouvant entrer en combinaison pour former une molécule ou une structure cristalline (Figure I.5). L'atome se compose:

- ◆ D'un **noyau** central, formé d'un assemblage de **protons** et de **neutrons**.
- ◆ d'un nuage périphérique composé d'un **cortège d'électrons**.

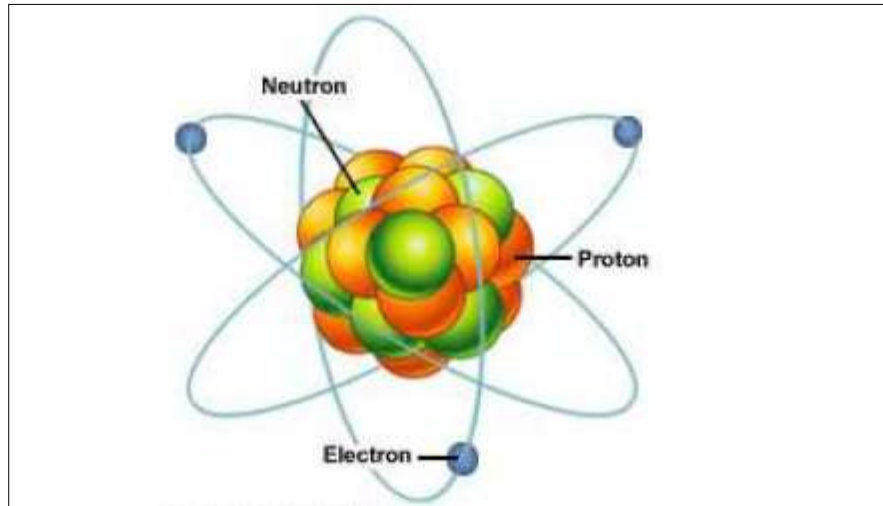


Figure I.5: Schéma illustratif d'un atome

Le nucléide (ou le noyau d'atome), est caractérisé par le nombre total de ses nucléons A , appelé **nombre de masse** et par le nombre de ses protons Z , appelé **numéro atomique**. La plupart des noyaux d'atomes sont naturellement stables. L'arrangement des nucléons au sein du noyau résulte d'un équilibre entre des **forces répulsives électrostatiques** qui tendent à écarter les protons, et **des forces attractives** à très court rayon qui tendent à rapprocher les nucléons.

La radioactivité résulte d'un déséquilibre entre ces forces, dû à un excès :

- ◆ Soit de neutrons.
- ◆ Soit de protons.
- ◆ Ou des deux.

2 nucléides sont **isotopes** s'ils ont le même numéro atomique Z mais des nombres de masses A différents.

Un isotope, lorsqu'il est radioactif on parle de **radionucléide** ou **radioisotope**.

Les propriétés chimiques des isotopes radioactifs sont les mêmes que celles des isotopes stables. Un élément peut donc avoir des isotopes radioactifs et des isotopes non radioactifs [74].

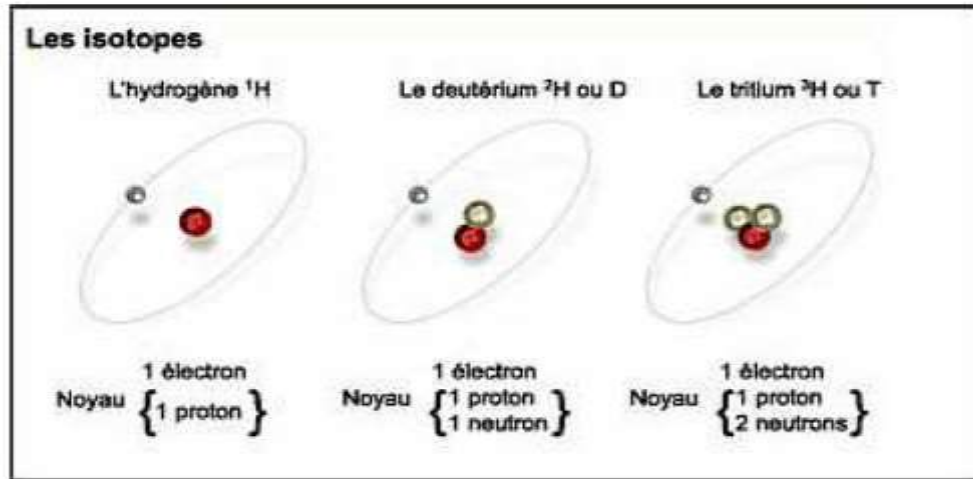


Figure I.6: Les différents isotopes de l'hydrogène (74)

L'atome d'hydrogène a deux isotopes : le **deutérium** et le **tritium** (Figure I.6)

La charge électrique des trois noyaux ainsi que les propriétés chimiques sont identiques. Le deutérium est stable, quant au tritium, il est instable et radioactif.

I.3.1.1.2. Les lois de la radioactivité [76,73, 74].

a) Activité radioactive

C'est le nombre de désintégrations qui se produisent par unité de temps dans une quantité donnée du radionucléide qui la constitue, exprimée en :

$$A(t) = \lambda \cdot N(t)$$

Où λ est la constante de radioactivité, caractéristique de l'élément considéré.

L'unité est le Becquerel (Bq) : égale à une désintégration par seconde.

b) Décroissance radioactive

La désintégration radioactive (Figure I.7) d'un noyau donné est un phénomène aléatoire.

En revanche, le calcul de la probabilité permet de savoir avec précision le nombre de noyaux qui vont se transformer par unité de temps :

$$dN = -\lambda \cdot N \cdot dt$$

Si on connaît l'activité du radionucléide et le nombre d'atomes présents N_0 , on peut alors déduire le nombre d'atomes restants N_t en fonction du temps écoulé :

$$N_t = N_0 \cdot e^{-\lambda t}$$

C'est la décroissance radioactive, qui est donc fonction exponentielle du temps.

Cependant pour chaque radionucléide on définit une **période radioactive T** au bout de laquelle la moitié des atomes radioactifs disparaît par transformation spontanée.

$$Nt/N_0 = e^{-\lambda t} = 1/2 \text{ et } \log 2 = -\lambda T$$

$$T = \log 2 / \lambda$$

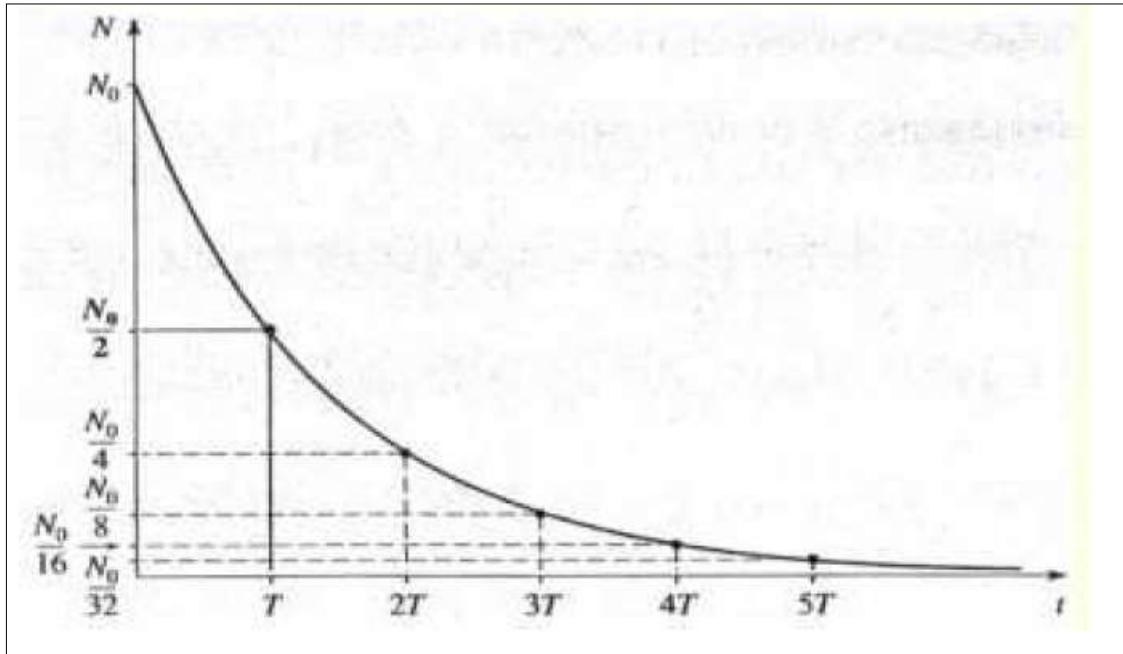


Figure I.7 : Décroissance radioactive

I.3.1.1.3. Les principales transformations radioactives [73, 76-79] :

On distingue cinq principaux types de transformations radioactives :

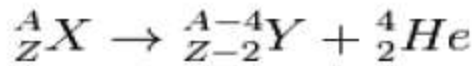
- ◆ Emission alpha (α).
- ◆ Emission bêta moins (β^-).
- ◆ Emission bêta plus (β^+).
- ◆ Capture électronique CE et capture avec émission gamma (γ).
- ◆ Fission nucléaire.

a) La radioactivité alpha (α):

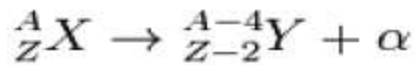
La particule α est un noyau d'Hélium constitué de 2 protons et 2 neutrons, il s'agit donc d'une particule porteuse de 2 charges positives.

La transformation α concerne les éléments qui ont une très grande masse. Qui se transforment en éléments chimiques stables et dont le noyau est plus léger.

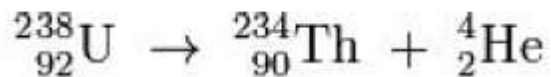
L'émission répond à l'équation :



ou



Exemple: désintégration de l'uranium 238 en thorium 234

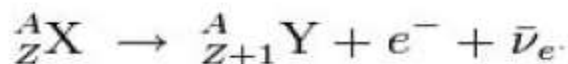


b) La radioactivité (β^-) :

La radioactivité β^- est l'émission d'un **électron** e^- et d'un **antineutrino** $\bar{\nu}_e$ accompagnant la transformation d'un neutron en proton.

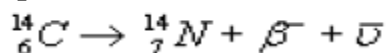
Cette transformation concerne les éléments qui sont instables par un excès de neutrons et l'émission β^- les rapproche de la zone de stabilité.

L'émission β^- répond à l'équation :



Dans certains cas, le nucléide Y est stable on dit que X est un émetteurs β^- pur.

Exemple :



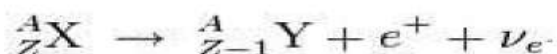
Dans d'autres cas, la transformation bêta moins aboutit à un nucléide Y dans un état excité ou métastable qui revient à l'état fondamental avec émission de **photons** γ ou d'une **conversion interne**.

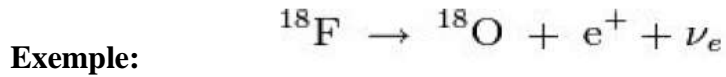
c) La radioactivité (β^+) :

La radioactivité β^+ ne concerne que les éléments légers présentant un excès de protons.

Elle se manifeste par la transformation d'un proton en neutron et se traduit par l'émission d'un **positon** (antielectron) et d'un **neutrino électronique** ν_e .

L'émission β^+ répond à l'équation :





Les émetteurs β^+ ont la particularité de devenir positon après avoir épuisé son énergie cinétique en collision multiple (Figure I.8).

Le positon se combine avec un électron dans une réaction d'annihilation, donnant naissance à deux photons 2γ de même énergie (511 KeV correspondant à la masse du positon).

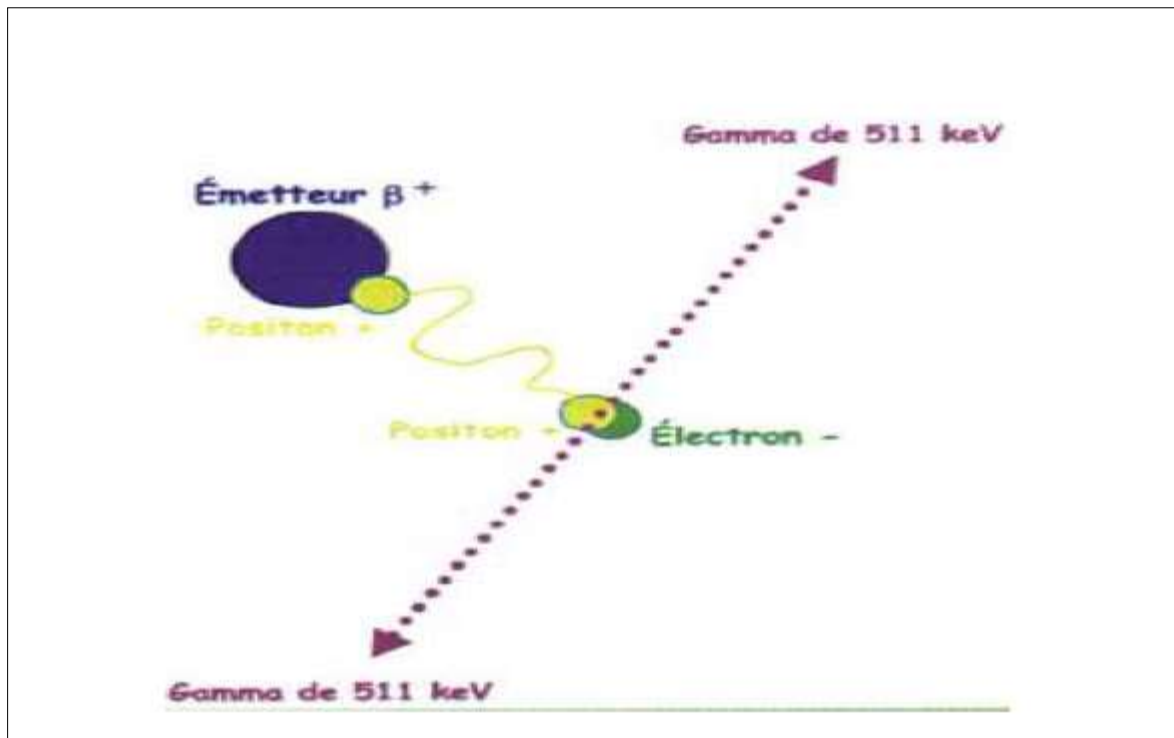
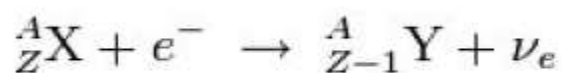


Figure I.8: Émetteur β^+ de positon

I.3.1.1.4 Capture électronique CE et capture avec émission gamma

Elles concernent les éléments lourds présentant un excès de protons. Un proton est converti en neutron par la capture d'un e^- par le noyau. Cette réaction, génère l'émission d'un **neutrino** mono-énergétique ν_e

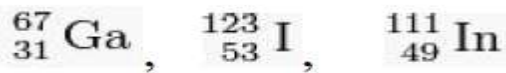
L'équation correspondante s'écrit:



La CE peut aboutir à des nucléides radioactifs métastables qui retournent à l'état fondamental par émission gamma.

Les photons émis ont un spectre de raies résultant des réarrangements électroniques qui viennent combler la place vacante par l'e⁻ capturé.

Exemples de radioéléments utilisés en médecine :



I.4. Radioprotection et gestion des déchets

L'utilisation des rayonnements ionisants au sein des établissements médicaux, notamment en services de médecine nucléaire et en radiothérapie, s'élargit de plus en plus.

Ceci exige la mise en œuvre d'un certain nombre de procédures, des règles et des moyens de prévention et de surveillance adéquats visant à empêcher et/ou à réduire les effets nocifs des rayonnements ionisants produits.

Actuellement, la radioprotection est devenue un système complexe dont la finalité est d'assurer à tout individu une protection optimale selon son statut par rapport à l'exposition. [76, 80].

La radioprotection nécessite le recrutement de personnel possédant des compétences en radioprotection ainsi que la formation à la radioprotection de tous les intervenants.

D'ailleurs, les objectifs de la radioprotection ne seront atteints que si chaque intervenant, quelque soit sa fonction et son statut, se considère directement et individuellement responsable de sa sûreté radiologique, de sa sécurité et de celle de ceux qui l'entourent.

I.4.1. Les principes de la radioprotection : [79- 82]

L'objectif principal de la radioprotection est de fournir un niveau approprié de protection aux êtres humains contre les effets nocifs des rayonnements ionisants.

C'est la raison pour laquelle la commission internationale de protection radiologique (CIPR) fait reposer son système de radioprotection sur trois principes non hiérarchisés qui s'appliquent simultanément : principe de justification, d'optimisation et de limitation.

Ce sont les principes de base de la protection contre les rayonnements ionisants qui s'appliquent aux expositions professionnelles, du public et des patients.

♣ **Le principe de justification**

<<Une activité nucléaire ou une intervention ne peut être entreprise ou exercée que si elle est justifiée par les avantages qu'elle procure, notamment en matière sanitaire, sociale, économique ou scientifique, rapportés aux risques inhérents à l'exposition aux rayonnements ionisants auxquels elle est susceptible de soumettre les personnes>>.

Historiquement, ce principe a d'abord été appliqué à la radioprotection des patients – tout examen non justifié étant interdit- avant d'être étendu à l'ensemble de la radioprotection.

♣ **Le principe d'optimisation**

<<L'exposition des personnes aux rayonnements ionisants résultant d'une de ces activités ou interventions doit être maintenue au niveau le plus faible qu'il est raisonnablement possible d'atteindre, compte tenu de l'état des techniques, des facteurs économiques et sociaux et, le cas échéant, de l'objectif médical recherché>>.

Le principe est connu sous le nom de principe ALARA ("As Low As Reasonably Achievable",

Historiquement, ce principe d'optimisation a d'abord été appliqué à la radioprotection des travailleurs avant d'être étendu à l'ensemble de la radioprotection.

♣ **Le principe de limitation**

<<L'exposition d'une personne aux rayonnements ionisants résultant d'une de ces activités ne peut porter la somme des doses reçues au-delà des limites fixées par voie réglementaire, sauf lorsque cette personne est l'objet d'une exposition à des fins médicales ou de recherche biomédicale>>.

Les expositions induites par les activités nucléaires pour la population générale ou les travailleurs font l'objet de limites strictes.

Dans le cas des expositions médicales, aucune limite stricte de dose n'est fixée dans la mesure où cette exposition à caractère volontaire est justifiée par le bénéfice attendu en termes de santé par la personne exposée.

I.4.2. La gestion des déchets radioactifs : [80, 81, 83]

Comme toute activité humaine, les activités nucléaires génèrent des déchets. L'utilisation des sources radioactives en médecine nucléaire ou en industrie est à l'origine de la production de déchets solides:

- Des petits matériels de laboratoire utilisés pour la préparation des sources (tubes, plaques, gants...),
- Des matériels médicaux ayant servi à l'administration (seringues, aiguilles, coton...).

Et des effluents liquides radioactifs qui proviennent :

- Des résidus radioactifs liquides.
- De l'eau de rinçage de matériels contaminés.
- Des sanitaires de l'unité de médecine nucléaire et des chambres protégées réservées à l'hospitalisation des patients faisant l'objet d'une radiothérapie...).

La gestion de ces déchets radioactifs commence au stade de la conception des installations mettant en œuvre des substances radioactives et se poursuit lors de leur exploitation, avec la nécessité de limiter le volume des déchets produits.

Elle se termine par une élimination des déchets (recyclage ou stockage définitifs), en passant par des étapes d'identification, de tri, de traitement, de conditionnement, de transport et d'entreposage provisoire.

Chaque type de déchets nécessite un traitement et un procédé d'élimination adapté afin de maîtriser les risques radiologiques.

Deux paramètres principaux définissant le risque radiologique : d'une part l'activité, qui contribue à la toxicité du déchet et d'autre part la période radioactive, qui est fonction de la décroissance radioactive des radioéléments présents dans les déchets

I.4.3. Procédés applicables à la gestion des déchets et des effluents radioactifs

I.4.3.1 Les déchets solides : [83]

◆ Tri et conditionnement

Les déchets solides sont triés et conditionnés en tenant compte de l'activité et de la période physique du ou des radioéléments qu'ils contiennent.

Il est impératif d'effectuer le tri des déchets le plus en amont possible dans le service :

♣ Les déchets provenant de l'utilisation de radionucléides de période supérieure ou égale à 100 jours seront pris en charge par un organisme d'élimination.

♣ Les déchets provenant de l'utilisation de radionucléides de période supérieure à 100 jours proviennent essentiellement des laboratoires d'analyse et de recherche.

♣ Les déchets provenant de l'utilisation de radionucléides de période inférieure à 100 jours seront différenciés pour permettre une gestion sur place, en attente de décroissance.

Les déchets triés sont ainsi recueillis dans des 'poubelles chaudes', munies d'un couvercle à pédale et portant le trèfle conventionnel rouge (symbole de la présence des rayonnements ionisants).

Ces poubelles sont protégées intérieurement par un sac de polyvinyle. Après remplissage le sac est ligaturé, à l'exception des déchets d'activité inférieure aux normes de rejets destinés à l'évacuation locale immédiate.

Tous les sacs doivent être soigneusement étiquetés, en mentionnant le service d'origine, la nature des radioéléments présents et leurs activités, la date de fermeture et la durée d'entreposage ou la date d'élimination prévue.

Pour l'organisation d'un tri efficace et permettre son contrôle, le service doit conformément à la réglementation en vigueur, disposer d'un règlement intérieur et tenir à jour les registres de suivie des mouvements des déchets.

◆ **Le stockage**

Les déchets triés, conditionnés et collectés, doivent être évacués au plus vite vers un local de stockage adapté dans l'attente de leur élimination après décroissance radioactive ou de leur prise par un organisme d'élimination.

Ce local doit présenter des caractéristiques spécifiques d'aménagement en ce qui concerne la sécurité et la protection, notamment :

- Il doit présenter une surface d'au moins 20m², couverte, clôturée et réglementairement balisée.
- Il doit contenir deux zones affectées aux déchets radioactifs solides et liquides mis en récipients appropriés et comporter un drainage de sécurité vers les cuves de stockage.

◆ **Contrôle et élimination**

Les déchets solides qui contiennent des isotopes à période physique courte doivent être entreposés dans un local de stockage spécialement aménagé en attente de décroissance. Après, ces déchets peuvent être éliminés dans des circuits de déchets conventionnels ou hospitaliers.

Les déchets solides et contaminés par des isotopes à période longue doivent être stockés dans des conditions analogues, en attente d'une prise en charge par la division de la Sûreté Nucléaire et de Radioprotection.

Le protocole de gestion de déchets devra imposer un contrôle des poubelles chaudes et notamment une mesure de l'activité du sac au moyen d'un détecteur adapté.

L'élimination ne pourra se faire que si l'activité détectée ne dépasse pas 1,5 à 2 fois le bruit de fond ambiant [84].

I.4.3.2. Les déchets liquides

On distingue trois filières d'élimination peuvent être envisagées pour les solutions aqueuses : [83, 84]

(1) Pour les effluents liquides contenant des radioisotopes d'activité inférieure :

Ils peuvent être éliminés directement dans les conduits d'évacuation de l'évier qui doivent être directement reliés au collecteur principal de l'établissement.

Les matières radioactives insolubles ou en suspension ne doivent pas être rejetées dans ces conduits d'évacuation. Elles doivent être recueillies par filtration et traitées comme des déchets radioactifs solides.

Le pH des solutions doit être ajusté de manière à assurer au rejet un haut degré de solubilité et de dispersion dans l'eau.

(2) Pour les effluents liquides contenant des isotopes d'activités plus importantes :

L'entreposage peut s'effectuer :

- Dans des bonbonnes, fabriquées en matériau incassable et inattaquable par les liquides en cause, munies d'une fermeture hermétique, portant le trèfle conventionnel rouge et étiquetées comme les sacs de déchets solides. Ces bonbonnes seront placées dans le local de stockage prévu.

- Il peut également s'effectuer dans des cuves de dilution.

Les effluents liquides sont alors dirigés, à partir d'un nombre restreint de points d'évacuation réservés uniquement à cet effet et signalés en conséquence, par des canalisations spécialisées, dans au moins deux cuves-tampon de stockage. Celles-ci, installées dans un local indépendant.

Ces cuves doivent présenter les garanties d'étanchéité et disposent d'une capacité totale permettant au moins le stockage des effluents produits en une année. Elles fonctionnent alternativement en remplissage et en stockage de décroissance.

I.4.4. L'utilisation des rayonnements ionisants en médecine nucléaire

La médecine nucléaire est fondée sur l'utilisation des rayonnements ionisants, émis par des radioéléments artificiels en sources non scellées, selon le type et l'énergie de rayonnement ionisant émis par le radionucléide, ce dernier peut être administré au patient soit à des fins diagnostiques soit thérapeutiques [77-79].

❖ **But diagnostique** : le rayonnement choisi, doit être caractérisé par son pouvoir très pénétrant et sa capacité de traverser des épaisseurs importante de la matière, mais peu ionisant afin d'éviter les risques dosimétriques.

⇒ **Rayonnement gamma (γ) et bêta plus (β^+).**

❖ **But thérapeutique** : le rayonnement émis par le radionucléide doit avoir un faible pouvoir pénétrant, mais fortement ionisant capable de déposer localement une quantité importante de l'énergie, responsable de la mort cellulaire.

⇒ **Rayonnements alpha (α) et bêta moins (β^-).**

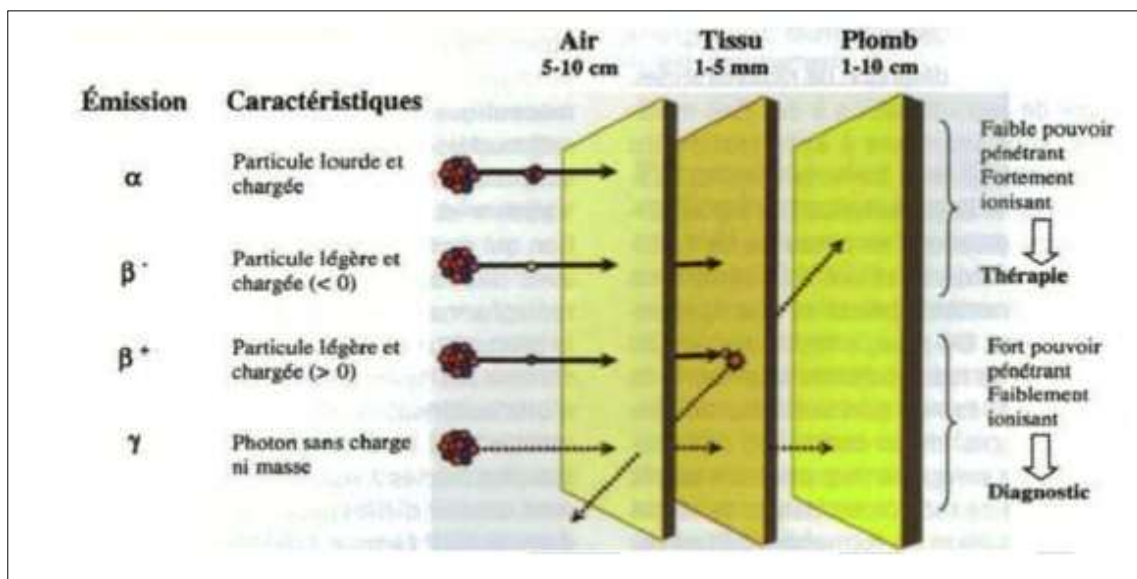


Figure I.9 : Parcours des rayonnements α , β^- , β^+ et γ dans la matière

I.5. Stratégie du marquage à l'iode

Les isotopes de l'iode présentent un grand intérêt en médecine nucléaire : l'iode¹²⁵ peut être utilisé en expérimentation *in vivo* chez le petit animal et *in vitro* pour les études sur culture cellulaire ; l'iode 123 (demi-vie de 13,2 heures et émetteur gamma de 159 Kev) est bien adapté aux gamma-caméras utilisées en clinique, il est utilisé chez l'homme pour les scintigraphies à usage diagnostique (MIBG-¹²³I dans les neuroblastomes ou Ioflupane-¹²³I dans la maladie de Parkinson) ; quant à l'iode 131, émetteur γ et β^- , il est utilisé en thérapie cancéreuse et en diagnostic [85].

De plus, cet élément présente un avantage physiologique par rapport aux autres émetteurs : lorsqu'il est libéré *in vivo* par métabolisation de la molécule marquée, il n'est pas

retenu au niveau hépatique et rénal, et va se fixer à 40% dans la thyroïde, ce qui limite le bruit de fond et facilite le contraste en imagerie.

I.5.1. Isotopes principalement utilisés

I.5.1.1. L'iode 125

L'iode 125 est un radionucléide de demi-vie longue (60 jours) émettant des électrons de conversion interne, des électrons Auger et un rayonnement γ faiblement énergétique de 35 Kev. Il ne peut pas être utilisé en imagerie médicale du fait de l'atténuation des rayonnements par les tissus et des performances des caméras. Par contre, il est idéal pour la recherche où il est essentiellement employé pour la mise au point des réactions de radiomarquage, l'étude des biodistributions sur les animaux et les tests *in vitro*. L'iode 125 (^{125}I) est une molécule peu coûteuse, assez peu ionisante, mais suffisamment énergétique pour que le rayonnement émis soit mesurable. Son émission particulière (électrons Auger) permet d'envisager une utilisation thérapeutique chez l'homme.

I.5.1.2. L'iode 123

L'iode 123 [^{123}I] est un émetteur γ de 159 Kev (83%) et un émetteur X de 27 Kev. Il décroît avec émission d'électrons de conversion interne. Sa demi-vie est de 13,2 heures.

Compte tenu de ses propriétés nucléaires et de la sensibilité maximale des détecteurs des caméras usuelles (de 100 à 300 Kev), il constitue le seul radionucléide capable de concurrencer le technétium [$^{99\text{m}}\text{Tc}$] en TEMP.

C'est un excellent traceur TEMP ; peu irradiant, il est utilisé chez l'enfant et nécessite peu de contraintes de radioprotection. Cependant, il possède deux inconvénients majeurs :

- Produit en cyclotron, son coût de production est très élevé.
- Sa demi-vie courte limite les possibilités de distribution et d'approvisionnement du produit prêt à l'emploi.

De ce fait, l'iode 123 est remplacé dès que cela est possible par l'iode 131, le technétium 99m ou l'indium 111.

I.5.1.3. L'iode 131

L'iode 131 [^{131}I] est un émetteur γ de 637 Kev (83%) et β^- de 606 Kev (90%). Sa demi-vie est de 8,03 jours. Il a été le premier radioélément utilisé *in vivo* et il est le seul radioélément employé en diagnostic (émission γ) et en thérapie (émission β^-).

En diagnostic, le choix est basé sur la simplicité du marquage et le faible coût du radioélément. Le marquage est stable ce qui permet de produire et livrer de grandes quantités sur une longue période.

Il est utilisé en thérapie en raison de son émission β^- de parcours moyen, essentiellement dans le traitement des pathologies thyroïdiennes. Néanmoins, son émission gamma très énergétique et sa demi-vie longue imposent des contraintes de radioprotection et une gestion des déchets contraignante aussi bien en médecine que dans les laboratoires de recherche.

I.5.1.4. L'iode 124

L'iode 124 [^{124}I] est un émetteur de positons. Ses caractéristiques nucléaires sont une demi-vie de 4,2 jours, une désintégration β^+ de 1530 Kev (11%) et 2130 Kev (11%) et une émission γ de 511 Kev (50%) et 603 Kev (62%). Son utilisation en clinique pour quantifier la fixation tumorale est à l'étude. Très énergétique, il nécessite des contraintes de radioprotection importantes.

I.5.2. Propriétés physico-chimiques des halogènes

L'introduction des halogènes, en général par substitution d'un hydrogène, peut modifier la structure, donc les propriétés physico-chimiques et par conséquent l'activité biologique de la molécule. Deux effets peuvent être responsables : l'effet stérique et la charge de la molécule.

- L'effet stérique dépend de la « taille » de la molécule, il est naturellement plus important pour les petites molécules que pour les grosses molécules (anticorps). L'iode substitué à un atome d'hydrogène d'une molécule active ne modifie pas de manière sensible son comportement biologique, à condition que la concentration en iode reste limitée (nombre d'atome d'iode fixé par molécule inférieur ou égal à 1) et que la fixation n'ait pas lieu sur ou à proximité du site actif de la molécule.

- La charge partielle négative des halogènes joue un rôle plus important car elle est responsable de liaisons intermoléculaires. La densité de charge va décroissante du fluor à l'iode, ainsi en phase aqueuse le fluor devient hydrophile et l'iode hydrophobe ; il conviendra donc de lier l'iode dans les zones hydrophobes de la molécule et le fluor dans ses zones hydrophiles. Cet effet est important pour les molécules de petite taille ou les substrats métabolisables [85].

I.5.3. Les principales réactions de marquage à l'iode

Différentes méthodes existantes qui seront choisies en fonction de la nature des substrats, des solvants et des conditions de la réaction de marquage. On distingue les réactions par voie directe, l'iode radioactif est fixé directement sur la molécule biologiquement active par liaison covalente, et la méthode dite « indirecte » : le radiomarquage est réalisé par l'intermédiaire d'un groupement prosthétique [86].

I.5.3.1. Les réactions chimiques par voie directe

La position de l'atome d'iode peut modifier les propriétés biologiques d'une molécule, il est donc parfois nécessaire de contrôler la réaction de marquage afin de définir la régiospécificité et la stéréospécificité du marquage. Ces deux paramètres vont dépendre du type de réactions utilisées.

I.5.3.1.1. Réaction d'addition

- Addition électrophile de l'iode aux doubles liaisons

C'est une réaction acide/base dans laquelle le réactif est un acide ou un acide de Lewis potentiellement polarisable (ex : iode moléculaire) et la double liaison une base.

Mécanisme

L'iode peut être introduit soit sous forme d'acide iodhydrique ou de chlorure d'iode, soit sous forme d'iode moléculaire potentiellement polarisable.

- L'iode moléculaire est moins réactif que les autres halogènes, il réagit lentement avec les alcènes. L'électrophilie peut être augmentée par l'ajout d'un catalyseur : BaSO_4 , LiBr , BF_3 ou en présence de solvants polaires : acide acétique ou alcool. Cependant, les composés diiodés sont peu stables et se décomposent à la lumière et à température ambiante en libérant de l'iode volatil.

Les molécules iodo-chlorées sont plus stables et le rendement d'iodation est meilleur.

Cette méthode a été utilisée pour le marquage des acides gras (acides oléique, linoléique) avec un rendement de marquage voisin de 100 %. Ces réactions sont de moins en moins employées ; les réactions de substitution sont préférées.

I.5.3.1.2. Les réactions de substitution

- La substitution électrophile (SE)

Elle correspond à l'attaque d'un atome d'iode sous forme I^+ sur un groupement donneur d'électrons.

La substitution électrophile aliphatique

La seule méthode consiste à préparer un organoborane par réaction d'unalcène sur du diborane, l'atome de bore est alors facilement substitué par l'atome d'iode I^+ .

La substitution électrophile Aromatique

La réaction de substitution électrophile sur un dérivé aromatique est simple à réaliser et nécessite des conditions de marquage moins dures que les autres méthodes : on réalise certains marquages à température ambiante en milieu aqueux. Cette réaction est essentielle pour le marquage des peptides et des protéines et est utilisée en routine dans les laboratoires de recherche utilisant l'iode radioactif.

Le réactif iodé électrophile peut être un ion positif ou un dipôle. Il attaque le noyau aromatique sur un carbone électronégatif et s'échange avec un hydrogène.

La substitution électrophile dépend de la basicité du noyau aromatique, basicité influencée par ses substituants :

- Les substituant activateurs sont ceux qui produisent un effet inducteur ou mésomère : groupes alkyle, aryle, $-NH_2$, $-NHR$, $-NR_2$, $-OH$, $-OR$

- Ceux qui désactivent : $-N(CH_3)^{3+}$, $-NO_2$, $-SO_3H$, $-COOH$; $-COOR$, halogène.

L'orientation est fonction de l'électronégativité des substituants. Les groupes alkyles augmentent la densité électronique en « ortho » et « para » par effet inducteur, les groupes hydroxyles et amines par un effet mésomère. Les isomères « para » sont prédominants sur « ortho » en raison de l'encombrement stérique.

Les groupes désactivateurs augmentent la densité électronique en «méta » sauf les halogènes qui orientent par effet mésomère en «ortho » et « para ».

L'activation du cycle par un substituant activateur comme l'hydroxyle conduit souvent à des dérivés poly-iodés ce qui peut modifier les propriétés biologiques et physicochimiques de la molécule. Afin de contrôler la position de marquage, on peut substituer l'un des carbones du cycle aromatique par un métal. Différentes espèces organométallique sont été utilisées pour ioder une molécule : l'étain, le bore, le germanium ou le silicium. On constitue ainsi un dipôle, le carbone étant plus électronégatif que le métal, cible privilégiée de la réaction d'iodation. L'avantage de cette méthode de marquage est la régiospécificité de la substitution, et donc l'absence d'isomères de position. Les arylstannanes, avec notamment le dérivé tributylétain, sont actuellement les plus utilisés, la substitution de l'étain par l'iode étant réalisable à température ambiante et dans de nombreux solvants.

- La substitution nucléophile (SN)

La substitution nucléophile consiste en un déplacement d'un groupe ou atome X par un groupe nucléophile Y chargé négativement (anion ou composé neutre possédant une paire électronique non appariée). Le composé X part du carbone avec un électron de la liaison chimique.

Le groupe partant X est électronégatif et polarisé dans la liaison C-X par un effet induit.

X = Cl⁻, Br⁻, I⁻, -OSO₂H, -OSO₂R, -N⁺R₃, -O⁺H₂

Le groupe nucléophile peut être un halogène, une amine, un alcool

Y = Cl⁻, Br⁻, I⁻, OH⁻, RO⁻, HS⁻, NC⁻, ROH, :NH₃, :NH₂R, :NHR₂

La réaction de substitution nucléophile peut se dérouler en 1 temps : Y et X réagissent en même temps (réaction SN₂) ou en deux temps avec formation d'un intermédiaire de réaction (réaction SN₁). Souvent, on observe les deux types de réactions, SN₁ et SN₂ pour un même substrat mais plus la nucléophilie augmente, plus on observe des réactions de substitution nucléophile de type SN₂ [85].

La nucléophilie est augmentée dans les solvants polaires. Elle va en augmentant du fluor vers l'iode (-F < -Cl < -Br < -OH < -NH₃ < -I) dans les solvants protiques polaires, mais le sens est inversé en présence de solvants polaires aprotiques.

La substitution nucléophile aliphatique

Cette réaction a été très utilisée car les réactions mises en jeu sont simples : substitution par simple chauffage en milieu polaire ou au reflux de l'acétone. La cinétique et le rendement de la réaction sont fonction de la facilité avec laquelle le nucléofuge (iode froid) quitte la molécule, et de la nature du solvant.

Trois types de réactions sont réalisés pour le marquage à l'iode :

- Echange isotopique (I*/I).
- Echange d'halogène (I*/Br).
- Remplacement de sulfonate (I*/OSO₂R).

Dans le cadre de l'échange isotopique (I*/I), on atteint des rendements de marquage supérieurs à 95% en présence d'un excès de substrat. Le principal avantage est l'absence de purification, le substrat étant identique qu'il soit radioactif ou non. Par contre l'activité spécifique est diminuée par dilution de la molécule radio-iodée. Les deux autres méthodes nécessitent une purification après l'étape de radiomarquage [85].

La substitution nucléophile aromatique

La substitution nucléophile aromatique, fait appel à trois mécanismes de réaction en fonction des conditions de marquage :

- La réaction d'addition - élimination.

- La substitution via un aryne intermédiaire (triple liaison). Cependant, elle conduit à des isomères de position et est donc peu utilisée aujourd'hui.

- La substitution de sels de diazonium [85,87]

○ *Réaction d'addition - élimination*

On réalise soit un échange isotopique soit un échange d'halogène en fonction de la réactivité des halogènes (par ordre croissant I, Br, Cl).

Le cycle aromatique est « activé » par des substituants attracteurs d'électrons qui diminuent la densité électronique en « ortho » et « para ». Les effets inducteurs et mésomères favorisent l'attaque de I⁻ en « para ».

Cette méthode demande des températures élevées. Elle nécessite donc soit l'utilisation de solvants à point de fusion élevé comme l'acétamide ou l'acide benzoïque (F 82°C, T_{eb} 221°C ; F 122°C, T_{eb}249°C respectivement) soit d'opérer en milieu réactionnel fondu. De plus, le substrat doit d'une part être stable à haute température et le mélange réactionnel doit permettre la dissolution des iodures.

Cette méthode a été utilisée en médecine nucléaire jusqu'en 2005 pour le marquage de la MIBG-¹²³I (Schering-Cis Bio International), traceur analogue de la noradrénaline utilisé pour le diagnostic des tumeurs surrénales. Le marquage est réalisé par échange isotopique en présence de sulfate d'ammonium, entre 120°C et 160°C, en dessous du point de fusion du substrat et du sulfate.

○ *Substitution via une triple liaison*

La méthode est utilisée principalement pour des noyaux aromatiques halogénés qui possèdent des substituants électronégatifs. Elle est favorisée par des milieux très basiques qui entraînent le départ de X formant ainsi une triple liaison. I⁻ attaque les carbones de la triple liaison sur les deux positions ce qui implique la formation de deux espèces différentes.

○ *Les sels de diazonium*

Cette méthode permet le radiomarquage sur une position définie du cycle (réaction de SANDMEYER). Cependant elle nécessite des conditions drastiques de température et de pH, et la présence de réactif oxydant ou l'utilisation de solvants organiques qui peuvent dégrader le substrat. Le rendement de marquage est moyen, de l'ordre de 70 à 80 % environ.

I.5.3.1.3. Marquage par réaction radicalaire

La réaction consiste à provoquer le clivage homolytique d'une liaison chimique XY pour former deux entités (X° et Y°) radicalaire avec un nombre impair d'électrons. Le radical libre contient un ou plusieurs atomes et est généralement très énergétique, et donc très réactif. Il peut réagir avec un nouveau substrat R-Z pour former un nouveau radical qui lui-même peut réagir avec les composés X-Y pour reformer un nouveau radical X° . On a formation d'une réaction en chaîne classique de la substitution radicalaire, la réaction se produisant jusqu'à ce qu'il ne soit plus possible de former de nouveaux radicaux libres ou que l'on produise des radicaux faiblement énergétiques capturés par les réactifs.

La réaction se produit aussi bien dans les gaz que dans les liquides. Elle n'est pas influencée par les acides et les bases, mais seulement par la polarité du solvant.

L'agent d'iodation, généralement l'iode moléculaire ou le chlorure d'iode, est soit préparé séparément puis ajouté au mélange soit formé directement dans le milieu réactionnel. La substance à marquer et l'agent d'iodation sont alors dissous dans un solvant approprié et traités par l'une des méthodes suivantes :

- Chauffage à des températures comprises entre 200°C et 400°C. La substance doit être thermodynamiquement stable.
- Irradiation dans l'UV et le visible : UV entre 300 et 450 nm.
- Irradiation par des rayons gamma produits par le cobalt 60.
- Utilisation de peroxydes et peracides : ils initient et accélèrent la réaction radicalaire, mais ce sont des oxydants forts susceptibles de dégrader le substrat.

I.5.3.2. Iodation par voie indirecte : marquage avec des agents couplants

Lorsque certaines molécules ne peuvent être iodées par voie directe car elles sont peu réactives vis à vis des halogènes, ou ne possèdent pas de site d'halogénéation, ou si ce dernier est sur le site actif, ou encore lorsque l'iodation n'est pas stable, il est nécessaire de fixer l'iode sur un groupement prosthétique bifonctionnel. Ce dernier doit posséder d'une part un site d'iodation permettant un marquage stable et d'autre part un site d'ancrage qui réagit avec les groupements -NH₂ ou -COOH de la molécule à marquer.

Les molécules à marquer sont généralement transformées pour contenir un groupe carboxyle qui se liera à la fonction amine libre de l'agent couplant. Le couplage est effectué s'il ne change pas trop la structure et les propriétés stéréospécifiques du groupe fonctionnel de la molécule originale ; la position du couplage doit être aussi loin que possible du groupe

fonctionnel. L'encombrement de ces groupes doit être faible, le caractère hydrophile ou lipophilie déterminé, afin de ne pas perturber les propriétés biologiques de la molécule.

I.5.4. Les agents d'iodation

Différents agents iodés peuvent être utilisés pour introduire l'atome d'iode radioactif sur son substrat :

- L'iodure de sodium (Na^*I).
- L'iode moléculaire ($^*\text{I}_2$).
- L'acide hypoiodeux ($^*\text{IOH}$).
- Le chlorure d'iode (ICl).
- Les composés organiques N-iodés (Iodogen®).

I.5.4.1. L'iode I_2

L'iode moléculaire est utilisé dans 3 types de réactions :

- Addition aux doubles liaisons.
- Substitution de l'hydrogène des groupes aromatiques.
- Substitution de l'atome d'halogène par réaction radicalaire

L'iode moléculaire radioactif peut être obtenu soit par échange $\text{I}_2/^*\text{I}^-$ soit par oxydation électrolytique des iodures sous forme de Na^*I par divers oxydants : Fe^{3+} , H_2O_2 , KI_3 , HIO^- soit par oxydation électrochimique. Cependant, son utilisation présente plusieurs inconvénients : d'une part la molécule radioactive est très volatile ce qui nécessite de travailler en dépression, sous hotte blindée ventilée et en atmosphère fermée, et de recueillir tous les gaz dans des filtres en charbon ; d'autres part, l'iodation s'accompagne d'une perte de 50 % de la radioactivité car seul l'anion ou le cation réagit ($^*\text{I}_2 \longrightarrow ^*\text{I}^+ + ^*\text{I}^-$). Il est donc peu utilisé en pratique.

I.5.4.2. Le chlorure d'iode

Le précurseur radioactif est généré par échange $\text{ICl} / \text{Na}^*\text{I}^-$; la réaction correspond à une oxydation des iodures par l'iode froid. Selon les conditions de la réaction, pH et solvant, le réactif impliqué est soit IO^- soit IOH et IOH_2^+ , en milieu basique et en milieu acide respectivement [88].

La molécule étant polarisée ($\text{I}^{\delta+} \text{Cl}^{\delta-}$), ce précurseur est utilisé pour l'introduction simultanée d'iode et de chlore sur une double liaison ou dans la réaction de substitution aromatique électrophile. Il est plus facilement ionisable et plus réactif que la molécule d'iode I_2 . Cette technique évite la perte de 50 % de la radioactivité.

I.5.4.3. L'iodure de sodium

C'est le composé le plus simple de l'iode et la seule forme commercialisée. Il est utilisé dans les réactions de substitution aliphatique nucléophile des halogénures, des groupes hydroxyles et des composés mercurochlorés, dans les réactions de substitution aromatique nucléophile des halogénures, dans les réactions de substitution des sels de diazonium.

I.5.4.4. L'acide hypoiodeux *IOH

L'acide hypoiodeux est synthétisé par oxydation de l'iodure de sodium radioactif.

Les principaux oxydants utilisés pour le radiomarquage sont la chloramine-T (n-chloro-tosylamide de sodium) et ses dérivés, l'Iodogen®, l'Iodobead® et le N-bromo-succinimide. En solution aqueuse les ions hypochlorites générés par ces réactifs oxydent les iodures (I⁻) en acide hypoiodeux qui devient le réactif de marquage ⁺ selon les réactions :



I.6. Méthodes de la chimie quantique

Ces dernières années, la chimie des hétérocycles et/ou hétéroatomes a connu un essor remarquable, et la majorité des composés développés dans les domaines de la chimie pharmaceutique biologique et industrielle sont basés sur cette famille de molécules [89,90]. En effet il est à noter que les deux tiers des composés connus dans la littérature sont des hétérocycles [91]. Il n'est donc, pas étonnant que cette classe de composés soit devenue le centre d'intérêt d'une grande communauté de chimistes expérimentateurs et théoriciens.

L'étude de la réactivité des hétérocycles aromatiques peut être liée directement à l'étude de leur réaction de substitution électrophile [89], vu que ces systèmes sont très riches en électrons.

Différentes approches sont envisageables dans le cadre des outils de modélisation moléculaire. Si ceux de mécanique classique, économiques en termes de temps de calcul, permettent de traiter des systèmes moléculaires de grande taille, les méthodes quantiques (*ab initio*, semi-empiriques ou théorie de la fonctionnelle de la densité DFT) sont, quant à elles, capables de calculer les propriétés électroniques des systèmes.

La méthode employée dans le cadre de cette étude est la théorie de la fonctionnelle de densité (DFT) :

La théorie de la fonctionnelle de la densité est basée sur le postulat proposé par Thomas et Fermi qui dit que les propriétés électroniques peuvent être décrites en terme de fonctionnelles de la densité électronique, en appliquant localement des relations appropriées à un système électronique homogène [92].

La DFT qui est utilisée pour la détermination des propriétés électroniques d'un système est appelée DFT fondamentale ou computationnelle, c'est une méthode de calcul qui s'est imposée comme une méthode crédible aux méthodes quantiques *ab initio*.

La DFT est pratique pour la détermination de concept. Plusieurs concepts chimiques de base (dureté, électronégativité) apparaissent naturellement. Ainsi la DFT est utile non seulement pour leur calcul mais aussi de mieux comprendre cet aspect de la DFT qui est à l'origine d'une nouvelle branche qu'on a nommé DFT conceptuelle.

La théorie fonctionnelle de la densité (DFT) est une méthode de calcul qui dérive les propriétés de la molécule en fonction de la détermination de la densité électronique, cette dernière est une caractéristique physique de toutes les molécules.

Les théories quantiques de réactivité permettent, actuellement, non seulement d'élaborer les mécanismes réactionnels et les profils énergétiques mais également de justifier et prédire les chimiosélectivités [93], les stéréosélectivités [92] et les régiosélectivités [94] expérimentales.

Plusieurs théories ont été élaborées pour l'étude de la réactivité chimique.

Les méthodes les plus répandues et les plus utilisées sont :

- (i) Théorie de l'état de transition [95] : cette théorie a montré son efficacité pour l'étude des mécanismes de nombreuses classes de réactions chimiques. Cependant, la localisation précise des états de transition est une tâche difficile et parfois impossible surtout pour les réactions complexes.
- (ii) Théorie des orbitales moléculaires frontières FMO [96] : c'est une théorie qualitative simple qui a permis d'expliquer les mécanismes de plusieurs classes de réactions chimiques. Cependant, plusieurs exceptions et échecs ont été soulevés pour cette théorie.
- (iii) Indices et descripteurs statiques et dynamiques de réactivité: Ce sont des indices qui caractérisent la molécule soit à l'état isolé (indices statiques) ou lors de l'approche d'un réactif (indices dynamiques).

Le travail présenté dans cette thèse s'inscrit dans le cadre de la troisième approche, c'est à dire la **prédiction des mécanismes réactionnels** à l'aide **des indices et descripteurs de réactivité**.

Il est fort intéressant de noter que la réactivité chimique des molécules a été souvent interprétée à l'aide d'indices et descripteurs basés sur l'intuition et l'expérience accumulée des chimistes. A titre d'exemple, les charges atomiques ont été largement utilisées pour établir des corrélations structure-réactivité [97].

Cependant, l'utilisation des charges atomiques comme indice de réactivité peut conduire à des résultats contradictoires à l'expérience, en particulier, pour les réactions à contrôle frontalier [98,99]. Récemment, de nouveaux concepts chimiques et indices de réactivité dérivant de la théorie de la fonctionnelle de densité (DFT) ont émergé comme des outils puissants pour la prédiction des sites réactifs des systèmes moléculaires [99,100].

Certains de ces concepts sont bien connus par les chimistes comme le potentiel chimique électronique (μ) et l'électronégativité (χ). De nouveaux concepts comme l'électrophilie (ω) et la dureté (η) ont été dérivés à partir des équations fondamentales de la DFT. En général, ces quantités expriment la réponse de la densité électronique d'une molécule dans un champ externe (V) et un nombre d'électrons (N). Ces paramètres nous permettent de comprendre le comportement d'un système d'une manière globale et ont conduit à des principes très importants comme le principe de la dureté maximale (*Maximum Hardness Principle MHP*) [100].

Le principe HSAB proposé par Pearson [101] a été appliqué dans un sens local pour dériver de nouveaux indices de réactivité tels que **les indices de Fukui** et **les molleses locales** [99]. Ces indices ont été intensément utilisés ces dernières années pour la prédiction des réactivités moléculaires [100, 102-104].

Il a été démontré dans le cadre du modèle polaire proposé par Domingo en 2009 [105] que la formation de la liaison chimique est due à l'interaction électrophile-nucléophile la plus favorable. Elle a lieu entre le site le plus électrophile (caractérisé par la plus grande valeur de l'électrophilie locale ω_k) de la molécule électrophile et le site le plus nucléophile (caractérisé par la plus grande valeur de la nucléophilie locale N_{uk}) de la molécule nucléophile.

Dans ce travail, nous avons utilisé les indices de réactivité dérivant de la DFT pour interpréter et prédire les mécanismes de la réaction d'iodation.

D'un point de vue théorique, il a été démontré que la DFT B3LYP (Becke, 3-parameters Lee-Yang-Parr) est une fonctionnelle fiable pour le calcul des géométries et des énergies des hétérocycles aromatiques. Les principaux indices utilisés dans cette étude sont donnés avec leur définition, mais sans aucune preuve mathématique.

L'investigation théorique présentée dans ce travail est basée sur le calcul des paramètres de nucléophilie globaux et locaux afin de faciliter l'élucidation du mécanisme de la réaction d'iodation.

I.6.1. Les indices globaux de réactivité

I.6.1.1. Electronégativité et potentiel chimique électronique

Le potentiel chimique électronique, μ , est associé à la capacité d'un système à échanger de la densité électronique avec l'environnement [106] à l'état fondamental, qui a également été identifié comme l'électronégativité de Mulliken négative ($-X$), et il peut être exprimé par:

$$\mu = -X = -(E_{\text{Homo}} + E_{\text{Lumo}})/2 \quad \text{Eq: 1}$$

I.6.1.2. Dureté et mollesse chimiques

La dureté chimique, η , peut être considérée comme la résistance d'une molécule à échanger de la densité électronique avec l'environnement :

$$\eta = (E_{\text{Lumo}} - E_{\text{Homo}}) \quad \text{Eq: 2}$$

D'autre part, la mollesse chimique, S , a été introduite comme l'inverse de la dureté chimique:

$$S = 1/2\eta \quad \text{Eq: 3}$$

I.6.1.3. Electrophilie globale

L'électrophilie, ω , est un indice global qui indique la stabilisation de l'énergie d'une molécule lorsqu'elle acquiert une quantité supplémentaire de densité électronique de l'environnement. Cet index est donné par l'expression:

$$\omega = \mu^2 / 2\eta \quad \text{Eq: 4}$$

ΔN_{max} est le nombre maximal d'électrons qu'un électrophile peut acquérir et est donné par l'expression:

$$\Delta N_{\text{max}} = -\mu / \eta \quad \text{Eq: 5}$$

I.6.1.4. Nucléophilie globale

$$N = E_{\text{Homo}}(\text{Nucléophilique}) - E_{\text{Homo}}(\text{TCE}) \quad \text{Eq: 8}$$

L'indice de nucléophilie relatif empirique, N , fait référence au tétracyanoéthylène (TCE). Ce choix a permis la manipulation commode d'une échelle de nucléophilie de valeurs positives.

I.6.2. Les indices locaux de réactivité

Le principe HSAB, connu aussi sous le nom théorie HSAB ou concept acide-base de Pearson, est très utilisé en chimie pour expliquer la stabilité des composés, les vitesses des réactions, etc. HSAB est l'acronyme de *Hard and Soft Acids and Bases* (acides et bases durs et mous) ; dans le cadre de la théorie HSAB, les termes « acide et base » sont à entendre dans le sens d'acide de Lewis et base de Lewis dans le cadre général des équilibres ou réactions d'oxydo-réduction ; les termes « dur et mou » ne doivent pas être confondus avec les termes « fort et faible » des acides et bases classiques (dont la « force » se mesure à leur pH en solution molaire, c'est-à-dire leur faculté à libérer ou capter des protons).

Le principe HSAB appliqué dans un sens global nous permet de calculer le potentiel chimique électronique μ , l'électronégativité χ , la dureté globale η et la mollesse globale S d'une molécule. Toutes ces propriétés caractérisent le système moléculaire à l'état isolé. Cependant, les chimistes s'intéressent surtout aux interactions entre molécules, c'est à dire à la réactivité chimique.

Pour déterminer les sites réactifs d'une molécule lors de l'approche d'un agent électrophile, nucléophiles ou radicalaires, les chimistes utilisent les charges nettes pour favoriser une interaction par rapport à une autre. Cependant, il est bien connu que les charges nettes calculées sur les différents sites d'une molécule ne sont pas un bon descripteur pour décrire les interactions entre molécules, particulièrement, pour les réactions contrôlées par les frontières c'est à dire les interactions *Soft-Soft*. En effet, la prédiction de la réactivité à l'aide des charges nettes peut conduire à des prédictions contradictoires avec l'expérience [98,99].

Comme alternative au calcul des charges, les études récentes [100,107] ont bien montré l'utilité d'appliquer le principe HSAB dans un sens local pour l'étude des interactions entre molécules donc pour la réactivité locale.

Dans ce qui suit, nous présentons succinctement le fondement théorique des principaux indices locaux utilisés actuellement pour la prédiction des sites réactifs d'une molécule, en l'occurrence : **les indices de Fukui**.

I.6.2.1. Indices de Fukui

En chimie la question la plus fréquente pour l'étude de la réactivité locale est souvent *quel atome ou groupement fonctionnel est plus réactif ?* Et non pas quel point de la molécule

est plus réactif ? Pour répondre à cette question il faudra donc condenser les fonctions de Fukui sur des atomes ou groupement fonctionnels [108].

La forme condensée des fonctions de Fukui dans une molécule avec N électrons a été proposée par Yang et Mortier [108]:

$$f_k^+ = [q_k(N+1) - q_k(N)] \quad \text{pour une attaque nucléophile}$$

$$f_k^- = [q_k(N) - q_k(N-1)] \quad \text{pour une attaque électrophile}$$

$$f_k^0 = [q_k(N+1) - q_k(N-1)]/2 \quad \text{pour une attaque radicalaire}$$

$q_k(N)$: population électronique de l'atome k dans la molécule neutre.

$q_k(N+1)$: population électronique de l'atome k dans la molécule anionique.

$q_k(N-1)$: population électronique de l'atome k dans la molécule cationique.

La fonction de Fukui, $f(k)$, représente les modifications de la densité électronique en un point k par rapport à la variation du nombre d'électrons, N, à un potentiel externe fixe. Dans la littérature, la plupart des études ont été effectuées selon la méthode des différences finies, dans laquelle les quantités locales, telles que les fonctions de Fukui, définissent la réactivité et la sélectivité d'un site spécifique dans une molécule et sont approximées comme suit:

$$f_k^- = [q_k(N) - q_k(N-1)] \quad \text{Eq : 6}$$

$$f_k^+ = [q_k(N+1) - q_k(N)] \quad \text{Eq : 7}$$

Où q_k est la population électronique de l'atome k dans une molécule évaluée à partir de l'analyse de population de Mulliken (MPA), de l'analyse de population naturelle (NPA) et électrostatique (ESP) du k ième site atomique dans le neutre (N), anionique (N+1) ou cationique (N-1) dans une molécule.

I.6.2.2. Nucléophilie locale

Le paramètre de nucléophilie locale basé sur la fonction nucléophilique de Fukui f_k^- est défini par :

$$N_k = N f_k^- \quad \text{Eq : 8}$$

où N est l'indice de nucléophilie global. Ce paramètre définissant la nucléophilie locale est utilisé dans cette contribution pour la prédiction du site préféré des coumarines dans les réactions de substitution électrophiles aromatiques.

I.6.3. Méthodologie de calcul

Les calculs ont été effectués en utilisant la méthode B3LYP [109] et la base 6-311G(d,p) [110] implémentée dans le programme Gaussian 09W [111]. Les systèmes cationiques et anioniques utilisés pour les calculs des indices locaux ont été maintenues à la même géométrie que les systèmes neutres. Les populations électroniques ont été calculées à l'aide des analyses de populations MPA (Analyse de population de Mulliken) [112], les charges dérivant du potentiel électrostatique et calculé selon l'algorithme de Breneman et de Wiberg (option ChelpG) [113] et également par NPA (analyse de population naturelle) [114].

I.7. Valorisation des dérivés coumarinique par étude UV/Vis, fluorescence et calcul du moment dipolaire

De nombreuses recherches concernant la fluorescence des dérivés de la coumarine en solution ont abouti à des résultats intéressants [118-121]. La connaissance des propriétés photophysiques des coumarines est d'un grand intérêt depuis leur utilisation dans le domaine du visible comme colorants laser [122-124]. En plus, les dérivés de coumarines sont utilisés comme agents sensibilisateurs dans quelques processus photochimiques [125]. Il est à noter, que l'étude du moment dipolaire des dérivés des coumarines a été rapportée par plusieurs groupes de chercheurs [122,126-132].

L'étude des spectres d'émission de fluorescence nous on permit de calculer les moments dipolaires de l'état fondamental et de l'état excité, et de comparer les résultats expérimentaux aux résultats théoriques calculés sur la base de la méthode B3LYP/6-31+G(d,p).

Un grand nombre de coumarines substitués ont suscité d'importantes recherches qui nous ont fourni des renseignements beaucoup plus détaillés sur l'effet du solvant et la température [133,134]. C'est pourquoi il nous a semblé judicieux d'exhiber des notions fondamentales sur la fluorescence et de revenir sur des définitions associées à l'émission de lumière par un fluorophore.

Dans ce travail, nous exposerons les méthodes expérimentales pour la détermination des moments dipolaires. Nous donnerons également toutes les études détaillées sur les spectres électroniques d'absorption et d'émission de fluorescence.

Nous présenterons l'ensemble de nos résultats expérimentaux concernant l'effet de structure sur les fréquences électroniques d'absorption et de fluorescence des coumarines et nous donnerons aussi les résultats des calculs des moment dipolaires déterminés à l'état fondamental μ_g et excité μ_e ; ce qui nous permettra de faire une comparaison entre μ_g et μ_e .

Nous comparerons aussi nos résultats expérimentaux avec ceux calculés théoriquement.

I.7.1. Notions fondamentales sur la fluorescence

L'objectif de cette bibliographie sur la fluorescence est tout d'abord de revenir brièvement sur des notions et définition associées à l'émission de lumière par un fluorophore organique, de situer les coumarines dans cette gamme de composés organique fluorescents, et aussi d'expliquer les caractéristiques qui font de cette famille des candidats de choix dans l'élaboration d'édifices fluorescents pour divers applications.

I.7.1.1. Principe de la fluorescence

« La fluorescence est une forme de luminescence se produisant suite à l'absorption de photons sur une molécule de type fluorophore, fluorochrome. C'est un phénomène physique classé dans l'ensemble des phénomènes de luminescence comprenant la **photoluminescence** (Fluorescence, phosphorescence) et les autres types de luminescence (**chimiluminescence**, **bioluminescence**) » [135]. Elle se traduit par l'émission de photons par une molécule qui a été irradiée par un faisceau lumineux généralement dans une gamme de longueurs d'ondes s'échelonnant du visible à l'ultraviolet. Ce processus dépend de la nature des états fondamentaux et excités de la molécule considérée.

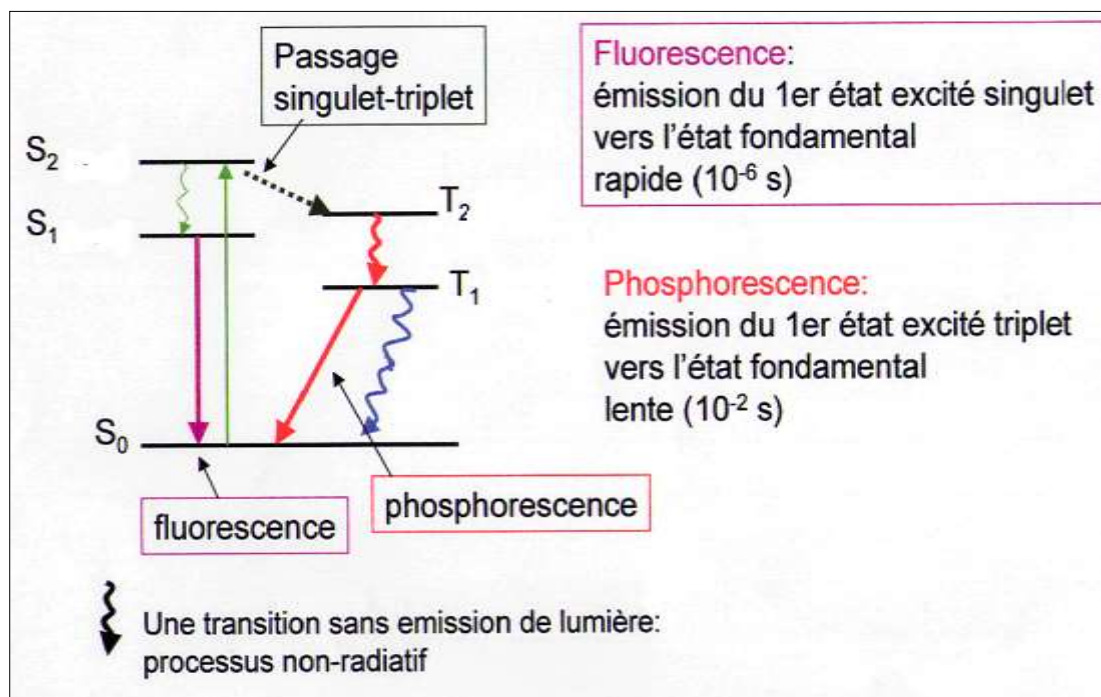


Figure I.10 : Diagramme de Jablonsky

La grande sensibilité de la fluorescence d'une molécule à son microenvironnement explique l'utilisation extensive des sondes fluorescentes dans de nombreux domaines : physique, chimie, biologie, médecine, environnement, industrie pharmaceutique.

Par exemple des molécules fluorescentes hétérocycliques contenant de l'azote, de l'oxygène avec des systèmes d'électrons délocalisés et des structures réactives peuvent être couplées à des structures biologiques.

I.7.1.2. Caractéristiques des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence d'une molécule

« Chaque molécule peut être caractérisée par des spectres d'absorption et d'émission qui lui sont propres et qui reflètent la distribution de probabilités des transitions énergétiques. Ils sont caractéristiques de la structure énergétique des molécules. L'émission de photons accompagnant la relaxation $S_1 \rightarrow S_0$ est appelée fluorescence. À quelques exceptions près, il est important de remarquer que l'émission de fluorescence se produit à partir de l'état S_1 » [135].

Il est important de souligner que l'émission d'un photon est un processus aussi rapide que l'absorption d'un photon ($=10^{-15}$ s). Cependant, des molécules excitées séjournent dans l'état S_1 pendant un certain temps (quelques dizaines de picosecondes à quelques centaines de nanosecondes, selon le type de molécules et le milieu) avant d'émettre un photon ou de se désexciter par d'autres voies (conversion interne, passage intersystème).

Ainsi, après excitation d'une population de molécules par une impulsion lumineuse extrêmement brève, l'intensité de la fluorescence décroît exponentiellement avec un temps caractéristique reflétant le temps de séjour moyen (ou durée de vie) des molécules dans l'état excité S_1 .

I.7.1.3. Propriétés des fluorochromes

Trois autres caractéristiques importantes de l'émission de fluorescence sont le **rendement quantique**, le **coefficient d'extinction** et le **temps de déclin de fluorescence**.

I.7.1.3.1. Le rendement quantique

L'efficacité de l'émission de la lumière fluorescente pour une molécule donnée est déterminée par le **rendement quantique Φ** qui est la fraction de molécules excitées qui retournent à l'état fondamental S_0 avec émission de photons de fluorescence. En d'autres termes, le rendement quantique de fluorescence est défini par le rapport entre le nombre de photons de fluorescence émis et le nombre de photons absorbés par la molécule. Les fluorochromes ont des rendements quantiques compris entre 0.1 et 1.

$$\Phi_f = \frac{\text{Nombre de photons émis}}{\text{Nombre de photons absorbés}}$$

Le rendement quantique est une caractéristique physique de la molécule fluorescence et sa valeur traduit la plus ou moins grande capacité d'un composé à fluorescer.

I.7.1.3.2. Coefficient d'extinction molaire

Le coefficient d'extinction molaire ϵ ou absorbance spécifique reflète la probabilité d'absorption. Sa valeur peut constituer un critère du fait que plus ϵ est grand plus élevée sera la fluorescence à intensité lumineuse incidente égale.

I.7.1.3.3. Durée de vie de la fluorescence

La troisième caractéristique importante d'une molécule fluorescente est le temps de déclin, ou durée de vie de fluorescence. Elle correspond à la durée de vie moyenne de l'état excité, la plupart des fluorochromes ont des durées de vie de l'ordre de la nanoseconde. Plus ce temps sera court, meilleur sera la sensibilité du fluorochrome

$$\tau_f = \Phi_f * \tau_N$$

τ_N constante de temps intrinsèque de l'état excité en considérant seule la fluorescence

En conclusion, les durées de vie et les rendements quantiques sont des caractéristiques très importantes. À l'évidence, plus le rendement quantique de fluorescence est élevé, plus il est facile d'observer un composé fluorescent. Ceci est d'autant plus important que le composé est utilisé en tant que sonde fluorescente. Il faut souligner qu'en phase condensée de nombreux paramètres peuvent affecter les durées de vie et les rendements quantiques : température, PH, polarité, viscosité, liaison hydrogène.

I.7.1.4. Principaux facteurs influençant la fluorescence

I.7.1.4.1. Effet solvant

« La nature du solvant joue un rôle primordial. Les effets sont complexes, difficiles à analyser. Ils sont liés à : la polarité du solvant, sa constante diélectrique, la formation de liaison hydrogène et à la viscosité » [135]. Les substances fluorescentes ne présentent pas les mêmes λ_{\max} d'émission ni la même intensité de la fluorescence (I_f) dans les différents solvants. De façon générale les effets du solvant ne peuvent pas être prévus quantitativement.

Le rendement quantique dans la fluorescence est généralement faible dans les milieux polaires car la désactivation vibrationnelles est d'autant plus efficace que le fluorochrome interagit avec le solvant.

I.7.1.4.2. Effet température et de la viscosité

Dans la plupart des cas une diminution de l'intensité de fluorescence est consécutive à l'augmentation de température. Cet effet est attribué à une augmentation du mouvement thermique des molécules favorisant les pertes d'énergie par collisions (relaxation non rayonnante). La diminution de la viscosité du solvant conduit au même résultat.

I.7.1.5. Les espèces fluorescentes en chimie organique:

La plupart des molécules ne sont pas fluorescentes. Il n'existe pas de règle reliant la structure et la fluorescence [136] :

- ❖ Certains acides aminés (tryptophane, phénylalanine, tyrosine...) sont fluorescents .
- ❖ Les dérivés de la fluorescéine sont fluorescents:

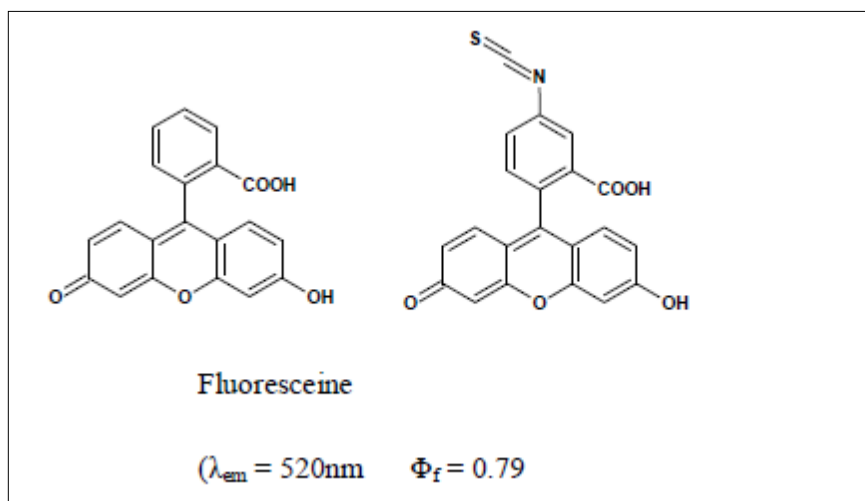


Figure I.11 : La fluoréscine et un de ses dérivés

Les dérivés de la fluorescéine sont devenus des standards dans le domaine du marquage biologique (notamment le dérivé possédant une fonction isothiocyanate).

❖ Les coumarines sont fluorescentes:

Un exemple de cette famille de dérivés fluorescents est représenté dans la figure ci-dessous :

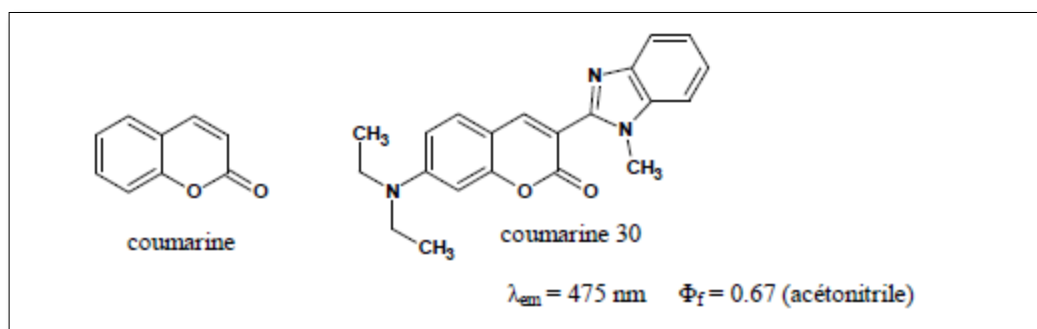


Figure I.12 : Coumarine 30

L'effet du solvant sur les propriétés d'absorption en UV-vis et d'émission en fluorescence des composés organiques a fait l'objet de travaux intéressants [137]. L'excitation d'une molécule par absorption de photons provoque une redistribution des charges qui induit des changements conformationnels à l'état excité. Cela peut entraîner une augmentation ou une diminution du moment dipolaire de l'état excité par rapport à l'état fondamental. L'étude des moments dipolaires à l'état fondamental et à l'état excité de molécules électroniquement excités fournit des renseignements importants au sujet de la structure électronique et géométrique de la molécule à l'état de courte durée. La connaissance du moment dipolaire à l'état excité des molécules électroniquement excités est très utile pour la conception de nouveaux composés avec des propriétés optiques non linéaires pour élucider la nature des états excités et pour déterminer le tracé de la transformation photochimique.

Les méthodes actuellement disponibles pour l'estimation des moments dipolaires à l'état excité simple sont basées sur le déplacement spectral causé de l'extérieur par électrochromisme ou de l'intérieur par solvatochromisme. Des méthodes telles que la polarisation électrique de la fluorescence [138] et le dichroïsme électriques [139] sont généralement considérées comme étant très précis, mais leur utilisation est limitée à cause de la sensibilité des équipements ce qui fait que les études ont jusqu'ici été relativement limitées à des molécules simples. Le procédé solvatochromique est basé sur le déplacement des maximums de l'absorption UV / Vis et de la fluorescence dans des solvants de polarités différentes. Il a montré que dans des conditions appropriées, la méthode solvatochromique donne des résultats assez satisfaisants [140]. Cette technique est utilisée pour estimer les moments dipolaires de l'état excité de différentes molécules.

Plusieurs chercheurs ont utilisé des techniques différentes pour effectuer une vaste expérience et études théoriques sur les moments dipolaires à l'état fondamental et à l'état excité d'une variété de composés organiques fluorescents telle que la coumarine [141-144]. Dans ce contexte, ces composés ont reçu une attention particulière en raison de leur importance croissante dans la photophysique et la photochimie.

Dans la présente étude nous reproduisons l'estimation des moments dipolaires de l'état fondamental et de l'état excité de nos composés coumariniques.

Nous avons effectué l'étude en fluorescence et moment dipolaire des différentes coumarines synthétisées dans la partie expérimentale.

I.7.2. Rendements quantiques de la fluorescence

Les rendements quantiques Φ_f sont déterminés à la longueur d'onde d'excitation prise du spectre d'absorption pour chaque composé et pour chaque solvant.

Les rendements quantiques de fluorescence (Φ) ont été déterminés en utilisant la formule classique:

$$\Phi_x = (\Phi_s \cdot A_s \cdot F_x \cdot n_x^2) / (A_x \cdot F_s \cdot n_s^2)$$

Où «A» est l'absorbance à la longueur d'onde d'excitation, "F" l'aire sous la courbe de fluorescence, et "n" est l'indice de réfraction des solvants utilisés. Les indices « S » et

« X » réfèrent le standard et le symbole du composé pour lequel on veut calculer le rendement quantique de la fluorescence respective. La fluorescéine di-sodique ($\Phi = 0.9$) est utilisée comme standard.

I.7.3. Moment dipolaire

Le moment dipolaire reflète le degré de répartition des charges dans une molécule.

Habituellement, il est utilisé pour illustrer une variété de propriétés physiques et chimiques.

I.7.3.1. Calcul du moment dipolaire par la méthode théorique (Méthode de simulation)

La méthode DFT [145,146] est exécutée par l'ensemble du Gaussian (version09 dans cette étude) qui a été largement utilisée depuis longtemps [147]. Toutes les structures sont optimisées par la base 6-31+G(d,p). Les moments dipolaires des dérivés des chromenes ont été calculés par la méthode B3LYP /6-31+G(d,p)

Les vibrations harmoniques sont calculées afin de caractériser les structures des différents dérivés des chromenes. Les interactions soluté-solvant sont évaluées en utilisant le modèle de polarisation continuum (CPCM) [148] dans lequel la cavité est considérée comme un modèle d'unités d'atomes topologique (UATM).

I.7.3.2. Calcul du moment dipolaire par la méthode solvatochromique

Afin de déterminer les moments dipolaires de l'état fondamental et excité, nous avons utilisé la méthode solvatochromique. Selon cette méthode, le déplacement des fréquences d'absorption des molécules provient d'interactions soluté-solvant. Les expressions des déplacements solvatochromiques sont données par les équations de A. Kawski et P. Bojarski [149], il existe deux méthodes pour évaluer le moment dipolaire, cette partie sera développée en détail dans la partie expérimentale.

I.8. Etude des activités biologiques : antibactérienne, anti oxydante et cytotoxique

La coumarine et ses dérivés sont biologiquement très actifs. Il a été constaté que les activités sont dépendantes du noyau de la coumarine [150,151]. Parmi ces activités nous pouvons citer : l'activité anti-bactérienne [152], anti-thrombotique et vasodilatatrice [153], anti-mutagène [154], l'inhibition de la lipoxygénase et de la cyclooxygénase [155,156], le piégeage d'espèces réactives de l'oxygène et l'activité anti-tumorigènes [157,158].

Le fait que ces composés aient des propriétés médicinales aussi significatives, a incité de nombreux chercheurs à travailler dans ce domaine et plusieurs revues récentes résument les progrès réalisés [159-160].

Il nous a donc semblé intéressant d'inscrire ce travail dans cet axe de recherche. Le but de cette étude est d'évaluer l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion en milieu gélosé, l'activité anti-radicalaire par le test au DPPH et de la cytotoxicité sur les cellules tumorales du myélome murin de nos composés synthétisés et de leurs analogues iodés.

Références bibliographiques

- [1] Wu, L., Wang, X., Xu, W., Farzaneh, F., and Xu, R. (2009). The structure and pharmacological functions of coumarins and their derivatives. *Curr. Med. Chem.*, 16, 4236–4260. doi: 10.2174/092986709789578187
- [2] Tebakh, C., Imerzoukene, F. (2009). Synthèse et caractérisation de quelques molécules anticoagulantes dérivées de la coumarine. Master: Chimie pharmaceutique: UMMTO.
- [3] Khan, I.A, Kulkarni, M.V., Gopal, M., Shahabuddin, M.S. (2005). Synthesis and biological evaluation of novel angularly fused polycyclic coumarins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters.*, 15, 3584-3587. doi:10.1016/j.bmcl.2005.05.063
- [4] Lakowicz, J.R. (1999). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Kluwer Academic/Plenum Publishers: New York, NY, USA, Chapter 3, p. 280.
- [5] Valeur, B. (2001). *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-Verlag Chemie GmbH: Weinheim, Germany, Chapter 3, p. 79.
- [6] Barnhar, E. R. (1988). *Physicians' Desk Reference*. Medical Economics, Oradell, NJ. 42nd ed.
- [7] Olimpo, G., Osvaldo, Y., Antonio G., Mena, N., Marco, T. (2014). Synthesis of Coumarin Derivatives as Fluorescent probes for membrane and cell dynamics studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 76, 79-86. doi:10.1016/j.ejmech.2014.02.016
- [8] Chen, R. F. (1968). *Chen Anal. Lett*, 1, 423-428.
- [9] Wolfbeis, O. S., Furlinger, E., Kroneis, H and Marsoner, H. Z. (1983). A study on fluorescent indicators for measuring near neutral ("Physiological") pH-values. *Anal. Chem.*, 314, 119-124. doi:10.1007/BF00482235.
- [10] Abernethy, J.L. (1969). The historical and current interest in coumarin. *J. Chem Educ*, 46, 561. doi:10.1021/ed046p561.
- [11] Gallivan, J.B. (1970). Spectroscopic studies on coumarin. *Mol. Photochem-2* (3) 191-211.
- [12] Bergman, A and Jortner, J. (1973). Study of Spontaneous and Stimulated Emission of Various Solutions of 4-Methylumbelliferone. *J. Lumines*, 6, 390-403.
- [13] Giri, R., Rathi, S.S., Murti, V. V. S and Machwe, M. K. (1991). Study of fluorescence characteristics of 3-phenyl coumarins. *Ind. J. Pure Appl. Phys.* 29, 111-115.
- [14] Singh, S. and Machwe, M.K. (1991). *Indian journal of Pure and Applied physics*, 29, 402-405.

- [15] Aberloa, T. L., and Aberloa, F. L. (1996). *Journal of Luminescence*. 68, 149-155.
- [16] Song, P.S. and Gordon, W.H. III. Spectroscopic study of the excited states of coumarin. *The journal of Physical Chemistry* 74;(24), 4234-4240. doi: 10.1021/j100718a010.
- [17] Giri, R. (1992). Temperature effect study upon the fluorescence emission of substituted coumarins. *Spectrochimica Acta*, 48A n°6, 843-848. doi: 10.1016/0584-8539(92)80080-G.
- [18] McCarthy, P. K. and Blanchard, G. J. (1993) AM1 study of the electronic structure of coumarins. *J. Phys. Chem.* 97, 12205-12209. doi: 10.1021/j100149a018.
- [19] Jones II, G.; Jackson, W. R.; Halpern, A.M. (1980) Medium effects on fluorescence quantum yields and lifetimes for coumarin laser dyes. *Chemical Physics Letters*, 72 (2), 391-395. doi: 10.1016/0009-2614(80)80314-9
- [20] Nad, S.; Kumbhakar, M.; Pal, H. (2003). Photophysical properties of coumarin-152 and coumarin-481 dyes: Unusual behavior in nonpolar and in higher polarity solvents. *Journal of Physical Chemistry A*, 107 (24), 4808-4816. doi: 10.1021/jp021543t.
- [21] Wagner, B. D. (2009). The Use of Coumarins as Environmentally-Sensitive Fluorescent Probes of Heterogeneous Inclusion Systems. *Molecules* 2009, 14 (1), 210-237. doi: 10.3390/molecules14010210.
- [22] Katritzky, A. R.; Fara, D. C.; Yang, H.; Tamm, K.; Tamm, T.; Karelson, M., (2004) Quantitative measures of solvent polarity. *Chemical Reviews*, 104 (1), 175-198. doi: 10.1021/cr020750m.
- [23] Lakowicz, J. R., (2006). Principles of fluorescence spectroscopy. Springer: New York.
- [24] Catalán, J.; López, V.; Pérez, P.; Martín-Villamil, R.; Rodríguez, J.-G., (1995) Progress towards a generalized solvent polarity scale: The solvatochromism of 2-(dimethylamino)-7-nitrofluorene and its homomorph 2-fluoro-7-nitrofluorene. *Liebigs Annalen*, (2), 241-252. doi: 10.1002/jlac.199519950234.
- [25] Kamlet, M. J.; Abboud, J. L.; Taft, R. W., (1977). The solvatochromic comparison method. 6. The π^* scale of solvent polarities. *Journal of the American Chemical Society*, 99 (18), 6027-6038. doi: 10.1021/ja00460a031.
- [26] Hrdlovic, P.; Donovalova, J.; Stankovicova, H.; Gaplovsky, A., (2010) Influence of polarity of solvents on the spectral properties of bichromophoric coumarins. *Molecules*, 15 (12), 8915-32. doi: 10.3390/molecules15128915

- [27] Ravi, M.; Soujanya, T.; Samanta, A.; Radhakrishnan, T. P.,(1995) Excited-State Dipole-Moments of Some Coumarin Dyes from a Solvatochromic Method Using the Solvent Polarity Parameter, $E(N)(T)$. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions* , 91 (17), 2739-2742.doi:10.1039/FT9959102739
- [28] Ismail, L. F. M.; Antonious, M. S.; Mohamed, H. A.; Ahmed, H. A. H.,(1992) Fluorescence Properties of Some Coumarin Dyes and Their Analytical Implication. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Chemical Sciences*, 104 (2), 331-338.
- [29] Madhavi D.L. et al (1996), Food antioxidants, Ed: CRC PRESS, 361- 460.
- [30] Al-Ayed A. S., (2011).Synthesis of New Substituted Chromen [4,3-c]pyrazol-4-ones and Their Antioxidant Activities. *Molecules*, 16, 10292-10302.doi:10.3390/molecules161210292.
- [31] Patil R. B, Sawant S. D., Reddy K. V., Shirsat M., (2015).Synthesis, Docking Studies and Evaluation of Antioxidant Activity of Some Chromenone Derivatives. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6 (2), 381 -391.
- [32] Sullivan, W.R., Huebner, C.F., Stahmann, M.A. and Link, K.P.(1943). *J. Am. Chem. Soc.*, 65, 2288-2291.
- [33] Riboulleau, J., Champs Vallet, C., Molho, D., and Mentzer, C.(1970). *Bulletin of the Chemical Society of France*. 8-9. 3138-3144.
- [34] Okwu, D.E., and Ukanwa N.(2010). Isolation and characterization of flavonoids chalcones and anthocyanidines from *Bridelia ferruginea* benth. *Chem Sin*, 1(2): 21-28.
- [35] De March, P., Moreno-Manas, M., and Roca, J.L.(1984).The reactivity of 4-hydroxy-6-methyl-2-pyrone towards different types of ketones. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 21(5), 1371-1372.doi: 10.1002/jhet.5570210524.
- [36] Makhloufi-Chebli, M.; Hamdi, M.; Silva, A. M. S.; Balegroune F. (2008). Translactonisation intramoléculaire assistée par micro-ondes. Synthèse des coumarines. *J. Soc. Alger. Chim.* 2008, 18, 91-101.
- [37] Xiang-Shan, W., Jie, Z., Ke, Y., and Mei-Mei, Z.,. (2010). Divergent Products Obtained from the Reactions of Salicylaldehyde and 4-Hydroxycoumarin in TEBAC-H₂O, KF-Al₂O₃-EtOH, and Ionic Liquid. *Synthetic Communications*, 40, 3332-3345.doi:10.1080/00397910903419837.
- [38] Hull, A.W.(1921). The Effect of A Uniform Magnetic Field on the Motion of Electrons Between Coaxial Cylinders. *Phys. Rev.* 1921, 18, 31.doi:10.1103/PhysRev.18.31

- [39] AIEE, (1921). J. *The Magnetron*, 40, 715.
- [40] U.S. patent 2,123,728. 1935.
- [41] Anon. (1946). *Electronics*, 19, 11, 178.
- [42] Anon. *Elec. Eng.* 1946, 65, 12, 591.
- [43] Neas, E. D.; Collins, M. J. *Introduction to microwaves sample Preparation, Theory and practice. Microwave Heating*, Kingston, H. M. and Jassie L.B. ACS. Professional Reference Book, Washington, DC 1988, Chap. 2.
- [44] Stuerga, D.; Delmotte, M. in *Microwaves in Organic Synthesis*, Ed.: A. Loupy, Wiley-VCH, Weinheim, 2002, 1.
- [45] Mingos, M. D. P. in *Microwave-Assisted Organic Synthesis*, Eds.: P. LidstrUm, J. P.Tierney, Blackwell, Oxford, 2004, Chap. 1.
- [46] Baghurst, D. R.; Mingos, D. M. P.(1991). Applications of microwave dielectric heating effects to synthetic problems in chemistry. *Chem. Soc. Rev.*, 20, 1-47. doi :10.1039/CS9912000001
- [47] Gabriel, C.; Gabriel, S.; Grant, E. H.; Halstead, B. S.; Mingos, D. M. P.(1998). Dielectric parameters relevant to microwave dielectric heating. *Chem. Soc.Rev.*, 27, 213-224. doi:10.1039/A827213Z.
- [48] Decareau, R.V.; Peterson, R.A. (1986). *Microwave processing and engineering*, VCH Weinheim.
- [49] Proctor, B.E.; Goldblith, S.A.(1951). Electron magnitude radiation fundamentals and their applications in food technology. *Adv. Food Res.* 3, 120-196.
- [50] Jackson, S.M.; Rickter S.L.; Chischester, C.O.(1957). Freeze-drying of fruit. *Food Technol.*, 11, 9, 468-470.
- [51] Copson, D.A.; Decareau, R.V.(1957). Microwave energy in freeze-drying procedures. *Food Res.*, 22, 402-403.
- [52] Copson, D.A. (1954). Microwave irradiation of orange juice concentrate for enzyme inactivation. *Technol*, 8, 9, 397-399.
- [53] Copson, D.A.(1956). Microwave energy in food procedures. *IRE Trans. PGME-4*, 27-35.
- [54] Copson, D.A. (1958). Microwave sublimation of food. *Food Technol.* 12,6, 270-272.
- [55] Copson, D.A.(1975). Microwave heating. 2nd Edn., Westport, Connecticut, AVI PublishingCo., USA, 1975.
- [56] Copson, D.A.; Krajewski, E.Z. (1958), *US Patent* no. 3, 020, 645.

- [57] Lipoma, S.P.; Watkins, H.E. (1968), *US Patent* no. 3, 365, 301.
- [58] O'Meara, J.P. *J. Microwave Power*, 8, 167-172.
- [59] Cresswell, S.L.; Haswell, S.J.(2001).Microwave ovens - out of the kitchen.*J.Chem. Educ.*, 78, 900-904.doi:10.1021/ed078p900.
- [60] Gedye, R.; Smith, F.; Westaway, K.; Ali, H.; Baldisera, L.; Laberge, L.; Rousell,(1986).The Use of Microwave Ovens for Rapid Organic Synthesis*J.Tetrahedron Lett.*, 26, 279-282.doi:10.1016/S0040-4039(00)83996-9.
- [61] Giguere, R.J.; Bray, T.L.; Duncan, S.M.; Majetich, G.:(1986).Application of commercial microwave ovens to organic synthesis.*Tetrahedron Lett.*, 27, 4945-4948.doi:10.1016/S0040-4039(00)85103-5.
- [62] Kappe, C. O. (2004).Controlled microwave heating in modern organic synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43, 6250-6284.doi:10.1002/anie.200400655.
- [63] Kappe, C. O.; Stadler, A.(2005).*Microwaves in Organic and Medicinal Chemistry*, Willey-VCh, .
- [64] Didier, A. (1999). *Méthodes et techniques de la chimie organique*, collection Grenoble sciences.
- [65] Gedye, R.N. ; Wei, J.B.(1998).The rapid synthesis of organic compounds in microwave ovens.*Can. J. Chem.* 1998, 66, 17-26.doi:10.1139/v88-003
- [66] Anizon, J.Y.; Lemaire, B.; Surbled, M.(2015).*Technique de l'ingénieur, traité agroalimentaire*,F 3 060.
- [67] Kingston, H. M.; Haswell, S. J.(1997). *Microwave-Enhanced Chemistry. Fundamentals, Sample Preparation and Applications*, American Chemical Society, W Washington DC,.
- [68] Giberson, R. T.; Demaree, R. S. (2001) *Microwave Techniques and Protocols*, Humana Press, Totowa, New Jersey, .
- [69] Prentice, W. E.(2002). *Therapeutic Modalities for Physical Therapists*, Mc Graw-Hill, NewYork,.
- [70] Leadbeater, N. (2004). Making microwaves. *Chemistry World.*, 1,38-41.
- [71] Adam, D. (2003). Microwave Chemistry: Out of the Kitchen, *Nature* 421,571-572.doi:10.1038/421571a
- [72] Loupy, A. *Spectra Analyse* 1993, 175, 33.
- [73] Aurengo, A.,Petitclerc, T., (2006) Biophysique. 3^{ème}édition Médecscience – Flammarion-.
- [74] Informations sur la radioactivité : <http://www.la-radioactivité.com/>- septembre

2010.

[75] P. Dubois.(2009). Historique de l'imagerie en médecine nucléaire. IRBM 30 ; 40-46.

[76] Cardolian, Y-S. , Foehrenbach, H.(2008) Radioprotection en milieu médical: principes et mises en pratique. 2^{ème} édition Masson.

[77] Quelven, I., Monteil, J., Tafani, J-A-M.(2005). Les médicaments radiopharmaceutiques. Actualités pharmaceutiques hospitalières, volume 1, pages 45-56.

[78] Les médicaments radiopharmaceutiques.(2005). Dossier CNHIM ; XXVI, p 4-5.

[79] Richard Zimmermann.(2006).La médecine nucléaire : radioactivité au service du diagnostic et de la thérapie. EDP sciences.

[80] Dumont, A., Rizzo-Padoin, N., Darsin, D., Colombet-Lamau, C., Felice, K., Moati, F.,(2000).Référentiel de radiopharmacie. Société française de pharmacie clinique.

[81] Ayachi, N., Hamdane, R., Riba, M., Essabbah E.,(2010). Spécialisation du pharmacien hospitalier en médecine nucléaire en Tunisie. *Actualités pharmaceutiques hospitalières*, 22, 35-38. doi :ACTPHO-05-2010-6-22-1769-7344-101019-201001806

[82] Cours régional supérieur de formation sur la sûreté radiologique et le contrôle des sources de rayonnements.

[83] Dominique Desuzinges. (2000). Les radiopharmaceutiques et la radiopharmacie : Aspect réglementaire et technique.

[84] Règlement de transport des matières radioactives collection sécurité n°6, AIEA.

[85] Apparu M., Madelmont J.C. Molécules marquées à l'iode radioactif.(1998) Ln : Comet M., Vidal M. Radiopharmaceutiques - Chimie des radiotraceurs et applications biologiques. Presse Universitaire de Grenoble : 249-287

[86] Guerreau D., Saccavini J.C. (1998). Macromolécules d'intérêt biologique marquées à l'iode. Ln : Comet M., Vidal M. Radiopharmaceutiques - Chimie des radiotraceurs et applications biologiques. Presse Universitaire de Grenoble. : 350-364

[87] Le Gal J. Nouveaux radiopharmaceutiques du ^{99m}Tc : de la conception à l'évaluation biologique. Doctorat chimie et radiochimie. 8 Nov 2004, Université Paul Sabatier Toulouse III.

[88] Comet M. et Vidal M.(1998). *Radiopharmaceutiques, chimie des radiotraceurs et application biologique* .Ed.PUG.744p.

[89] Carey, F.A., Sundberg, R.J. (2007). Advanced Organic Chemistry fifth ed. Part A: Structure and Mechanisms, Springer Science Business Media, LLC, New York, USA.

- [90] Brukner, R. (2002). "Advanced Organic Chemistry, Reaction mechanisms", Elsevier.
- [91] Southon, I. W. Buckingham, J. (1989) (Eds.), "Dictionary of Alkaloids", Chapman & Hall, New York.
- [92] Benchouk, W., Mekelleche, S. M., Aurell, M. J. and Domingo, L. R. (2009). Understanding the regio- and chemoselective polar [3+ 2] Cycloaddition of the Padwa carbonyl ylides with α -methylene ketones. *Tetrahedron*, 65, 4644–4651. doi:10.1016/j.tet.2009.02.030
- [93] Rauk, A. (2001). *Orbital Interaction Theory of Organic Chemistry*, Wiley-Interscience, New York.
- [94] Nguyen, L. T., De Proft, F., Dao, V. L., Nguyen, M. T., and Geerlings, P. (2003). A theoretical approach to the regioselectivity in 1,3-dipolar cycloadditions of diazoalkanes, hydrazoic acid and nitrous oxide to acetylenes, phosphalkynes and cyanides. *J. Phys. Org. Chem.*, 16, 615-625. doi:10.1002/poc.653.
- [95] Eyring, H. (1935). The Activated Complex in Chemical Reactions. *J. Chem. Phys.*, 3, 107-115. doi:10.1063/1.1749604.
- [96] Fukui, K. (1975). *Theory of Orientation and Stereoselection*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- [97] Salem, L. (1982). *Electrons in Chemical Reaction: First Principles*, J. Wiley, New York.
- [98] Langenaeker, W., Demel, K., and Geerlings, P. (1992). Quantum-chemical study of the Fukui function as a reactivity index: Part 3. Nucleophilic addition to α,β -unsaturated compounds. *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)*, 259, 317-330. doi:10.1016/0166-1280(92)87022-R.
- [99] Geerlings, P., De Proft, F., Langenaeker, W. (2003). Conceptual Density Functional Theory. *Chem. Rev* 103, 1793-1874. doi:10.1021/cr990029p.
- [100] Pearson, R. G. (1999). Maximum Chemical and Physical Hardness. *J. Chem. Ed.*, 76, 267-275. doi:10.1021/ed076p267.
- [101] Pearson, R. G. (1988). Absolute electronegativity and hardness: application to inorganic chemistry. *Inorg. Chem.*, 27, 734-740. doi:10.1021/ic00277a030.
- [102] Chandra, A. K., and Nguyen, M. T. (2002). Use of Local Softness for the Interpretation of Reaction Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* 3, 310-323. doi:10.3390/i3040310.

- [103] Chandrakumar, K. R. S., and Pal,S.(2002).The Concept of Density Functional Theory Based Descriptors and its Relation with the Reactivity of Molecular Systems: A Semi-Quantitative Study. *Int. J. Mol. Sci.*3, 324-337.doi: 10.3390/i3040324.
- [104] Becke, A. D.(1993).Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange, *J. Chem. Phys.* 98, 5648-5652.doi:10.1063/1.464913.
- [105] Domingo, L. R. ,Chamorro,..andPerez,P.(2008).Understanding the Reactivity of Captodative Ethylenes in Polar Cycloaddition Reactions. A Theoretical Study.*J. Org. Chem*, 73, 4615-4624.doi :10.1021/jo800572a.
- [106] Domingo, L.R., Ríos-Gutiérrez, M., Patricia, P.(2016). Applications of the Conceptual Density Functional Theory Indices to Organic Chemistry Reactivity.*Molecules*. 21(6), 748-770. doi:10.3390/molecules21060748.
- [107] Chandrakumar, K. R. S., and Sourav, P.(2002). The Concept of Density Functional Theory Based Descriptors and its Relation with the Reactivity of Molecular Systems: A Semi-Quantitative Study.*Int. J. Mol. Sci*, 3, 324-337.doi:10.3390/i3040324.
- [108] Yang,W. T. and Mortier,W. J.(1986).The use of global and local molecular parameters for the analysis of the gas-phase basicity of amines.*J. Am. Chem. Soc.* 108: 5708-5711.doi:10.1021/ja00279a008.
- [109] a) Becke,A.D.(1993).Becke's three parameter hybrid method using the LYP correlation functional. *J.Chem. Phys.* 98, 5648; b) Lee,C.,Yang,W., and Parr,R.G.(1988).Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density.*Phys. Rev B*.37, 785-789.doi:10.1103/PhysRevB.
- [110] Hehre,W.J.,Schleyer,L. R., Pople, J.A (1986).*Ab initio Molecular Orbital Theory*. Wiley: NewYork.
- [111] Frisch,M.J., et al. *Gaussian 03 (Revision E.01)*, Gaussian Inc., Pittsburgh PA, 2004.
- [112] Mulliken, R.S. (1955). Electronic population analysis on LCAO–MO molecular wave functions. *J. Chem. Phys.*23, 1833-1840.doi:10.1063/1.1740588.
- [113] Breneman,C.M. andWiberg,K.B. (1990). Determining atom-centered monopoles from molecular electrostatic potentials. The need for high sampling density in formamide conformational analysis.*Comp.Chem.*11,361-373 doi:10.1002/jcc.540110311.
- [114] Reed, A.E., and Weinhold,F.(1983)Natural bond orbital analysis of near-Hartree–Fock water dimer.*J. Chem. Phys*:78,4066-7073.doi:10.1063/1.445134.

- [115] Turki,H., Abid,S., El Gharbi,R., andFery-Forgues, S.(2006).Optical properties of new fluorescent iminocoumarins. Part 2. Solvatochromic study and comparison with the corresponding coumarin.*C. R. Chimie*:9, 1252–1259.doi:10.1016/j.crci.2006.03.002
- [116] Turki,H.,Abid,S., Fery-Forgues,S., and El Gharbi,R.(2007).Optical properties of new fluorescent iminocoumarins: Part 1.*Dyes and Pigments*73, 311-316.doi:10.1016/j.dyepig.2006.01.001.
- [117] Fakhfakh,M., Turki, H., Abid,S., El Gharbi,R., Fery-Forgues, S.(2007).Preparation and optical properties of new fluorescent iminocoumarins: Study of *N*-acyl-derivatives. *Journal ofPhotochemistry and Photobiology A: Chemistry* 185, 13–18.doi:10.1016/j.jphotochem.2006.04.036.
- [118] Raikar, U.S., Renuka, C.G.,Nadaf, Y.F.,Mulimani, B.G., Karguppikar, A.M. and Soudaga, M.K.(2006).Solvent effects on the absorption and fluorescence spectra of coumarins 6 and 7 molecules: Determination of ground and excited state dipole moment .*Spectrochimica Acta Part A* 65, 673–677.doi:10.1016/j.saa.2005.12.028.
- [119]Melavanki, R.M.,Kusanur, R.A.,Kulakarnib,M.V.,andKadadevarmath, J.S.(2008).Role of solvent polarity on the fluorescence quenching of newly synthesized 7,8-benzo-4-azidomethyl coumarin by aniline in benzene–acetonitrile mixtures.*JournalofLuminescence*:128, 573–577.doi:10.1016/j.jlumin.2007.08.013.
- [120] Kulinich, A. V.,Derevyanko, N. A.,Ishchenko, A.A.,Bondarev, S. L., Knyukshto,V. N.(2008).Structure and fluorescence properties of indole cyanine and merocyanine dyes with partially locked polymethine chain.*Journal of Photochemistryand Photobiology A: Chemistry* 197,40–49.doi:10.1016/j.jphotochem.2008.06.020
- [121] Marcelo,G., De Francisco,R., Gonzalez-Alvarez, M J.,Mendicuti,F.(2008).Fluorescence properties of (*R*)- and (*S*)-[1,1'-binaphthalene]-2,2'-diols solutions and their complexes with cyclodextrins in aqueous medium.*Journal ofPhotochemistry andPhotobiology A: Chemistry* 200, 114-125.doi:10.1016/j.jphotochem.2008.06.021.
- [122] Singh,S., and Machwe, M. K.(1991).*Indian Journal of Pure and Appllied Physics*, 29 ,402-405.
- [123] Mannekutla, J.R. Mulimani, B.G. andInamdar, S.R.(2008).Solvent effect on absorption and fluorescence spectra of coumarin laser dyes: evaluation of ground and excited state dipole moments.*Spectrochimica Acta Part A*69 ,419–426.doi:10.1016/j.saa.2007.04.016

- [124] Joseph, K.S., Moser, A.C., Basiaga, S.B.G., Schiel, J.E., and Hage, D.S. (2009). Evaluation of alternatives to warfarin as probes for Sudlow site I of human serum albumin. Characterization by high-performance affinity chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1216, 3492–3500. doi:10.1016/j.chroma.2008.09.080.
- [125] Wiosetek-Reske, A. M. Wysocki, S., and Bak, G.W. (2006). Determination of dipole moment in the ground and excited state by experimental and theoretical methods of N-nonyl acridine orange. *Spectrochimica Acta Part A* 62, 1172–1178. doi:10.1016/j.saa.2005.04.010.
- [126] Párkányi, C., Stem-Beren, M. R., Martínez, O.R., Aaron, J.J., Bulaceanu-MacNair, M., Arrieta, A. F. (2004). Solvatochromic correlations and ground- and excited-state dipole moments of curcuminoid dyes. *Spectrochimica Acta Part A* 60, 1805–1810. doi:10.1016/j.saa.2003.07.013.
- [127] Raikar, U.S., Renuka, C.G., Nadaf, Y.F., Mulimani, B.G., Karguppikar, A. M. Soudagar, M.K. (2006). Solvent effects on the absorption and fluorescence spectra of coumarins 6 and 7 molecules: determination of ground and excited state dipole moment. *Spectrochimica Acta Part A* 65, 673–677. doi:10.1016/j.saa.2005.12.0280.
- [128] Thipperudrappa, J., Biradar, D.S., Manohara, S.R., Hanagodimath, S.M., Inamadar, S.R., Manekutla, R.J. (2008). Solvent effects on the absorption and fluorescence spectra of some laser dyes: Estimation of ground and excited-state dipole moments. *Spectrochimica Acta Part A*: 69, 991–997. doi: 10.1016/j.saa.2007.06.002.
- [129] Evale, B.G., Hanagodimath, S.M., Khan, I.A., Kulkarni, M. V. (2009). Estimation of dipole moments of some biologically active coumarins by solvatochromic shift method based on solvent polarity parameter, $E(T)(N)$. *Spectrochimica Acta Part A* 73, 694–700. doi:10.1016/j.saa.2009.03.016.
- [130] Chandrasekhar, K., Naik, L.R., Kumar, H.M.S., Math, N.N. (2006). Steady-state absorption and fluorescence study: Dipole moments of coumarins. *Indian Journal of Pure and Applied Physics* :44, 292–299.
- [131] Siddlingeshwar, B., Hanagodimath, S.M., Kirilova, E.M., and Kirilov, G.K. (2001). Photophysical characteristics of three novel benzanthrone derivatives: Experimental and theoretical estimation of dipole moments. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Transfer* 112, 448–456. doi:10.1016/j.jqsrt.2010.09.001.
- [132] Makhloufi-Chebli, M., Hamdi, S. M., Rabahi, A., Silva, A. M.S. and Hamdi, M. (2013). Estimation of ground- and excited-state dipole moments of 3-acetoacetyl-coumarin derivatives from a solvatochromic shift method based on the solvent polarity

parameter. *Journal of Molecular Liquids* Volume 181, 89–96. doi:10.1016/j.molliq.2013.02.019.

[133] Cisse, M.L. (1999). Etude des propriétés photophysiques des coumarines substituées ; thèse doctorat 3^{ème} cycle à DAKAR (Sénégal).

[134] Giri, R. (1992). Effects of Temperature on Calcium-Sensitive Fluorescent Probes. *Spectrochimica Acta*, 48A, 06, 843-848. doi:10.1016/S0006-3495(00)76758-0.

[135] Valeur, B. (2004). Invitation à la fluorescence moléculaire. Bibliothèque National de Paris .

[136] Zabradnik, M. (1992). The Production and Application of Fluorescent Brightening Agents; John Wiley & Sons: New York.

[137] Reichardt, C. (2003). Solvents and Solvent effects in Organic Chemistry, 3rd ed., Wiley-VCH, Weinheim.

[138] Kawski, A., and Rabek, J. F. (1992). (Eds.), Progress in Photochemistry and Photophysics, Vol. V, CRC Press, Boca Raton, pp. 1-47.

[139] Liptay, W., and Lim, E. C. (Eds.) (1974). Excited States, Vol. I, Academic Press, New York, pp. 129-229.

[140] Mazumdar, S., Manoharan, R., and Dogra, S. K. (1989). Solvatochromic effects in the fluorescence of a few diamino aromatic compounds. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 46, 301-314. doi:10.1016/1010-6030(89)87047-9.

[141] Giri, R., and Bajaj, M.M. (1992). Estimation of excited state dipole moment of substituted coumarins. *Curr. Sci.*, 62, 522-525.

[142] Raikar, U. S., Renuka, C. G., Nadaf, Y. F., Mulimani, B. G., Karguppikar, A. M., Soudagar, M. K. (2006). Solvent effects on the absorption and fluorescence spectra of coumarins 6 and 7 molecules: Determination of ground and excited state dipole moment. *Spectrochim. Acta Part A*, 65 673-677. doi:10.1016/j.saa.2005.12.028

[143] Raikar, U.S., Tangod, V.B., Mannopantar, S.R., and Mastiholi, B.M. (2010). Ground and excited state dipole moments of coumarin 337 laser dye. *Optics Communications*, 21, 4289-4292. doi :10.1016/j.optcom.2010.06.037.

[144] Raikar, U.S., Tangod, V.B., Mastiholi, B.M., and Sreenivasa, S. (2010). Solvent effects and photophysical studies of ADS560EI laser dye. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 9, 188-197.

[145] Becke, A.D. (1993). A new mixing of Hartree-Fock and local density-functional theories. *J. Chem. Phys.* 98, 1993, 1372-1377. doi:10.1063/1.464304.

- [146] Lee, C., Yang, W., and Parr, R.G. (1998). Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B.* 37, 785. doi:10.1103/PhysRevB.37.785
- [147] GAUSSIAN 03, Revision B.04. (2003). Gaussian, Inc. Pittsburgh PA.
- [148] Cossi, M., Rega, N., Scalmani, G., and Barone, V. (2003). Energies, structures, and electronic properties of molecules in solution with the C-PCM solvation model. *J. Comp. Chem.* 24, 669-681. doi:10.1002/jcc.10189.
- [149] Kawski, A and Bojarski, P. (2011). Comments on the determination of excited state dipole moment of molecules using the method of solvatochromism. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 82 (2011), Pages 527-528. doi:10.1016/j.saa.2011.05.102
- [150] Jimenez-Orozco, F.A., Molina-Guarneros, J.A., Mendoza-Patino N, Leon-Cedeno F, Flores-Perez, B., Santos-Santos, E., and Mandoki, J-J. (1999). Cytostatic activity of coumarin metabolites and derivatives in the B16-F10 murine melanoma cell line. *Melanoma Res*, 9:243-247.
- [151] Bedair, A.H., El-Hady, N.A., Abd El-Latif, M.S., Fakery, A.H., El-Agrody, A.M. (2000). 4-Hydroxycoumarin in heterocyclic synthesis: Part III. Synthesis of some new pyrano[2,3-d]pyrimidine, 2-substituted[1,2,4]triazolo[1,5-c]pyrimidine and pyrimido[1,6-b][1,2,4]triazine derivatives. *Il Farmaco*, 55:708-714. doi:10.1016/S0014-827X(00)00097-5.
- [152] Laurin, P., Ferroud, D., Klic, M., Dupis-Hamelin, C., Mauvais, P., Lassaingne, P., Bonnefoy, A., Musicki, B. (1999). Synthesis and in vitro evaluation of novel highly potent coumarin inhibitors of gyrase B. *Bioorg Med Chem Lett*, 9:2079-2084. doi:10.1016/s0960-894x(99)00329-7.
- [153] Wu, C.R., Huang, M.Y., Lin, Y.T., Ju, H.Y., Ching, H. (2007). Antioxidant properties of Cortex Fraxini and its simple coumarins. *Food Chem*, 104:1464-1471.
- [154] Du, L., Li, M., Zheng, S., and Wang, B. (2008). Rational Design of a Fluorescent Hydrogen Peroxide Probe Based on the Umbelliferone Fluorophore. *Tetrahedron Lett*, 49:3045-3048. doi:10.1016/j.tetlet.2008.03.063.
- [155] Kimura, Y., Okuda, H., Arichi, S., Baba, K., and Kozawa, M. (1985). Effects of stilbene on arachidonate metabolism in leukocytes. *Biochim Biophys Acta*, 834:224-229.
- [156] Tavolari, S., Bonafè, M., Marini, M., Ferreri, C., Bartolini, G., Brighenti, E., Manara S, Tomasi, V., Laufer, S., and Guarnieri, T. (2008). Licofelone, a dual COX/5-LOX inhibitor, induces apoptosis in HCA-7 colon cancer cells through the mitochondrial

pathway independently from its ability to affect the arachidonic acid cascade. *Carcinogenesis*, 29(2):371–380.doi:10.1093/carcin/bgm265.

[157] Thati, B., Noble, A., Creaven, B.S., Walsh, M., Kavanagh, K., and Egan, D.A: Apoptotic cell death: a possible key event in mediating the in vitro anti-proliferative effect of a novel copper(II) complex, [Cu(4-Mecdo)(phen)(2)] (phen=phenanthroline, 4-Mecdo=4-methylcoumarin-6,7-dioxacetate), in human malignant cancer cells. *Euro J Pharmacol*, 569(1–2):16–28.doi:10.1016/j.ejphar.2007.04.064.

[158] Sharma, S., Stutzman, D., Kelloff, J.G., and Steele, V.E(1994). Screening of Potential Chemopreventive Agents Using Biochemical Markers of Carcinogenesis. *Cancer Res*, 54:5848–5855.

[159] Zhang, C.X., Lippard, S.(2003). New metal complexes as potential therapeutics. *Curr Opin Chem Biol*, 7:481–489.doi:10.1016/S1367-5931(03)00081-4.

[160] Sakurai, H., Kojima, Y., Yoshikawa, Y., Kawabe, K., and Yasui, H.(2002). Antidiabetic vanadium(IV) and zinc(II) complexes. *Coord Chem Rev*, 226:187–198.doi:10.1016/S0010-8545(01)00447-7.

[161] Patel, R.V., Patel, J.K., Kumari, P., and Chikhaliya, K.H.(2012). Synthesis of novel quinolone and coumarin based 1,3,4-thiazdiazolyl and 1,3,4-oxadiazolyl N-Mannich bases as potential antimicrobials. *Lett Org Chem*, 9:478–486.doi:10.2174/157017812802139681.

[162] Patel, R.V., Kumari, P., Rajani, D.P., Chikhaliya, K.H.(2011). Synthesis, characterization and pharmacological activities of 2-[4-cyano-(3-trifluoromethyl)phenylamino]-4-(4-quinoline/coumarin-4-yloxy)-6-(fluoropiperazinyl)-stiazines. *J Fluor Chem*, 132:617–627.doi:10.1016/j.jfluchem.2011.06.021.

[163] Siddiqui, Z.N., Mohammed Musthafa, T.N., Ahmad, A., Khan, A.U.(2011). Synthesis of 4-Hydroxycoumarin Heteroarylhybrids as Potential Antimicrobial Agents. *Arch Pharm Chem Life Sci*, 11:394–401.

CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

Chapitre II : Matériel et méthodes

Ce chapitre est réservé à la partie « matériel et méthodes » avec une brève description des différentes techniques de caractérisations des composés synthétisés et iodés.

II.1. Les coumarines synthétisées

Coumarines synthétisées dans notre laboratoire comme indiqué dans la littérature [1-3]

Composé **4**: 7-hydroxy-4-méthyl-2*H*-chromen-2-one

Composé **5**: 3-(2-hydroxybenzoyl)-2*H*-chromen-2-one

Composé **6**: 3-(2-hydroxybenzoyl)-2*H*-benzo[*h*] chromen-2-one

Les composés **1** à **3** (Figure II.1) n'ont pas été synthétisés mais ont servi dans l'étude théorique.

H-chromèn-2-one **1**, 4-méthyl-2*H*-chromèn-2-one **2**, 7-hydroxy-2*H*-chromèn-2-one **3**, 7-hydroxy-4-méthyl-2*H*-chromèn-2-one **4**, 3-(2-hydroxybenzoyl)-2*H*-chromèn-2-one **5** and 3-(2-hydroxybenzoyl)-2*H*-benzo[*f*] chromèn-2-one **6**.

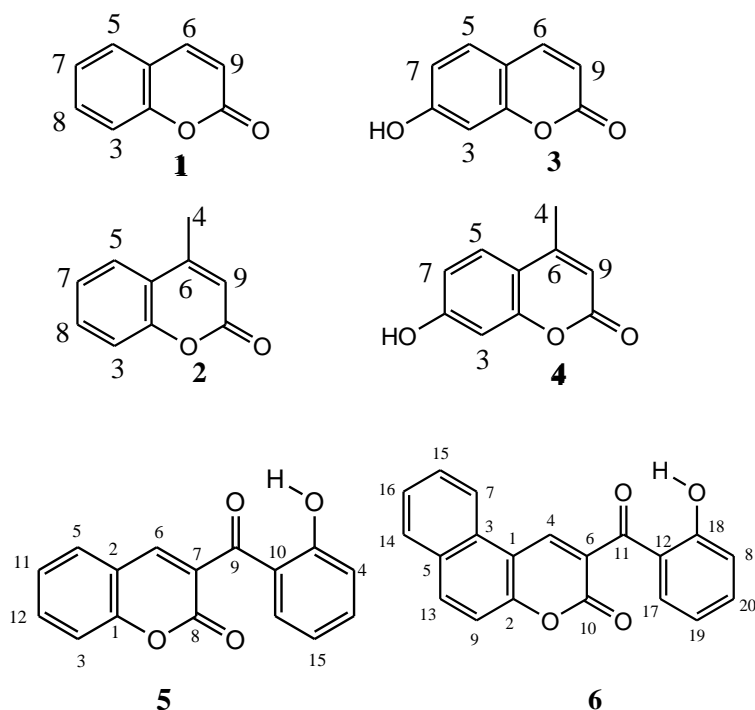


Figure II.1: Composés étudiés (numérotation Gaussian).

Les structures moléculaires et la pureté des composés synthétisés ont été confirmées par spectroscopie RMN (^1H , ^{13}C , HMBC, HSQC et Noesy) et spectrométrie de masse. (voir annexe)

II.2. Les réactifs

Tous les solvants sont obtenus auprès de Sigma Aldrich et sont de pureté chimique adaptée pour une utilisation en HPLC, CCM et de grade spectroscopique.

- Acide chlorhydrique
- Diméthylsulfoxyde DMSO
- Acétonitrile
- Chloroforme
- Acétate d'éthyle
- Méthanol
- Ethanol
- Dichlorométhane
- N,N-diméthylformamide
- Chloramine-T (CAT)
- Thiosulfate de sodium
- Salicyaldéhyde
- 2-hydroxynaphtaldéhyde
- Iodure de sodium (NaI)
- 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DDPH)
- L'iode 125 a été obtenu de chez Institute of Isotopes, Hongrie
- Les plaques utilisées pour la détection des molécules iodées après synthèse (CCM) sont des plaques aluminium « TLC Silicagel gel 60 F254 »(MERCK) .Le système d'élution est composé de dichlorométhane/méthanol 11 :1.Les CCM sont analysées en lumière visible et sous UV (254 et 356 nm).Les plaques utilisées pour les contrôles de puretés radiochimiques sont des plaques ITLC-SG (Gelman Sciences Inc).

II.3. Appareils

- Pour la synthèse: un micro-ondes multimode (un four à micro-ondes modifié candy mga20 m) possédant un seul magnétron (2450 MHz) avec une puissance délivrée

maximale de 800 W. Il est gradué en W (de 100 à 800 W). Les expériences ont été effectuées dans un ballon Pyrex équipé d'un condenseur. Au cours des expériences, le temps, la température et la puissance ont été surveillés.

- La température a été contrôlée à l'aide d'un thermomètre infrarouge externe (Flashpoint FZ400).
- Les points de fusion ont été déterminés sur un appareil Stuart Scientific SPM3 équipé d'un microscope.
- Les spectres IR ont été enregistrés sur un spectromètre IR BRUKER TENSOR 27.
- Les spectres RMN ¹H et ¹³C ont été enregistrés dans des solutions de DMSO-d₆ sur des spectromètres Bruker Avance 300 (300,13 MHz pour ¹H et 75,47 MHz pour ¹³C). Les déplacements chimiques sont exprimés en parties par million (ppm) en utilisant le TMS comme référence interne. Les assignations ¹³C ont été effectuées avec HSQC et HMBC
- Les spectres de masse ont été enregistrés sur un spectromètre de masse quadripolaire Nermag R10-10C à 70 eV.
- L'analyse HPLC a été effectuée pour analyser le composé **4** iodés non radioactif par injection de 10 µL de solution purifiée dans la colonne (RP-18.150x4.6mm) et le détecteur spectrophotomètre UV. La colonne a été éluée avec un mélange acétonitrile: eau (70% acétonitrile, 30% eau) avec la phase mobile et le débit a été ajusté à 1,0 ml / min.
- Toutes les mesures spectrophotométriques ont été effectuées à température ambiante. Les spectres d'absorption UV/Vis ont été enregistrés sur un spectrophotomètre JENWAY 6800. L'erreur expérimentale estimée était de 2 nm sur le maximum de la bande et de 5% sur le coefficient d'extinction molaire. Le travail de fluorescence a été effectué sur un Spectrofluoromètre JASCO-FP 8200 et les données ont été analysées par logiciel associé. L'ajustement linéaire a été effectué à l'aide du logiciel Origin 8.0. La densité de la molécule sonde a été extraite du logiciel d'esquisse ACD-Labs / Chem. La source d'excitation est une lampe flash au xénon de longue durée.
- Mesure de la radioactivité : Différents instruments de mesure de la radioactivité ont été utilisés. La mesure des échantillons liquides et solides est réalisée soit par un activimètre ISOMED 1010 (pour les activités supérieures à 37 KBq), soit par un passeur d'échantillon, compteur gamma Perkin Elmer 2470 (pour les activités inférieures à 37 KBq) assisté par ordinateur et piloté par un logiciel d'exploitation.
- Culture cellulaire : Incubateur à CO₂, hotte à flux laminaire, microscope inversé.

- Software :
 - ✓ Le logiciel Gaussian 09 est un logiciel de chimie numérique d'étude et de modélisation moléculaire, il est basé sur les lois fondamentales de la mécanique quantique, Gaussian permet de pronostiquer les énergies, les structures moléculaires et les fréquences de vibration de systèmes moléculaires complexes, et d'anticiper leurs propriétés chimiques. Molécules et réactions peuvent être étudiées dans une gamme étendue de conditions non seulement pour des espèces stables ou des composés complexes mais également pour des composés impossibles à observer expérimentalement, comme des intermédiaires éphémères ou des états de transition.
 - ✓ Logiciel ACD/ChemSketch (pour les calculs de densité des composés)
 - ✓ OriginPro8
 - ✓ ChemDrawPro08

II.4. Matériel biologique et milieux de culture

- ✓ Les lignées cellulaires Sp2-0 / Ag14 utilisées pour les tests de cytotoxicité ont été aimablement obtenues de l'Institut Pasteur de Dely Ibrahim, Alger.
- ✓ Bactéries à Gram positif : *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*.
- ✓ Bactéries à Gram négatif : *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*.
- ✓ Milieu BHIB (bouillon cœur /cervelle)
- ✓ Gélose nutritive (GN)
- ✓ Milieu de culture Muller Hinton
- ✓ Milieu de culture DMEM (Dulbecco minimal essential medium)
- ✓ Bicarbonate de sodium
- ✓ Pénicilline/ Streptomycine
- ✓ Sérum de veau fœtal
- ✓ Sodium pyruvate
- ✓ L-glutamine

II.5. Méthodes et techniques de purification

II.5.1. La recristallisation

C'est une méthode de purification utilisée dans la plupart des cas pour les composés pouvant se présenter sous forme de cristaux. Elle s'utilise même sur de petites quantités mais n'est pas utilisable avec les huiles et d'autres composés liquides.

Le principe de cette technique est basé sur la solubilité des mélanges à séparer.

En effet, lorsqu'on veut isoler ou purifier un composé présent dans un mélange par cette technique, la première étape consiste à trouver le meilleur solvant de recristallisation. On appelle meilleur solvant de recristallisation, le solvant dans lequel le produit à cristalliser est peu soluble à froid et très soluble à chaud alors que les impuretés sont solubles à chaud et à froid.

Par chauffage suivi immédiatement de filtration, on élimine une partie des impuretés insolubles à chaud. Le refroidissement permet au produit de cristalliser. La filtration suivante permet d'éliminer le solvant et la partie des impuretés solubles à froid [4].

II.5.2. La chromatographie sur couche mince

La Chromatographie sur Couche Mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation et de l'identification des métabolites. Elle repose principalement sur le phénomène d'adsorption. Elle s'applique aux molécules pures, aux extraits (mélange complexes de métabolites) et aux échantillons biologiques. Elle permet d'avoir une idée globale des métabolites présents dans un extrait ou une fraction, elle est indiquée pour un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé lorsque les conditions opératoires sont bien déterminées. Elle permet également de suivre la progression d'une réaction étant donné qu'elle indique le nombre de composants dans un mélange réactionnel.

II.5.3. Chromatographie liquide haute performance-(CLHP)

La chromatographie liquide à haute performance est une technique basée sur les mêmes principes que ceux de la chromatographie classique sur colonne sans en présenter les inconvénients que sont: la lenteur des séparations, l'absence de détecteurs et la quantité considérable d'échantillon nécessaire. C'est un appareillage plus sophistiqué qui permet de mettre en œuvre, selon la nature de la phase stationnaire, aussi bien des phénomènes de partage, qui sont les plus courants, que des phénomènes d'adsorption, d'échanges d'ions ou d'exclusion. La phase stationnaire est une colonne de silice phase inverse C₁₈.

La méthode de séparation qu'elle utilise fait appel aux mêmes éléments de base que ceux employés pour la chromatographie classique sur colonne, soit un ou plusieurs solvants et une colonne remplie avec une phase stationnaire. Dans ce cas, la colonne est précédée d'une pré-colonne (phase inverse C18 également) qui permet d'éviter les colmatages éventuels occasionnés par l'accumulation de molécules de très grosse taille. Ces colonnes en phase inverse (C₁₈) permettent la séparation des composés polaires, solubles dans l'eau ou dans les mélanges hydro-alcooliques.

La grande différence par rapport à la chromatographie classique réside dans la durée d'élution. Cette vitesse est obtenue par l'application d'une pression élevée grâce à une pompe qui maintient constant le débit de l'éluant. Cette technique se distingue également de la chromatographie classique par l'utilisation d'un détecteur dont le message est enregistré puis exploité par un détecteur relié au système. Il est souvent difficile de trouver rapidement les conditions opératoires qui mèneront à une bonne séparation. Dans ce cas, la phase analytique (CLHP analytique) conduit au choix des conditions expérimentales de la séparation [5].

II.6. Les techniques d'identification structurale

L'identification des structures moléculaires organiques se fait généralement par utilisation combinée de plusieurs techniques spectroscopiques, la spectrométrie de masse, la spectrométrie UV-Visible et infrarouge et la résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone. Ces techniques permettent dans un temps réduit d'avoir des données importantes conduisant à l'élucidation structurale. Les plus utilisées au cours de notre travail ont été :

II.6.1. La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire ou RMN est une technique utilisée pour l'analyse des structures de nombreuses molécules chimiques. Elle sert principalement à la détermination structurale des composés organiques. Les principaux noyaux étudiés sont le proton ¹H, le carbone ¹³C, le phosphore ³¹P, et l'azote ¹⁵N.

Cette méthode repose essentiellement sur le phénomène de magnétisme. En effet, les noyaux de certains atomes (¹H, ¹³C, etc....) possèdent un moment magnétique nucléaire, c'est-à-dire qu'ils se comportent comme des aimants microscopiques caractérisés par une grandeur quantique appelée «le spin»[6].

La technique de RMN étudie le comportement des noyaux atomiques en présence d'un champ magnétique externe. Le champ magnétique appliqué aux produits entraîne un

dédoublage des niveaux d'énergie du spin nucléaire, de sorte qu'on puisse induire des transitions entre eux, suite à l'absorption d'une radiation électromagnétique adéquate. Les échantillons sont dissous dans un solvant deutéré qui peut être du méthanol, du chloroforme, de la pyridine etc....

Ces solvants possèdent des déplacements chimiques spécifiques. Le tube contenant l'échantillon est soumis au champ magnétique permettant l'obtention des spectres utiles à l'élucidation structurale.

Différentes techniques peuvent être utilisées :

❖ **RMN monodimensionnelle (RMN – 1D) :**

✓ **RMN proton (^1H) :**

Le spectre RMN du proton est une méthode puissante utilisée dans la détermination structurale des composés organiques inconnus. Il fournit de nombreuses informations telles que, les différents types d'hydrogènes présents dans la molécule analysée, les différents types d'hydrogènes présents dans l'environnement électronique, le nombre d'hydrogènes "voisins" d'un hydrogène donné et le déplacement chimique caractéristique de chaque proton.

✓ **RMN carbone (^{13}C): DEPT 135° et Jmod**

Dans cette expérience, chaque atome de carbone qui est dans un environnement unique donne un pic distinct sur un spectre.

Généralement, cette technique permet de mettre en évidence tous les carbones de la molécule.

L'analyse se base sur les déplacements chimiques observés en fonction de l'environnement de chacun des atomes de carbone. Cette expérience permet la mise en évidence des carbones primaires (CH_3), secondaires (CH_2), tertiaire (CH) et dans une moindre mesure les carbones quaternaires.

La différence majeure entre le DEPT 135° et le Jmod, réside dans le fait que les carbones quaternaires sont détectés avec le Jmod alors qu'ils ne le sont avec le DEPT 135°.

❖ **RMN bidimensionnelles (RMN – 2D) :**

Les expériences de RMN-2D reposent sur une succession de trois intervalles de temps, le temps de préparation, le temps d'évolution et le temps de détection.

Dans certaines autres expériences, il peut s'ajouter une autre période avant la détection, c'est le temps de mixage. [7]

❖ **Corrélations homonucléaires :**

- ✓ **COSY** ($^1\text{H} - ^1\text{H}$): cette expérience fournit des informations sur les couplages homonucléaires ^2J et ^3J (protons séparés par deux ou trois liaisons) entre les protons voisins et ceux qui sont adjacents.
- ✓ **NOESY** ($^1\text{H} - ^1\text{H}$) : cette technique permet d'observer, dans l'espace, les corrélations entre protons (effets Overhauser) d'une même molécule.

❖ **Corrélations hétéronucléaires :**

- ✓ **HSQC** ($^1\text{J}_{\text{H-C}}$) : cette technique permet d'observer les couplages chimiques entre les carbones et les protons directement liés entre eux. Toutefois, elle ne permet pas d'observer les déplacements chimiques des atomes de carbones quaternaires.
- ✓ **HMBC** ($^2\text{J}_{\text{H-C}}$, $^3\text{J}_{\text{H-C}}$) : cette technique permet de répondre aux problèmes précédemment posés, puisqu'elle permet la détection des couplages longue distance $^2\text{J}_{\text{H-C}}$, $^3\text{J}_{\text{H-C}}$, et permet de déduire les carbones quaternaires couplés aux protons.

II.6.2. La spectroscopie Ultra violet-Visible (UV-Visible)

Les techniques de spectroscopie UV-visible sont des méthodes simples et rapides qui fournissent des informations sur la nature chimique, les propriétés physicostructurales, et les caractéristiques optiques des composés. C'est une méthode quantitative et qualitative de grande utilité pour les analyses chimiques. Dans les composés, chaque fonction absorbe à une longueur d'onde bien déterminée. Ceci permet de caractériser les molécules. La mesure de l'absorption permet également de connaître ou de déterminer la composition chimique d'un mélange, par comparaison avec des témoins.

La spectroscopie est l'étude du spectre électromagnétique d'un phénomène visuellement détectable (d'où le suffixe -scopie). Depuis, l'œil a été remplacé par différents types de détecteurs photoélectriques et il convient alors de parler de spectrophotométrie.

La spectroscopie UV-Visible qui repose, pour les molécules organiques, sur des interactions entre le rayonnement électromagnétique et les électrons des orbitales moléculaires, et le plus souvent des électrons π et des paires libres. On parle alors de « chromophores ».

La spectroscopie UV-Visible est basée sur l'absorption du rayonnement électromagnétique et les spectres UV-Visible représentent en général l'absorbance en fonction de la longueur d'onde (A vs λ).

L'absorbance A , dans certaines conditions, est fonction de la concentration, du trajet optique et du coefficient d'extinction molaire suivant la loi de Beer-Lambert :

$$A = \epsilon \cdot L \cdot C$$

Où ϵ est le coefficient d'extinction molaire à une longueur d'onde donnée (en $\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$); l est le trajet optique (en cm) et C est la concentration de la solution étudiée [8,9].

De nombreux paramètres peuvent provoquer la déviation par rapport à cette loi. Elle n'est plus vérifiée quand la concentration devient trop élevée, quand une réaction modifie la composition ou le pH ou quand il reste des impuretés.

II.6.3. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique de détection extrêmement sensible qui permet de déterminer le poids moléculaire d'un produit pur ou de recueillir des informations structurales à partir de la nature des fragments obtenus.

Le principe de la spectrométrie de masse est basé sur l'ionisation des molécules introduite dans l'appareillage. L'ion ainsi obtenu, appelé ion moléculaire, permet la détermination de la masse molaire du composé. Il peut y avoir ruptures de liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, avec formation d'ions fragments caractéristiques puisque cette dissociation éventuelle ne se fait pas au hasard mais selon des mécanismes bien déterminés. L'ensemble de ces ions constituent le spectre de masse dont la lecture permet l'identification de la structure moléculaire. Il existe plusieurs analyses en spectrométrie de masse. Celles généralement utilisées sont énumérées ci-dessous:

- ❖ L'électrospray ou l'ionisation par électronébulisation (ESI)
- ❖ L'ionisation par impact électronique (IE)
- ❖ L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI)
- ❖ Le Fast Atom Bombardment (FAB)

Dans cette dernière technique l'ion moléculaire n'est pas toujours observable. On observe généralement, l'ion correspondant au poids moléculaire plus un proton $[M+H]^+$. D'autres ions adduits peuvent se former lorsqu'il existe des impuretés de sel ou par addition de chlorure de sodium NaCl (on obtient l'ion $[M+Na]^+$), ou de chlorure de potassium

(on obtient l'ion $[M+K]^+$). Ces informations permettent de déduire le poids moléculaire du composé étudié [10].

II.7. Synthèse des dérivés coumariniques

II.7.1. Synthèse du composé 7-hydroxy-4-méthyl-2*H*-chromèn-2-one (4)

Le composé **4** a été synthétisé selon la méthode reportée dans la littérature par les auteurs Prajapati et Gohain (Schéma II.1) [1]:

Un mélange de résorcinol (1,1 g, 10 mmol), d'acétoacétate d'éthyle (1,3 g, 10 mmol) et d'iode (0,025g, 0.2 mmol) a été placé dans un ballon adéquat sous irradiation par micro-ondes, à une température de 110 ° C pendant 1,5 min. l'évolution de la réaction a été suivi par CCM. Le mélange réactionnel a été refroidi à la température ambiante et une solution de thiosulfate de sodium à 6% froide est ajoutée en maintenant l'agitation pendant 10 à 15 min. Le précipité a ensuite été séparé par filtration, lavé avec de l'eau distillée refroidie et recristallisé dans de l'éthanol chaud pour donner la 7-hydroxy-4-méthyl-2*H*-chromèn-2-one **4** avec un rendement de 95%, pf 184-185 ° C.

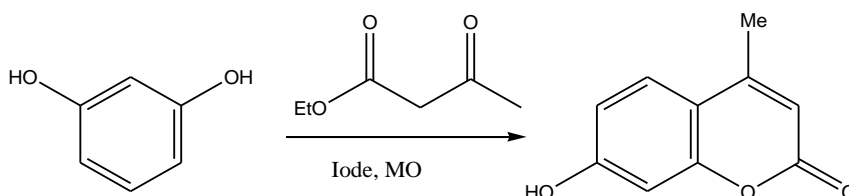


Schéma II.1 : Synthèse de la 7-hydroxy-4-méthyl-2*H*-chromèn-2-one **4**

II.7.2. Synthèses des composés 3-(2-hydroxybenzoyl)-2*H*-chromen-2-one (5) et 3-(2-hydroxybenzoyl)-2*H*-benzo[h] chromen-2-one (6)[2,3]

Un mélange de 4-hydroxy-2*H*-chromène-2-one **1** (1,62 g 0,01 mol), 0,01 mol de salicyaldéhyde **2a** (ou 2-hydroxynaphtaldéhyde **2b**) et 300 µl de la triméthylamine en tant que catalyseur, dissout dans 20 ml de méthanol a été chauffé dans un four à micro-ondes domestique à 100 W pendant 1 min et ensuite trois cycles ont été effectués à 450 W pendant 5 min. Les résidus jaunes formés pour **5** et **6** ont été filtrés et lavés avec de l'éthanol chaud. Après séchage, les poudres jaunes ont été recristallisées à partir du méthanol (Schéma II.2).

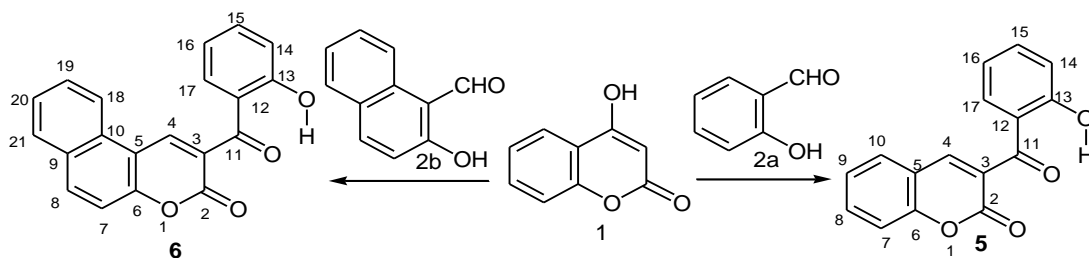


Schéma II. 2 : Synthèse des coumarines 5 et 6

II.8. Théorie et détails de calcul des indices de réactivité

Avant de procéder aux réactions d'iodation, nous avons effectué une étude théorique afin d'obtenir des « prédictions » quant à la faisabilité de telles réactions sur nos composés.

La méthode de chimie informatique offre une capacité unique à générer des structures géométriques optimales. Grâce aux propriétés structurales et électroniques des réactifs et des produits, elle permet de prédire avec plus ou moins de précision les transformations chimiques qui se produiront au cours de la réaction.

Les études de réactivité chimique basées sur le principe HSAB (Hard and Soft Acid-Base) ont joué un rôle déterminant dans l'explication du comportement chimique dans de nombreux systèmes moléculaires. Le principe HSAB devient pertinent, en conjonction avec le cadre de la théorie de la densité fonctionnelle (DFT), pour décrire quantitativement les paramètres globaux et locaux directement liés à la réactivité chimique des espèces moléculaires. Ces indicateurs de réactivité locaux basés sur la théorie sont devenus très utiles pour comprendre les détails de plusieurs classes de réactions chimiques [11-13]. Du point de vue théorique, il a été démontré que la DFT B3LYP est une méthode fiable pour le calcul des géométries et des énergies des hétérocycles aromatiques.

Les calculs de la chimie quantique rapportés dans cette contribution ont été effectués au niveau théorique de B3LYP / 6-311 + g (d, p) à l'aide du Gaussien 09.Revision A 02-SMP [14]. La notation B3LYP/6-31G indique qu'il s'agit d'un calcul DFT avec la fonctionnelle d'échange de Becke 1988 et la fonctionnelle de corrélation de Lee-Yang-Parr, avec les orbitales de Kohn et Sham (KS) développées sur base gaussienne de type 6-31G*. Les points stationnaires trouvés ont été caractérisés comme des minima vrais par des calculs de fréquence. Les systèmes cationiques et anioniques nécessaires au calcul des indices locaux ont été maintenus à la même géométrie que le système neutre. Les populations électroniques ont

été calculées à l'aide des MPA (Mulliken Population Analysis), MK (Merz-Singh-Kollman) et NPA (Natural Population Analysis) qui sont différentes méthodes pour évaluer les charges atomiques.

II.9. Iodation des composés synthétisés

Les composés radiomarqués sont généralement synthétisés par substitution électrophile directe avec I^* (radioiodine) dans des conditions d'oxydation en présence de chloramine-T (CAT). On sait que la concentration élevée de CAT par rapport à la concentration en iodure est nécessaire pour obtenir une substitution électrophile. Mais, cet excès de CAT peut également donner lieu à une poly-iodation de systèmes aromatiques activés. Pour les expériences préliminaires d'iodation à froid, nous avons étudié uniquement les effets des concentrations de substrat, de l'iodure, de l'oxydant CAT et de l'effet du temps de réaction.

Dans un premier temps, nous avons choisi les solvants compatibles avec les réactions de substitution électrophiles et qui dissolvent complètement le substrat et les réactifs utilisés. En effet, chaque substrat soumis à une iodation doit être considéré comme un cas particulier et il est préférable de ne pas appliquer sans modification « au préalable » les protocoles décrits dans la littérature pour les réactions de radio-iodation.

II.9.1. Iodation du composé 4

Dans un ballon Bicolles de 100ml contenant un mélange de solvants acétonitrile/MeOH (10ml, V/V), sont ajoutés 1 mmol du composé **4** et 1 mmol de NaI (0.15g). Le ballon est placé dans un bain-Marie à 65°C sous reflux et sous agitation, 5ml de chloramine T (0.227g, 10mmol) sont ajoutés goutte à goutte pendant 20 minutes. On note un changement de couleur du mélange réactionnel qui vire du jaune au marron foncé lors de l'ajout de l'oxydant, c'est le signe de la production de I^+ .

L'évolution de la réaction est suivie pendant deux heures par CCM, et arrêtée avec 3ml de $Na_2S_2O_3$ à 10% afin de réduire les ions I^+ qui n'ont pas réagi, le mélange réactionnel est centrifugé après ajout de quelques gouttes de HCl 10% afin de précipiter le produit formé, le culot est rincé plusieurs fois jusqu'à pH neutre puis séché.

Les préparations d'une solution oxydante de chloramine T et d'une solution réductrice de thiosulfate de sodium en solution aqueuse, sont extemporanées.

II.9.2. Iodation des composés 5 et 6

Dans un ballon de 100 ml, on introduit 1 équivalent du composé **5** (0,002 mole) / **6** (0,002 mole) au reflux dans un mélange de solvants (ACN-MeOH pour **5** et ACN-MeOH-DMSO pour **6**), auxquels sont ajoutés 3 équivalents de NaI. Le mélange est laissé quelques minutes jusqu'à dissolution complète de NaI, puis 3 équivalents de chloramine T sont ajoutés directement. Un changement de couleur du jaune au brun est apparu (présence d'ions I^+ ou oxydation d'ions I^- par la chloramine T). Le mélange est chauffé à 65 °C sous agitation magnétique. Après 3h, 2 équivalents de $Na_2S_2O_3$ sont dissous dans 1 ml d'eau distillée en maintenant l'agitation pendant 10 minutes; on observe un changement de couleur du brun foncé au brun clair (réduction des ions I^+ par le $Na_2S_2O_3$). Après concentration du mélange, du HCl (10%) est ajouté jusqu'à pH acide (1-2) un solide se forme. Le solide est filtré et lavé plusieurs fois à l'eau froide, séché et purifié à l'éther diéthylique.

II.10. Le marquage froid

Le protocole du marquage radioactif doit être compatible avec les contraintes qu'impose la manipulation de radioisotopes :

- Le temps de chauffage doit être réduit au maximum
- La radioiodation est d'autant plus efficace que le volume de la réaction est faible, en général on travaille dans un volume inférieur à 100 μ l et au maximum de 2 ml [15].
- Le nombre de mole d'iode contenu dans un volume d'iodure de sodium ($Na^{125}I$) doit être connu afin de l'appliquer dans le protocole de l'iodation « à froid », le radiomarquage se fera avec 0.5mCi de $Na^{125}I$ soit 2.3×10^{-10} mole d'iode (voir détails des calculs dans l'annexe).
- Toutes les étapes de la réaction doivent être ajustées afin de réduire le plus possible le temps d'exposition aux rayonnements.

Le protocole d'iodation appliqué au composé **4** a été reproduit dans un faible volume de réaction (= 1 ml) et des quantités équimolaires de **4**, NaI et CAT (2×10^{-6} moles), avec un chauffage initial à 100°C pendant 3 minutes puis 20 minutes à 60 °C, la réaction a été arrêtée avec $Na_2S_2O_3$ (10%), du HCl (10%) est ajouté à un pH acide (1-2) et un solide se forme, le sédiment est récupéré après centrifugation et lavé avec 100 μ L de solution diluée d'acide chlorhydrique pour éliminer toute trace d'iode n'ayant pas réagi.

Cette synthèse est ce que nous appelons « une iodation à froid » ou « un marquage à froid » (avec de l'iode non radioactif) en adoptant le protocole traditionnel du ^{125}I [16, 17]. L'analyse du produit séparé révèle que le composé **4** iodé est obtenu dans une proportion

d'environ 90%. Ce résultat est donc satisfaisant et a été adopté pour le marquage radioactif à ^{125}I .

II.11. Le marquage à l'iode 125

La réaction de substitution électrophile directe du composé **4** a été réalisée à l'aide de ^{125}I dans des conditions d'oxydation en présence de chloramine-T (CAT) [18, 19]. Le protocole de marquage radioactif doit être compatible avec les contraintes imposées par la manipulation des radio-isotopes: le temps de chauffage doit être réduit au maximum, le volume du mélange réactionnel doit être faible, la radio-iodation sera plus efficace, généralement on travaille avec un volume inférieur à 100 μL et maximum de 2 mL [20]. Il s'agit donc d'une réaction de marquage qui a été réalisée à petite échelle, comme suit: Dans un tube en verre bouchonné, le composé **4** (2×10^{-6} moles) a été dissous dans 20 μL d'une solution d'acétonitrile: méthanol (v/v) et a été ajouté à 6 μL de $\text{Na } ^{125}\text{I}$ (0,5 mCi). Une solution fraîchement préparée de 100 μL de CAT (2×10^{-6} mol) dans de l'eau distillée a été ajoutée. Au bout de 3 minutes de temps de réaction à 100 °C et de 20 minutes à 60 °C, la réaction a été arrêtée à l'aide de solutions de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0,2N).

Le mélange réactionnel a été acidifié avec 4-5 μL d'une solution d'acide chlorhydrique diluée, puis centrifugé. Le culot a été lavé avec 100 μL d'une solution diluée d'acide chlorhydrique afin d'éliminer l'iode n'ayant pas réagi, puis dissous dans 40 μL d'un mélange de dichlorométhane: méthanol (v/v).

Des aliquots de culot dissous et de surnageant ont été prélevés pour mesurer la radioactivité, à partir de laquelle le pourcentage de rendement radiochimique a été déterminé à l'aide d'un activimètre. La pureté radiochimique a été déterminée par chromatographie sur papier.

La chromatographie sur papier a été utilisée pour déterminer la pureté radiochimique: des bandes de plaques de gel de silice 60 F254 (0,75 mm) ont été utilisées, 1 à 2 μL du sédiment dissous dans du dichlorométhane / MeOH ont été placés à 2 cm au-dessus du bord inférieur d'une bande de 1 cm de largeur et de 13 cm de longueur, le dépôt s'évapore spontanément. Un mélange frais de dichlorométhane / MeOH (5: 1) a été utilisé comme phase mobile. Après développement complet, les bandes de papier ont été retirées, séchées et

recouvertes de bande adhésive et coupées en sections de 0,5 cm. Elles ont été comptées à l'aide d'un compteur à scintillation à rayons I NaI (TI). Le chromatogramme ITLC a été obtenu à partir de ces comptes.

II.12. Détermination des spectres électroniques d'absorption, de fluorescence et des moments dipolaires

Pour les spectres d'absorption U.V/Visible mesurés, les concentrations étaient de $5 \times 10^{-5} \text{M}$. Les spectres d'absorption des quatre composés **5**, **6**, **7** et **8** (les composés **7** et **8** étant les produits issus de l'iodation) sont réalisés juste après dissolution dans des solvants organiques. Le choix du solvant repose sur la solubilité commune des composés.

L'ajustement linéaire a été effectué à l'aide du logiciel Origin 8.0. La densité de la molécule sonde a été extraite du logiciel ACD / Chem Sketch. La source d'excitation était une lampe au xénon à longue durée de vie. Les rendements quantiques de fluorescence ont été déterminés en utilisant le sel de fluorescéine di-sodique ($\Phi = 0,9$, dans l'eau) comme standard et ont été déterminés en utilisant la formule classique:

$$\Phi_X = (\Phi_S A_S F_X n_X^2) / (A_X F_S n_S^2)$$

Où

A= L'absorbance à la longueur d'onde d'excitation

F= Aire sous la courbe de fluorescence

n = Indice de réfraction du solvant utilisé.

Les indices « S » et « X » réfèrent le standard et le symbole du composé pour lequel on veut calculer le rendement quantique de la fluorescence respectivement.

II.13. Etude de l'activité biologique

II.13.1. Etude de l'activité antibactérienne

II.13.1.1. Choix et origines des souches microbiennes testées

Le choix des bactéries a été porté sur quatre souches fréquentes en pathologie humaine.

- ✓ Bactéries à Gram positif : *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*.
- ✓ Bactéries à Gram négatif : *Escherichia coli* et *klebsiella pneumoniae*.

- *Escherichia coli* ATCC 25922 (bacille à Gram négatif)

Commensal du tube digestif, est la bactérie la plus fréquemment impliquée dans les infections urinaires. Elle peut aussi provoquer des diarrhées par des mécanismes très divers, ainsi que diverses infections communautaires ou nosocomiales [21].

- *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603 (Gram négatif)

Commensal du tube digestif et des voies aériennes supérieures. Germe opportuniste impliqué dans des infections nosocomiales, généralement des infections urinaires, des pneumopathies, des septicémies et de la méningite [22].

- *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (Cocci à Gram positif)

Nommée aussi staphylocoque doré, tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales [23].

- *Bacillus cereus* ATCC 10876 (Gram positif)

Un agent pathogène humain opportuniste qui est parfois associée à des infections, provoque des maladies parodontales et d'autres infections plus graves [24].

Les souches bactériennes sélectionnées sont des souches hospitalières. Elles nous ont été fournies par le laboratoire de microbiologie UMMTO et ont été conservées à 5°C dans des boîtes de Pétri à (gélose nutritive).

L'eau distillée, les milieux de culture, les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes et les disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) ont été stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

II.13.1.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne

Pour l'évaluation de l'activité antibactérienne nous avons abordés deux méthodes :

II.13.1.2.1. Méthode de diffusion de disques sur milieu solide

Cette méthode qualitative est réalisée sur toutes les souches bactériennes pour déterminer les produits actifs par apparition de zones d'inhibitions [25].

➤ **Réalisation de l'antibiogramme**

1. Préparation de pré-culture

La réactivation des souches a été effectuée par ensemencement de l'espèce bactérienne dans un milieu BHIB après incubation pendant 24h à 37°C. Un deuxième repiquage est réalisé dans des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive (GN) puis incubées à 37°C pendant 18 à 24h (Figure II.2).

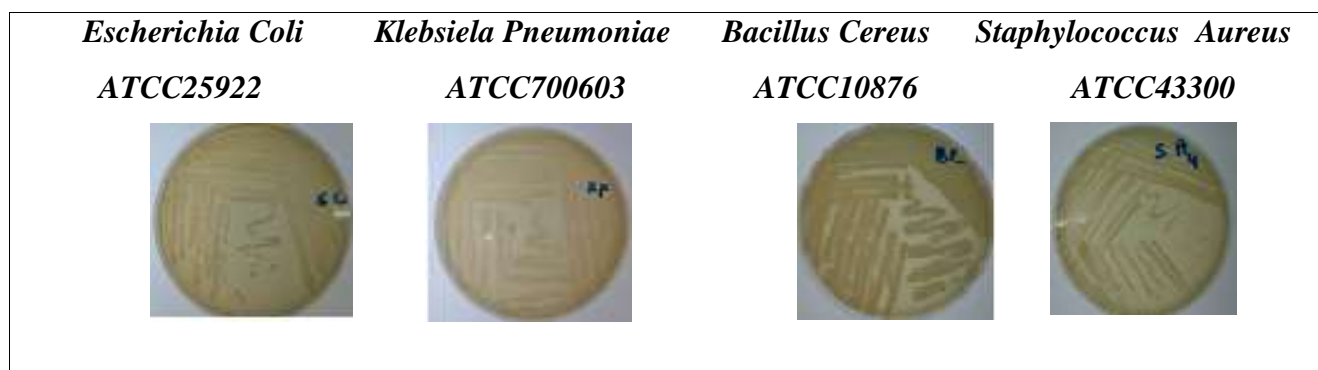


Figure II.2 : Développement des souches bactérienne dans les boites de pétri après incubation pendant 24h.

2. Préparation de la suspension bactérienne ou de l'inoculum

La méthode de culture peut aussi être utilisée pour préparer l'inoculum. Les souches bactériennes sont ensemencées dans la gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 24 h, pour optimiser leur croissance. Racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester. Décharger l'anse dans 10 ml d'eau distillée stérile, La suspension bactérienne est bien homogénéisée, son opacité doit être équivalente à une DO de 0.08 à 0.10 réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 625 nm. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

3. Préparation des échantillons ou produits à tester

Les échantillons (composés 5, 6, 7 et 8) ont été dissous dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) afin de préparer une concentration de 10 mg/ml pour chaque composé.

4. Ensemencement et dépôt de disques

Couler aseptiquement le milieu de culture Muller Hinton en surfusion dans des boîtes de Pétri de 15ml. On laisse refroidir et solidifier sur la paillasse. L'ensemencement est

réalisé par écouvillonnage sur les mêmes boîtes de Pétri, un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis est essoré en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées.

L'opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche.

- Les disques imprégnés de 20µl de produit sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile.

De même les antibiogrammes réalisés avec des disques contenant des antibiotiques (témoin positif) appropriés prêts à l'emploi ont été utilisés pour la comparaison avec les résultats de nos produits, qui sont : Augmentin Aug (30µg), Acide Nalidixique NA (30µg) et Cefoxitine FOX (30µg).

Finalement, les boîtes de Pétri sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C.

II.13.1.2.2. Méthode des dilutions

Les produits qui semblaient être actifs, résultats révélés par l'apparition de zones d'inhibitions, font l'objet d'une évaluation de leurs activités par la méthode de dilutions pour l'étude de la concentration minimale inhibitrice (CMI). Plus le diamètre de la zone d'inhibition est grand plus la souche est sensible [26].

1. Préparation de l'inoculum

L'inoculum a été préparé de même façon que précédemment pour avoir une D.O (0.08-0.1) pour les deux souches *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*.

2. Préparation de la solution mère

Dans un tube à essai on met 9 ml de milieu de culture BHIB liquide plus 1 ml de la suspension bactérienne avec une D.O (0.08-0.1).

3. Préparation des échantillons

Les dilutions sont préparées à partir de la solution mère du produit 5 à 10mg/ml en faisant des dilutions de demi pour avoir des concentrations de 5 ; 2,5 et 1,25 mg/ml dans le DMSO.

4. Préparation des tubes eppendorfs

Dans chaque tube eppendorf nous mettons 0.5 ml de la solution mère à laquelle nous ajoutons 20µl de chaque échantillon, après forte agitation le mélange est incubé pendant 24 heures à 37°C.

Témoin - : 0.5ml du milieu de culture BHIB plus 20µl de l'échantillon à tester.

Témoin + : 0.5ml de la solution mère.

Agiter puis incuber pendant 24h à 37°C.

II.14. Evaluation du pouvoir antiradicalaire par la méthode de DPPH·

II.4.1. Principe

Le DPPH (2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl) est un radical libre stable violet en solution, il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm, cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH· est réduit en diphényle picrylhydrazine par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité de l'antioxydant à donner des protons [27]. On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation:



Où: (AH) représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH· (violet) pour le transformer en diphényle picrylhydrazine (jaune) [28].

Les produits testés (5, 6, 7, et 8) sont préparés à des concentrations de 10⁻¹ mol/l puis dilués à un demi pour avoir des concentrations de 0,05 ; 0,025 et 0,0125 M dans le DMSO.

II.14.2. Mode opératoire

Un volume de 40µl, de chaque échantillon de chacune des concentrations 0.1, 0.05, 0.025 et 0.0125 mol/l, est ajouté à 2ml d'une solution de radicaux DPPH· dissout dans de l'éthanol. Le mélange est secoué énergétiquement et laissé pendant une heure à température ambiante et à l'abri de la lumière. L'absorbance du DPPH· est déterminée par colorimétrie à 517nm.

Les résultats obtenus pour chaque produit testé sont comparés à ceux obtenus pour l'acide ascorbique pris comme contrôle positif.

L'évaluation de l'activité anti-oxydante en utilisant la méthode DPPH est exprimée en pourcentage d'inhibition selon la relation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(A_0 - A_1)/A_0] * 100.$$

Avec : **A₀ : Absorbance à 517nm du standard** (contient tous les éléments mais sans aucun échantillon).

A₁ : Absorbance à 517nm de l'échantillon. Le pourcentage d'inhibition est exprimé ensuite par la valeur d'IC₅₀, sachant que la IC₅₀ est la concentration du composé nécessaire pour l'obtention de 50% de la forme réduite du radical DPPH.

II.15. Etude de l'activité cytotoxique

II.15.1. Conditions de la culture cellulaire

- **Stérilité**

Dans un laboratoire de culture cellulaire, L'aseptie doit être maintenue afin d'éviter toute contamination par des micro-organismes (bactéries, champignons...). Ces contaminants sont introduits par plusieurs sources tel que l'opérateur ou les solutions utilisées, c'est pourquoi des règles de conduite strictes ont été établies. A l'entrée du laboratoire, le port d'un sarreau et de gants est obligatoire. La culture cellulaire impose l'utilisation d'une hotte à flux laminaire afin de travailler stérilement. A chaque utilisation de la hotte, il est nécessaire de la nettoyer avant et après les manipulations. Pour cela, il faut allumer la lampe UV de la hotte pendant 30 minutes et laver la paillasse à l'isopropanol à 70 %. Après le nettoyage, le ventilateur et la lumière visible peuvent être allumés. Le matériel utilisé sous l'enceinte stérile doit être nettoyé à l'isopropanol également (bêchers, pipettes, tubes...).

- **Milieu de culture**

Les cellules ont été cultivées dans un milieu de culture DMEM préparé comme suit :

La préparation du milieu de culture se fait en deux étapes :

- *Préparation du milieu incomplet* : à l'aide d'un Erlen Meyer et d'un agitateur magnétique, on procède à la dissolution sous agitation légère, le contenu d'un flacon DMEM Hepes en poudre dans 800 ml d'eau distillée stérile. Le pH de la solution est ajusté à 7.2 par l'ajout de 3.7g de bicarbonate de sodium et quelques gouttes HCl à 1N. Le volume de la solution final est complété à 1L.

La filtration de notre milieu est réalisée à l'aide d'une pompe et d'un dispositif de filtration (Millipore), qui consiste à faire passer la solution à travers un filtre (0.22 μm). Le milieu de base préparé est réparti dans des flacons stériles de 500 ml et conservé à 4°C. Il est nécessaire de marquer le nom et la date de chaque solution préparée.

- *Préparation du milieu complet* : pour réaliser la culture cellulaire, le milieu de base préparé doit être enrichi par l'ajout du sérum et des antibiotiques. Pour chaque 100 ml du milieu de base, on rajoute 10ml de SVF (L'importante variété de protéines contenues dans le SVF maintient les cellules en culture dans un milieu où elles peuvent survivre, grandir et se multiplier. C'est le sérum le plus utilisé en culture cellulaire, 1ml de pénicilline, 1 ml de streptomycine, , 1ml de sodium pyruvate et 1ml de L-glutamine. Le mélange est légèrement agité. Le mélange est soit directement utilisé soit conservé à 4°C.

- **Matériels spécifiques**

Les cultures ont été conservées dans un incubateur à CO₂. Ainsi, la température, la quantité de dioxyde de carbone et l'hygrométrie ont pu être contrôlées. Le taux d'humidité requis est apporté par un bac d'humidification situé dans le bas de l'incubateur. Les cellules sont à 37 °C sous une atmosphère contrôlée à 5 % de CO₂ et 95 % d'humidité.

Des flasques de culture à bouchon filtrant de 25 cm² ont été utilisées pour la culture cellulaire. La présence et l'évolution des cellules dans les flasques ont été vérifiées à l'aide d'un microscope inversé. À l'inverse de la configuration standard d'un microscope optique où la lumière arrive sur l'échantillon par le bas et où l'observation se fait par le dessus, pour le microscope inversé la source de lumière est placée au-dessus de l'échantillon et les objectifs en dessous. Ainsi, les cellules présentes dans les flasques peuvent être visualisées.

II.15.2. Congélation/Décongélation des lignées tumorales murines

Les cellules myélomateuses Sp2-0 / Ag14 sont des cellules tumorales murines qui se multiplient activement en échappant à l'apoptose ou mort cellulaire programmée. Elles sont conservées dans un milieu de conservation dans une ampoule qui contient 1 ml de la suspension cellulaire. Le milieu de conservation est composé de 40 % (V/V) de milieu de culture complet, 50 % (V/V) de SVF et 10 % de DMSO (V/V), utilisé pour son effet cryoprotecteur. Ensuite, l'ampoule est conservée à - 80°C pendant 48 heures, puis dans l'azote liquide à - 196°C.

La décongélation des cellules myélomateuses commence par l'incubation de l'ampoule dans un bain-marie à 37°C pour une décongélation rapide car la décongélation lente provoquera un contact lent avec le DMSO qui est cytotoxique à température ambiante.

Ensuite, le contenu de l'ampoule est transféré vers un tube de 15 ml contenant 7 ml de milieu de culture complet froid et est homogénéisé délicatement. Puis, une centrifugation est pratiquée pendant 5 minutes à 1000 rpm et les cellules sont resuspendues dans 5 ml du milieu de culture complet. Un léger tapotage du fond du tube est effectué pour remettre en suspension le culot. Les cellules sont transférées vers des flacons de culture, et incubées à 37°C dans une atmosphère saturée en humidité contenant 5 % de CO₂.

II.15.3. Passage des lignés tumorales

Après 24 heures de culture des cellules, un contrôle quotidien de leur état est nécessaire afin de s'assurer que la culture n'a pas été contaminée durant le processus de congélation/décongélation, ainsi que pour vérifier leur confluence et leur viabilité. Si leur confluence est adéquate un passage des cellules est réalisé avec une fréquence de 48 heures.

Le passage des cellules doit se faire sous la hotte à flux laminaire et il consiste à l'aspiration de l'ancien milieu de culture.

Un volume de 2,5 ml du milieu de culture est ajouté et une homogénéisation est pratiquée pour bien séparer les cellules encore en agrégats. Après comptage et dilution convenable, les cellules sont transférées dans un nouveau flacon. Une homogénéisation est pratiquée pour répartir uniformément les cellules. Le reste des cellules est centrifugé, le milieu est éliminé, puis 1 ml du milieu de congélation est ajouté. Ensuite, les ampoules sont congelées rapidement à - 80°C pendant 48 heures puis dans l'azote liquide à - 196°C. Les cellules doivent subir deux passages avant d'être utilisées dans les expérimentations.

II.15.4. Comptage des cellules

La détermination du nombre cellulaire est une étape nécessaire qui précède chaque expérience. La méthode du bleu de trypan a été utilisée pour faire le dénombrement des cellules myélomateuses. Cette méthode permet de distinguer entre les cellules vivantes qui apparaissent claires entourées d'un halo bleu, et les cellules mortes qui apparaissent totalement bleues. Pratiquement, un volume de 10 µl de la suspension cellulaire est mélangé avec 10 µl de la solution du bleu de trypan 0,4 %. La solution obtenue est incubée pendant 5 minutes à température ambiante. Puis, les 2 chambres de l'hémocytomètre sont remplies et les

cellules sont comptées à l'aide d'un microscope à phase inverse sous un objectif X10. Le nombre de cellules est déterminé selon la formule suivante:

Concentration cellulaire par ml = nombre de cellules par carré X facteur de dilution X 10^4

II.15.6. Evaluation de la cytotoxicité

Après passage et dénombrement de la lignée cellulaire utilisée dans cette étude, un nombre de 4×10^5 cellules/ml/puits estensemencé dans des microplaques de 24 puits. Les cellules sont traitées par le véhicule (DMSO 2 %, v/v considéré comme contrôle), et les différentes concentrations des produits **5**, **6** et **8** (0, 2,5, 5, 10, 25, 50 et 100 µg/ml, concentrations finales). Trois réplicas ont été réalisés pour chaque concentration avec une répétition de la même expérience 3 fois. Après 24 heures d'incubation à 37°C le nombre de cellules dans chaque puits est déterminé en utilisant la méthode du bleu de trypan.

Le pourcentage des cellules/puits est calculé selon la formule suivante:

$$\% \text{ de viabilité} = \frac{\text{moyenne du nombre des cellules traitées}}{\text{moyenne du nombre des cellules contrôles}} \times 100$$

II.15.7. Analyses statistiques

Les valeurs de viabilité ont été présentées sous forme de moyenne + écart type (n = 3). Toutes les données relatives aux cellules traitées ont été présentées sous forme de pourcentages par rapport au contrôle non traité (100%). Les graphiques de viabilité et de CC₅₀ ont été tracés dans le logiciel Origin.8. La valeur de CC₅₀ a été calculée à partir du graphique CC₅₀ où les deux lignes se rencontrent (la dose à laquelle 50% des cellules meurent) en utilisant le logiciel Origin.8.

Références bibliographiques

- [1] Prajapati D., and Gohain, M. (2007). Iodine a Simple, Effective and Inexpensive Catalyst for the Synthesis of Substituted Coumarins. *Catal Lett.* 119 :59-63. doi: 10.1007/s10562-007-9186-6.
- [2] DeMarch, P., Moréno-Manas, M., Pleixats, R., and Roca, J. L., (1984). The reactivity of 4-hydroxy-6-methyl-2-pyrone towards different types of ketones. *J. Heterocycl. Chem.*, .21: 1371-1372. doi:10.1002/jhet.5570210524.
- [3] Makhloufi-chebli M., Hamdi M., Silva A. M. S., et Balegroune F (2008). Translactonisation intramoléculaire assistée par micro-ondes. Synthèse des coumarines. *J. Soc. Alger. Chim.* 18 :91-101.
- [4] Markham, K.R. (1982). Technique of flavonoides identification, Academic press, London.
- [5] Lagnika, L.(2005). *Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises*. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur.
- [6] Canet, D.(1991). La RMN: concepts et méthodes, Inter editions, Paris, p1-20.
- [7] Gunther, H.(1994). La spectroscopie de RMN, Masson, Paris, p10-18.
- [8] Bräse, S., Schroen M.(1999). Efficient cleavage. Cross-coupling strategy for solid-phase synthesis: A modular building system for combinatorial chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 38:1071-1073.
- [9] Dyer, J. R. (1967). Spectroscopie d'absorption appliquée aux composés organiques. *Dunod Paris ed.*; p 154.
- [10] Nielsen, J. G. and Moller J. (1970). Flavonoids of Lotus L. III. Mass spectrometric detection of 6- and 8-methoxy groups in flavonol. *Acta Chem. Scand.*, 24, 2665-2667.
- [11] Roy, R.K., Krishnamurti, S., Geerlings, P., and Pal, S.(1998). Local softness and hardness based reactivity descriptors for predicting intra- and intermolecular reactivity sequences: carbonyl compounds. *J. Phys. Chem. A* 102 (21): 3746–3755. <https://doi.org/10.1021/jp973450v>.
- [12] Chandra, A.K., Nguyen, M.T.(2002). Use of local softness for the interpretation of reaction mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* 3, 310–323. <https://doi.org/10.3390/i3040310>.
- [13] Faver, J., and Merz Jr., K.M.(2010). The utility of the HSAB principle via the Fukui function in biological systems. *J. Chem. Theory Comput.* 6 (2), 548–559. <https://doi.org/10.1021/ct9005085>.

- [14] Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Scalmani, G., Barone, V., Petersson, G.A., Nakatsuji, H., Li, X., Caricato, M., Marenich, A.V., Bloino, J., Janesko, B.G., Gomperts, R., Mennucci, B., Hratchian, H.P., Ortiz, J.V., Izmaylov, A.F., Sonnenberg, J.L., Williams-Young, D., Ding, F., Lipparini, F., Egidi, F., Goings, J., Peng, B., Petrone, A., Henderson, T., Ranasinghe, D., Zakrzewski, V.G., Gao, J., Rega, N., Zheng, G., Liang, W., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Throssell, K., Montgomery Jr., J.A., Peralta, J.E., Ogliaro, F., Bearpark, M.J., Heyd, J.J., Brothers, E.N., Kudin, K.N., Staroverov, V.N., Keith, T.A., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A.P., Burant, J.C., Iyengar, S.S., Tomasi, J., Cossi, M., Millam, J.M., Klene, M., Adamo, C., Cammi, R., Ochterski, J.W., Martin, R.L., Morokuma, K., Farkas, O., Foresman, J.B., Fox, D.J., 2016. Gaussian, Inc., Wallingford CT.
- [15] Lederman R.J., Raylman R.R., Fisher S.J., Kison P.V., San H., Nabel E.G., Wahl R.L. (2001). Detection of atherosclerosis using a novel positron-sensitive probe and 18-fluorodeoxyglucose (FDG). *Nucl. Med. Commun.* ; 22(7) : 747-753.
- [16] Sallam, Kh M., Mehany, N.L. (2009). Comparison study between direct and indirect labeling of estradiol for radioimmunoassay purpose. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 281 (3), 329–337. doi:10.1007/s10967-009-0013-y.
- [17] Lokhande, P., Hasanzadeh, K., Konda, S.G. (2011). A novel and efficient approach for the synthesis of new halo substituted 2-arylpyrazolo[4,3-c] coumarin derivatives. *European Journal of Chemistry.* 2 (2), 223–228. doi:10.5155/eurjchem.2.2.223-228.336.
- [18] Al-Momani, E., Zlatopolskiy Solbach, B.D., Resk, S.N., Machulla, H.J. (2010). Synthesis of 15-(4-[131I]iodophenyl)pentadecanoic acid (p-IPPA) via tin-precursor using Chloramine-T as an oxidant. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 286 (1), 231–234. doi:10.1007/s10967-010-0643-0.
- [19] Moustapha, M.E., Motaleb, M.A., Ibrahim, I.T., Moustafa, M.E. (2013). Oxidative radioiodination of aripiprazole by chloramine-T as a route to a potential brain imaging agent: a mechanistic approach. *Radiochemistry* 55, 116–122.
- [20] Ardisson, V. (2006). Evaluation de nouveaux radiopharmaceutiques : synthèse, évaluation et biodistribution de nouveaux radioligands peptidiques de VCAM-1 et $\alpha V\beta 3$. Thèse de doctorat, Université Joseph Fourier - Grenoble I.
- [21] Percival S.L. (2004). Microbiology of waterborne diseases, Ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston, p. 480.

- [22] Tsai S.S., and col.(2010). Characteristics of *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia in Community-acquired and Nosocomial Infections in Diabetic Patients.
- [23] Dworkin M.M., and Falkow S.(2005). Proteobacteria: Gamma subclass, Ed. Springer, *Chang Gung Med J*, 33(5), 533.
- [24] Hoffmaster A., et col.(2006). Characterization of *Bacillus cereus* Isolates Associated with Fatal Pneumonias: Strains Are Closely Related to *Bacillus anthracis* and Harbor *B. anthracis* Virulence, *Journal of Clinical Microbiology*, 44(9), 3352-3360. doi:10.1128/JCM.00561-06.
- [25] Choi Y.M and al(2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT*, 39, 756-761.
- [26] Choi Y.M., Noh D.O., Cho S.Y., Suh H.J., Kim K.M., and Kim J.M. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT-Food Science and technology*. 39:756-761. doi:10.1016/j.lwt.2005.05.015.
- [27] Sanchez-Moreno C.(2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems, *Int. J. of Foods Sci. Tech*, 8, 121-137. doi:10.1106/108201302026770.
- [28] Brand-Williams W., Cuvelier M.E., and Berset C.(1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm.Wiss. Technol*, 28, 25-30. doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5.

CHAPITRE III :
RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Chapitre III : Résultats et discussions

III.1. Synthèse des composés

Dans le but d'étudier la réaction d'iodation et de radiomarquage des composés **4**, **5** et **6** nous avons repris leur synthèse et nous avons effectué pour ces composés des analyses de caractérisations dont voici les résultats résumés ci-dessous :

7-hydroxy-4-méthyl-2H-chromèn-2-one (4)

Cristaux blancs, $P_f = 185-189$ °C, rendement 90.01%; $^1\text{H NMR}$ (300.13MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm): δ 2.52 (s, 3H, CH₃), 6.13 (s, 1H, H-3), 6.72 (d, $J_{6,8} = 2.4$.1H, H -8), 6.81 (dd, $J_{6,8} = 2.4$, $J_{5,6} = 8.4$.1H, H-6), 7.59 (d, $J_{5,6} = 8.4$.1H, H-5), 10.53 (s, 1H, OH). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6 , δ , ppm): 161.17 (lactone carbonyl), 160.31; 154.85; 153.52; 126.59; 112.87; 112.03; 110.27; 102.19 (-aromatics and alkenes); 18.12 (-CH₃). $[\text{M}+\text{H}]^+$ avec $m/z = 177.23$ (*pic de base*) et $[\text{M}+\text{Na}]$ avec $m/z = 199.17$; Analyse élémentaire : Calculée pour C₁₀H₈O₃C : 68.18; H 4.58; trouvée: C 67.92; H 4.62.

3-(2-hydroxybenzoyl)-2H-chromen-2-one (5)

Aiguilles jaunes, rendement 76 % ; $P_f = 175-177$ °C; I.R ν (cm⁻¹) 3403 (OH), 1716 (O=C-O); RMN- ^1H (DMSO- d_6): δ 6.90 (s,1H, H-4), 6.92 (t,1H, H-18), 7.32 (t,1H, H-17), 7.42 (t,1H, H-9), 7.50 (d,1H, H-10), 7.68 (d,1H, H-7), 7.69 (t,1H, H-8), 7.86 (d,1H, H-16), 8.34 (d,1H, H-19), 10.69 (s,1H, OH); RMN- ^{13}C (DMSO- d_6) : δ 116.1 (C-7), 116.9 (C-5), 118.3 (C-14), 119.2 (C-16), 123.4 (C-12), 124.8 (C-9), 128.1 (C-17), 128.8 (C-10), 129.7 (C-3), 130.8 (C-8), 133.2 (C-15), 135.2 (C-4), 142.7 (C-6), 153.7 (C-2), 158.5 (C-13), 191.8 (C-11); ms(EI): m/z (% intensité relative) 266 (M⁺,59), 265(100), 221(6), 173(23), 145(4), 121(72), 120(73), 101(19), 93(13). Analyse élémentaire : Calculée pour C₁₆H₁₀O₄: C 72.18; H 3.79; trouvée: C 72.02; H 3.60.

3-(2-hydroxybenzoyl)-2H-benzo[f]chromen-2-one (6)

Poudre jaune, rendement 48.66%; $P_f = 264-265$ °C; I.R ν (cm⁻¹) 3486(OH), 1571(C=C-aromatic); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 9.13$ (s,1H,H-4), 6.93 (d,2H, H-10,H-13), 7.49 (t,2H,H-11,H-12), 7.72 (t,2H,H-21,H-22), 7.65 (d,1H,H-8), 8.10 (d,1H,H-7), 8.30 (d,1H,H-23), 8.63 (d,1H,H-20), 10.78 (s,1H,OH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6): $\delta = 112.3$ (C-7), 116.2 (C-5), 116.9 (C-14), 119.0 (C-16), 122.1 (C-18), 123.3 (C-12), 126.0 (C-20), 127.1 (C-17), 128.4 (C-19),

128.6 (C-21), 128.9 (C-9), 129.7 (C-3), 131.1 (C-8), 134.4 (C-10), 135.3 (C-15), 138.7 (C-4), 153.9 (C-6), 157.6 (C-2), 159.0 (C-13), 192.8 (C-ms(EI): m/z(% intensité relative) : 316(M⁺,100),299(73),272(10),196(63),121(64),93(19). Analyse élémentaire : Calculée pour:C₂₀H₁₂O₄:C, 75.94;H, 3.82.Trouvée:C,75.80; H,3.75

III.2. Approches théoriques de la réactivité chimique

Dans notre travail, nous avons utilisé la méthode B3LYP qui est une variante des méthodes DFT (*Density Functional Theory*). L'avantage de cette méthode par rapport aux méthodes HF (Hartree-Fock) réside dans le fait qu'elle tient compte de la corrélation électronique. D'autre part, cette méthode est moins couteuse en temps de calcul en comparaison avec les autres méthodes qui tiennent compte de la corrélation électronique comme CI (*Configuration Interaction*) ou MP2 (Moller-Plesset d'ordre 2)...

Les indices de réactivité (indices de Fukui, nucléophilies locales) ont été calculés en utilisant les populations électroniques calculées avec les analyses de population de Mulliken (MPA), l'analyse de population naturelle (NPA) et l'analyse de population qui utilise des charges dérivant du potentiel électrostatique (MK, Chelp et ChelpG).

L'investigation théorique présentée dans ce travail est basée sur le calcul de paramètres de nucléophilie globaux et locaux afin de faciliter la compréhension du mécanisme de la réaction d'iodation.

III.2.1. Méthodologie des calculs

Les géométries des molécules neutres ont été optimisées au niveau du calcul B3LYP/6-311G(d,p) implémentée dans le programme Gaussian 09W[1]. Les géométries des molécules neutres sont maintenues constantes pour les systèmes cationiques et anioniques utilisés pour le calcul des indices locaux. Les populations électroniques ont été calculées en utilisant l'analyse de population de Mulliken (MPA), les charges dérivées du potentiel électrostatique calculé selon l'algorithme de Merz-Kollman (option MK) [2], et également par l'analyse de population naturelle (NPA) [3].

III.3. Calculs des indices de réactivité globaux

Les valeurs des indices de réactivité globaux μ, η, ω, S et N ont été calculées à l'aide des équations 1, 2, 3, 4 et 8 respectivement (Tableau III.1). En analysant les valeurs de nucléophilie N pour ces composés, on peut noter que :

- Le pouvoir de nucléophilie augmente du composé **1** à **4** indiquant que la coumarine **4** de cette série est la molécule la plus nucléophile avec $N = 2,97$ eV. Les mêmes tendances sont obtenues pour les coumarines **5** et **6** : le composé **6** est plus nucléophile $N = 2,98$ eV que le composé **5** $N = 2,86$ eV.

- Le caractère nucléophile de ces composés **1** à **6** est en accord avec le potentiel électronique calculé μ (Tableau III.1) montrant que **4** $\mu = -4,26$ eV est caractérisé par le potentiel chimique le plus élevé suivi de **3** $\mu = -4,36$ eV et de **2** $\mu = -2,48$ eV respectivement.

- D'autre part, on peut noter que la substitution du composé hétéroatomique par un groupe électro-donneur (c'est-à-dire Me, OH...) entraîne une augmentation de la nucléophilie de la même manière que dans les composés **1-4**.

Par conséquent, la première série **1-4** devrait être réactive dans les réactions de substitution électrophile aromatique (EAS).

Il est à noter que le composé **6** avec un squelette de coumarine benzo condensé (nuage d'électrons étendu) devrait être plus nucléophile ($\mu = -4,6953$ eV) que **5** ($\mu = -4,6230$ eV)

Tableau III.1: Energies HOMO et LUMO, et indices de réactivité globaux μ , η , ω , S et N des composés **1-6** calculés avec la méthode B3LYP/6-311G(d,p)

Composés	HOMO (eV)	LUMO (eV)	μ (eV)	η (eV)	ω (eV)	S (eV)	N ^a (eV)
1	-6.8895	-2.3073	-4.5984	4.5822	2.3073	0.1091	2.5984
2	-6.7902	-2.1658	-4.4780	4.6244	2.1681	0.1081	2.6978
3	-6.5654	-2.1448	-4.3551	4.4206	2.1453	0.1131	2.9226
4	-6.5137	-2.0167	-4.2652	4.4971	2.0227	0.1111	2.9743
5	-6.6253	-2.6208	-4.6230	4.0045	2.6686	0.1249	2.8627
6	-6.5031	-2.8875	-4.6953	3.6157	3.0486	0.1383	2.9849

^a l'énergie HOMO -9.4880 eV du système de référence (TCE) a été calculée avec la même méthode

Il est clair que les valeurs des paramètres de réactivité globaux dépendent du niveau de la théorie utilisé.

III.4. Calculs des fonctions de Fukui et de la nucléophilie locale N_k

Des valeurs locales telles que Fukui f_k (Eq: 6-7) définissent la réactivité et la sélectivité d'un site spécifique dans une molécule. La nucléophilie locale N_k (Eq: 9) est utilisée pour prédire le site préféré en attaque électrophile.

L'analyse de la nucléophilie locale N_k de la première série **1** à **4** (Tableau III.2) montre que le site N7 et N9 seraient des sièges où une attaque électrophile est plus probable qu'une attaque nucléophile.

En effet, ce paramètre calculé en utilisant MK et NPA pour les composés **1-4** a les valeurs les plus grandes (en gras dans le tableau III.2). Dans cette même série, nous avons indiqué que le composé **4** devrait être plus nucléophile $N = 2,97$ eV. Ce résultat est tout à fait conforme à l'expérience puisque ses dérivés mono, di et tri-iodés ont été synthétisés [4].

Tableau III.2 : Les fonctions de Fukui nucléophiliques f_k^- et les valeurs des nucléophilies locales N_k des positions des composés **1-4** calculées en utilisant des analyses de populations différentes.

Composés	<u>Population de Mulliken (MPA)</u>		<u>Population Electrostatique (MK)</u>		<u>Population Naturelle (NPA)</u>		
	f_k^-	N_k	f_k^-	N_k	f_k^-	N_k	
1	C3	0.017	0.044	0.028	0.073	0.008	0.021
	C5	0.070	0.182	-0.037	-0.096	-0.018	-0.047
	C6	0.040	0.104	0.005	0.013	0.001	0.003
	C7	0.068	0.177	0.187	0.486	0.149	0.387
	C8	0.059	0.153	0.034	0.088	0.077	0.200
	C9	0.094	0.244	0.130	0.338	0.120	0.312
2	C3	0.001	0.003	0.026	0.070	0.006	0.016
	C5	0.093	0.251	-0.036	-0.097	-0.015	-0.040
	C7	0.084	0.227	0.188	0.507	0.137	0.369
	C8	0.071	0.192	0.00	0.024	0.080	0.216
	C9	0.099	0.267	0.174	0.469	0.130	0.353
3	C3	0.047	0.137	0.004	0.012	0.019	0.055
	C5	0.022	0.064	-0.079	-0.231	-0.006	-0.017
	C6	0.023	0.067	0.004	0.012	-0.009	-0.026
	C7	0.076	0.222	0.150	0.438	0.109	0.319
	C9	0.120	0.351	0.194	0.567	0.165	0.482
4	C3	0.018	0.054	0.044	0.131	0.019	0.057
	C5	0.012	0.036	-0.021	-0.062	0.004	0.012
	C7	0.087	0.259	0.147	0.437	0.103	0.306
	C9	0.081	0.241	0.229	0.681	0.168	0.500

Pour les deux composés hybrides **5** et **6**, par souci de clarté, nous comparons les sites des groupes de fonctions de chacune des deux molécules. Ainsi, pour la fonction 2-hydroxybenzoyle, les valeurs de N_k (calculées par NPA) sont réparties comme suit (en gras dans le tableau III.3):

Tableau III.3: Indices de Fukui Nucléophiliques, f_k^- , et les nucléophilies locales, N_k , des différents sites des deux composés **5** et **6** calculés en utilisant différentes populations. La valeur de la nucléophilie locale du groupe benzoyl est en gras

Composés	Population de Mulliken (MPA)		Population Electrostatic (MK)		Population Naturelle (NPA)		
	f_k^-	N_k	f_k^-	N_k	f_k^-	N_k	
5	C3	0.018	0.052	-0.009	-0.026	0.003	0.009
	C4	0.047	0.135	0.097	0.278	0.030	0.086
	C5	0.031	0.089	-0.005	0.014	0.013	0.037
	C6	0.033	0.094	0.041	0.117	0.276	0.790
	C11	0.048	0.137	0.078	0.223	0.026	0.079
	C12	0.036	0.103	0.054	0.155	0.047	0.135
	C13	0.027	0.077	0.010	0.046	-0.064	-0.183
	C15	0.068	0.195	0.162	0.464	0.173	0.495
	C16	0.020	0.057	-0.051	-0.146	0.046	0.132
6	C4	0.014	0.042	-0.009	-0.027	0.155	0.463
	C7	0.036	0.107	0.054	0.161	0.063	0.188
	C8	0.013	0.039	0.061	0.182	0.047	0.140
	C9	0.004	0.012	0.025	0.075	0.020	0.060
	C13	0.04	0.120	0.088	0.263	0.061	0.182
	C14	0.055	0.164	0.087	0.260	0.058	0.173
	C15	0.01	0.042	0.035	0.104	0.024	0.071
	C16	0.028	0.084	0.030	0.089	0.045	0.134
	C17	-0.004	-0.012	-0.043	-0.128	-0.002	-0.006
	C19	0.069	0.206	0.128	0.382	0.092	0.275
	C20	0.005	0.015	-0.007	-0.021	0.010	0.030

L'analyse des indices de nucléophilie donnée par N_k dans le tableau III.3 ci-dessus montre que $N8(6) < N19(6)$ en position ortho et para / OH, aux mêmes positions $N4(5) < N15(5)$. Il est intéressant de noter que dans la fonction 2-hydroxybenzoyle, l'OH (électro-donneur) active fortement, mais le groupe carbonyle (électro-attracteur) désactive moyennement. Par contre, on sait, que quand il existe plusieurs substituants sur un cycle: le plus fort activant est celui qui dirige la position de l'électrophile sur le cycle.

Les groupes fortement activants exercent une influence plus forte que les groupes désactivant ou faiblement activants. Par conséquent, les valeurs $N8$, $N19$ sur **6** et $N4$, $N15$ sur **5** obtenues sont les plus élevées du tableau III.3 et devraient être réactives dans les EAS.

Pour les deux fonctions, la coumarine sur **5** et la benzocoumarine sur **6**, les valeurs de N_k calculées par (NPA) sont répertoriées dans le tableau III.3. L'analyse de ces valeurs montre

que: Les valeurs N_6 (**5**) et N_4 (**6**), avec la valeur la plus élevée de l'indice de nucléophilie local, seraient les positions où une attaque électrophile est plus probable. Le nuage électronique étendu en **6** donne le résultat attendu N_{13} (**6**) > N_{12} (**5**). En revanche, le tableau III. 3 montre que N_{15} (**6**) et N_9 (**6**) ont la plus faible valeur de la nucléophilie et qu'il en est de même pour N_3 (**5**) et N_5 (**5**).

Les réactivités relatives des composés **1-6** dans les réactions EAS ont été étudiées à l'aide de l'indice de nucléophilie global.

Conclusion : Il ressort de la présente étude que les composés **4**, **5** et **6** sont de bons candidats pour la substitution électrophile par l'ion iodonium. Par conséquent, afin d'optimiser la réaction de radio-iodation et d'invalider ou de confirmer les résultats de la théorie, nous avons effectué la réaction d'iodation des composés **4**, **5** et **6** dans les conditions impliquant "l'ion d'iodonium froid".

III.5. Iodation des composés **4**, **5** et **6**

III.5.1. Iodations du composé **4**

La structure du produit obtenu après iodation est présentée dans la figure III.1.

Les résultats de caractérisation du produit sont résumés comme suit :

Poudre orange, $P_f=268^\circ\text{C}$, rendement=25%, $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ 2.38 (s, 3H, CH_3), 6.18 (s, 1H, H-3), 6.93 (d, $J_{5,6} = 8.6.1\text{H}$, H-6), 7.72 (d, $J_{6,5} = 8.6.1\text{H}$, H-5), 11.37 (s, 1H, OH).

Le spectre de RMN ^1H du composé iodé **4** confirme la mono-iodation en position 3, le pic à 6,72 ppm observé dans le spectre du composé **4** est absent dans ce spectre.

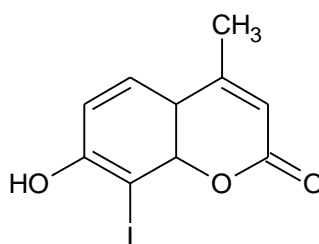


Figure III.1: Structure du composé **4** iodé (7-hydroxy-8-iodo-4-méthyl-4a,8a-dihydro-2H-chromèn-2-one)

III.5.1.1. Analyse CLHP du composé **4** et du composé **4** iodé

Les chromatogrammes du composé **4** et du composé iodé **4** sont présentés dans les figures III.2 et III.3.

La figure III.2 montre la présence d'un seul pic correspondant au composé **4** avec une surface de 97,99% et un temps de rétention R_t de 3,71 min. Le pic correspondant au composé iodé **4** (Figure III.3) est élué après 5,15 min; la superficie du pic est estimée à 94,44%.

Une augmentation du temps de rétention est donc observée pour le composé **4** mono-iodé. Le pic correspondant au composé **4** n'ayant pas réagi est présent en faible concentration sur le chromatogramme (5,56%). L'analyse HPLC a permis de mettre en évidence le caractère lipophile du composé mono-iodé **4**: en effet, le temps de rétention d'un composé iodé se voit augmenté.

Aucun second pic n'a été observé sur le chromatogramme du composé iodé **4** pouvant correspondre au composé di-iodé **4**; cette analyse confirme donc la production du composé mono-iodé **4** en tant que produit majoritaire selon le protocole adopté.

L'analyse du composé **4** par HPLC a été effectuée par injection de 10 μ L de solution purifiée dans la colonne (RP-18.150x4.6mm) et le détecteur spectrophotomètre UV. La colonne a été éluée avec un mélange acétonitrile: eau (70% acétonitrile, 30% eau) en phase mobile, et le débit a été ajusté à 1,0 ml / min.

Le protocole adopté a permis d'obtenir le composé **4** mono-iodé comme produit majoritaire.

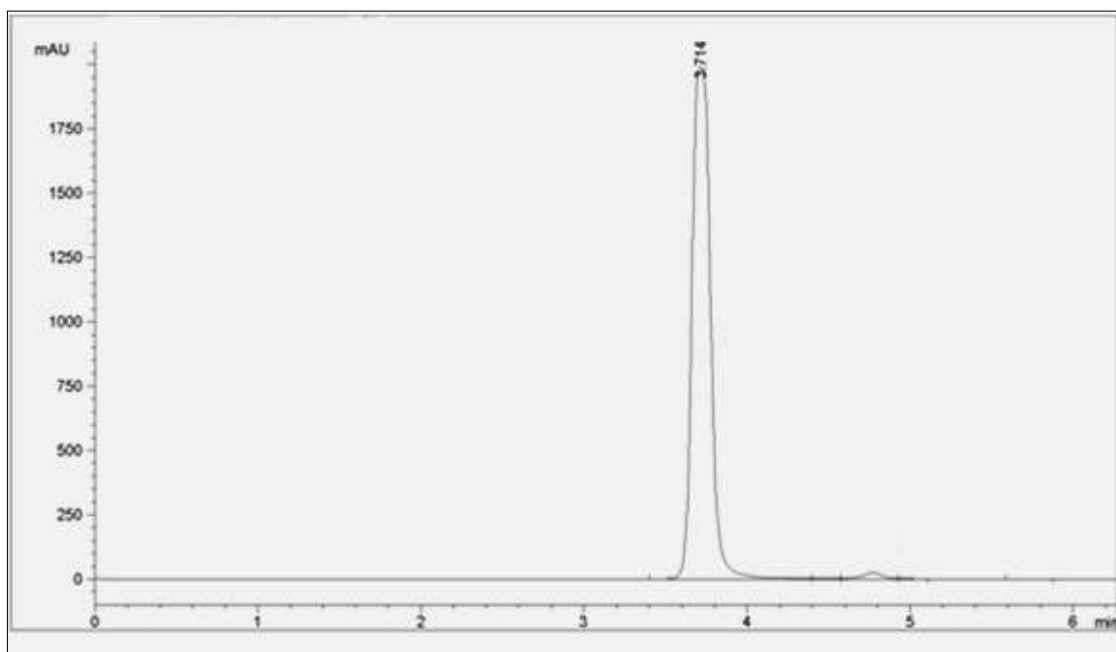


Figure III.2: chromatogramme du composé 4

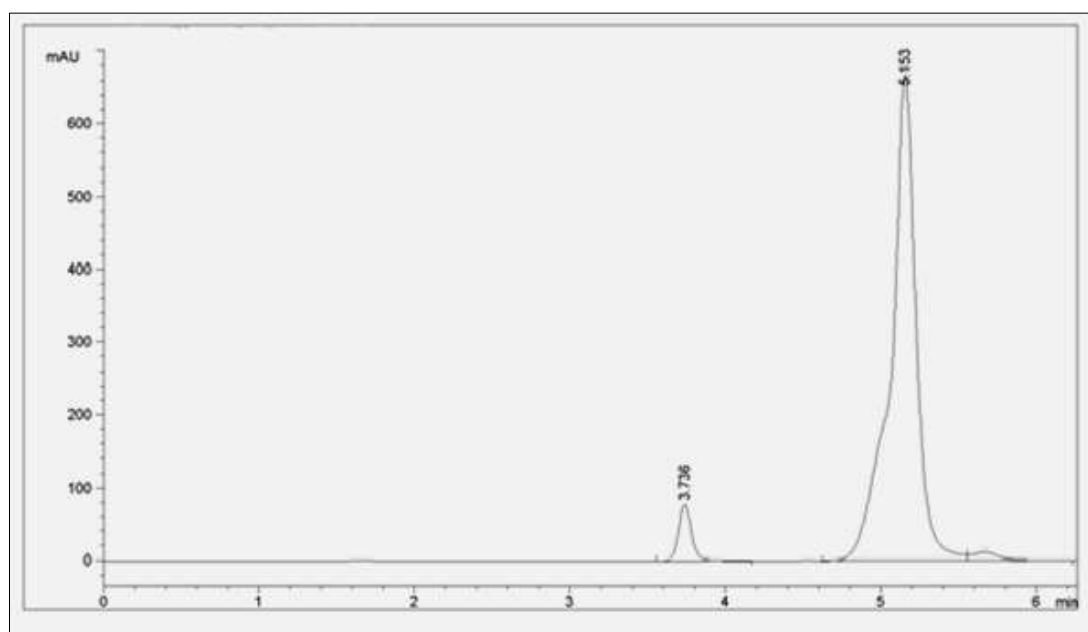


Figure III.3: Chromatogramme du composé 4 iodé

III.5.2. Iodation des composés 5 et 6

Nous avons démontré selon les résultats de l'étude théorique que les composés **5** et **6** sont, comme le composé **4**, prédits pour être réactifs dans la réaction de substitution électrophile.

Nous avons ensuite essayé, dans un premier temps, la réaction d'iodation de l'iode "froid" selon le même protocole que celui décrit pour le composé **4**. Le résultat de la réaction devrait donc être un produit iodé.

La structure du composé **7** obtenu a été confirmée par spectres de masse et par données RMN ¹H et ¹³C. A notre grande surprise, le composé **7** obtenu n'est pas iodé. La spectrométrie de masse confirme que le composé **7** est obtenu à partir du composé **5** par la perte d'une molécule de dihydrogène. En effet, la présence des pics à m/z 265 (65%), 287 (100%) et 551 (26%) correspond à des ions (M + H)⁺, (M + Na)⁺ et (2M + Na)⁺.

Le nouveau produit **7** (C₁₆H₈O₄, M = 264) est obtenu avec un rendement de 65%.

La réaction d'iodation n'a pas eu lieu et la perte d'une molécule de dihydrogène suggère la cyclisation de **5** (Schéma III.1) pour donner un nouveau produit **6H, 7H-chroméno [4,3-b] chromène-6,7-dione** (Figure III.4).

Le spectre de RMN ¹H de ce composé indique que la résonance du groupe -OH et de H-4 n'a pas été observée et confirme la disparition du signal du proton.

Les résultats de la caractérisation du composé **7** sont résumés comme suit :

6H,7H-chroméno[4,3-b]chromène-6,7-dione (7)

Poudre blanche-grisée, Rdt 65%; Pf=216°C; I.R v (cm⁻¹) 1696 (O=C-O), 1500-1600 (C=C aromatic), UV/vis: λ_{abs1}= 292, λ_{abs2} = 318 nm; RMN-¹H (DMSO-d₆): δ 7.10 (d, 1H, J=8.31Hz, H-12), 7.40 (m, 3H, H-6, H-8, H-15), 7.81 (m, 2H, H-14, H-7), 8.13 (d, 1H, J=8.76Hz, H-5), 8.32 (d, 1H, J=9.33, H-16) ; RMN-¹³C (DMSO-d₆): δ 104.71 (C-3), 117.38 (C-10), 117.61 (C-13), 122.74 (C-8), 123.72 (C-5), 124.38 (C-15), 125.48 (C-12), 126.47 (C-6), 127.12 (C-16), 135.63(C-7), 138.31 (C-14), 153.99 (C-9), 153.60 (C-2), 155.50(C-11), 164.76 (C-4), 172.46 (C-1), MS (ESI⁺) m/z (%): 265 (65) [M+H]⁺, 287 (100) [M+Na]⁺, 551(26) [2M+Na]⁺; Analyse élémentaire : Calculée pour C₁₆H₈O₄: C 72.73, H 3.05; trouvée: C 72.77, H 3.02.

Le même phénomène a été observé avec le composé **6**, la structure du composé **8** obtenu a été confirmée par spectres de masse, et RMN ^1H et ^{13}C .

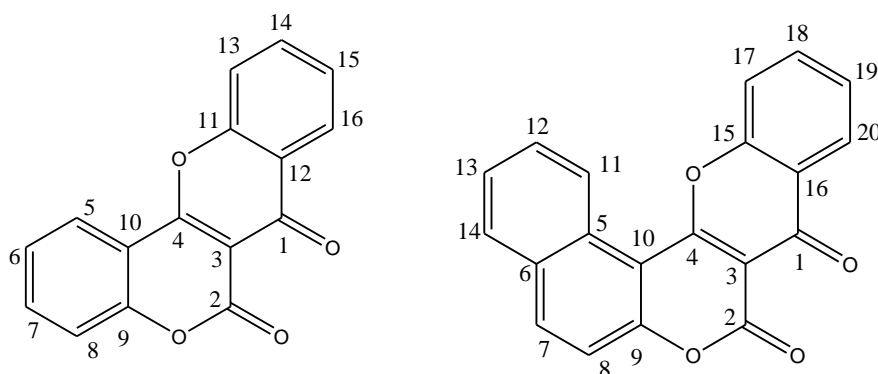
Le composé **8** obtenu n'est pas iodé et sa masse montre une perte d'une molécule de dihydrogène par rapport à la masse du produit **6**.

Le nouveau produit ($\text{C}_{20}\text{H}_{10}\text{O}_4$, $M = 314$) a été obtenu avec un bon rendement de 75%, il n'est pas iodé et suggère la cyclisation de **6** (Schéma III.1) qui a donné le composé **8** : 8*H*, 9*H*-benzo [f] chromeno [3,2-*c*] chromène-8,9-dione (Figure III.4).

8*H*,9*H*-benzo[f]chroméno[3,2-*c*]chromène-8,9-dione (**8**)

Poudre marron clair, Rdt 75%; Pf =287°C; I.R ν (cm^{-1}) 1737(O=C-O), 1500-1600 (C=C-aromatic); UV/vis: $\lambda_{\text{abs}1} = 363$, $\lambda_{\text{abs}2} = 374$ nm ; ; RMN- ^1H (DMSO- d_6): δ 7.58 (d, 1H, $J=8.88\text{Hz}$, H-8), 7.62 (d, 1H, $J=7.65\text{Hz}$, H-7), 7.65 (t, 1H, H-18), 7.86 (t, 1H, H-12), 7.93 (t, 1H, H-13), 8.11 (m, 3H, H-16, H-17, H-19), 8.38 (d, 1H, $J=9.00\text{Hz}$, H-14), 9.34 (d,1H, $J=8.76\text{Hz}$, H-11); ; RMN- ^{13}C (DMSO- d_6): δ 104.29 (C-3), 106.29 (C-8), 116.94 (C-18), 116.57 (C-11), 118.57 (C-20), 123.60 (C-13), 125.28 (C-17), 125.59 (C-10), 126.59 (C-21), 126.66 (C-12), 127.98 (C-14),129.72 (C-6), 130.03 (C-7), 134.99 (C-5), 137.80 (C-19), 153.86 (C-9), 155.24(C-2), 155.78 (C-15), 167.59 (C-4), 172.53 (C-1); MS (ESI $^+$) m/z (%): 315 (95) [M+H] $^+$, 337 (100) [M+Na] $^+$, 651 (63) [M+Na] $^+$, Analyse élémentaire : Calculée pour : $\text{C}_{20}\text{H}_{10}\text{O}_4$: C 72.26, H 8.49; trouvée: C 72.32, H 8.45.

Les analyses effectuées sur les composés obtenus après iodation nous ont permis de déduire leur structure (Figure III.4)



6*H*,7*H*-chromeno[4,3-*b*]chromene-6,7-dione (**7**) 8*H*,9*H*-benzo[f]chromeno[3,2-*c*]chromene-8,9-dione (**8**)

Figure III.4: Structure chimique des composés **7** et **8** obtenus après iodation

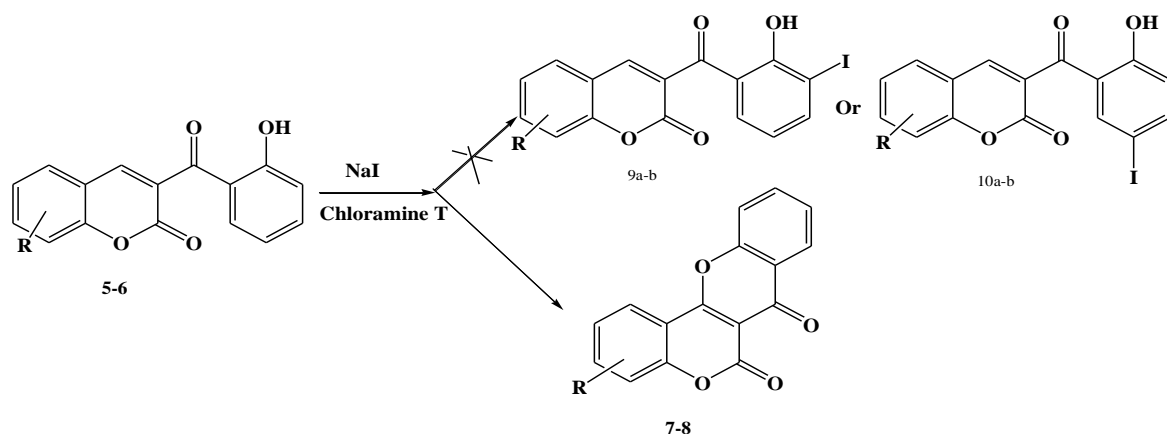


Schéma III.1 : Synthèse des composés **7** et **8** catalysée par NaI et en présence de chloramine T

Nous pouvons conclure donc que l'iode s'est comporté comme un « catalyseur » de cyclisation des composés **5** et **6** et ne s'est pas fixé comme attendu et ce, en dépit du fait que les composés en question furent désignés comme étant aptes à être iodés après étude de leur nucléophilie.

III.5.3. Mécanisme de la réaction de cyclisation

Le mécanisme de la réaction peut s'expliquer par l'approche des ions I^+ formés par oxydation des ions anions I^- par la chloramine T sur le pôle attracteur de carbonyle de la coumarine, suivie d'une cyclisation intramoléculaire pour former les composés **7** et **8** (Schéma III.2).

Afin de confirmer ce mécanisme, la réaction a été répétée avec le composé **5** en présence de I_2 et de H_2SO_4 concentré dans du DMSO avec chauffage au reflux. En effet, l'iode en présence du DMSO s'oxyde en I^+ et le produit isolé de cette réaction est identique au composé **7**.

Les calculs théoriques [5] ont montré que la structure optimisée de **5** révèle que le cycle de la coumarine et le groupe benzoyle ne sont pas dans le même plan : en effet, l'angle dièdre $C_8C_7C_9C_{10}$ est de $51,88^\circ$.

La cyclisation impose un réarrangement moléculaire qui implique une rotation autour de la liaison C7-C9 pour donner un rotamère 5a (Schéma III.2). Ce dernier ne serait pas obtenu par la voie b qui implique la formation de la double liaison C7 = C9.

La voie « b » ne permet pas ce réarrangement, d'autant plus que la forte densité électronique est concentrée entre les deux atomes d'oxygène du cycle de la coumarine. Les calculs de la nucléophilie locale pour **5** ont donné $N_6(5) = 0,790$ et pour $6 N_4(6) = 0,463$, ces sites devraient donc être favorables à une attaque électrophile, mais l'expérience montre que c'est la cyclisation qui a eu lieu et non pas la réaction d'iodation.

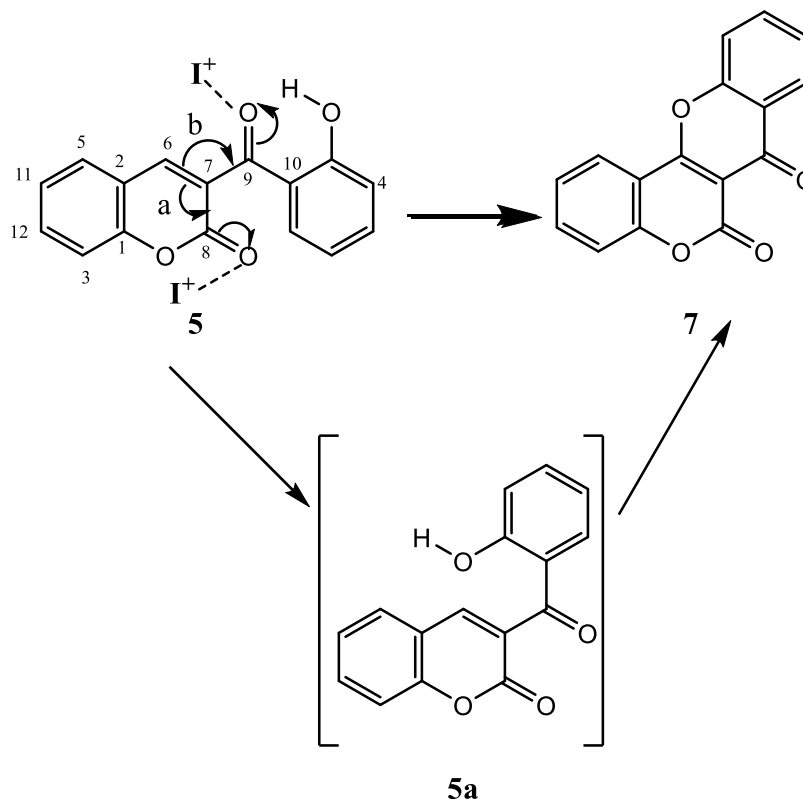


Schéma III.2. Mécanisme proposé pour la formation de 6H,7H-chroméno[4,3-b]chromène-6,7-dione **7**

III.5.4. Principales corrélations HMBC et NOESY de la 8H, 9H-benzo [f] chroméno

[3,2-c] chromène-8,9-dione (**8**)

Les structures et les puretés des produits obtenus ont été déduites de leurs spectres RMN (analyses RMN 2D étendues: HSQC, HMBC et NOESY) et des données de spectrométrie de masse.

A titre d'exemple représentatif, le spectre RMN ^1H de **8** a montré l'absence de singulet à 8-9 ppm et d'un pic large à 11-12 ppm correspondant à H-4 de la coumarine et de l'OH phénolique, respectivement.

Les protons aromatiques et benzopyran-2-one sont conservés et apparaissent avec un léger décalage vers les champs faibles à 7,58-9,34 ppm.

Le spectre NOESY de **8** ne nous a pas permis de conclure que le composé obtenu avait subi une cyclisation intramoléculaire, des effets de NOE ayant été observés entre (H-17, H-11) et (H-18, H-11) (Figure III.5).

Les connectivités HMBC de **8** étaient la clé pour prouver la structure du composé obtenu; à savoir celui entre le carbone H-8 et le carbone C-4, qui est également corrélé avec H-11 (Figure III.5). Ces corrélations sont compatibles avec la structure **8**.

Les connectivités HMBC de **8** ont attribué sans équivoque toutes leurs résonances carbonées (Figure III.5). Toutes les données décrites pour le composé **8** sont similaires à celles du composé **7**, ce qui nous a permis de conclure que nous n'avions obtenu que les composés cyclisés et non les composés iodés. Toutes ces données confirment la structure de 8H, 9H-benzo [f] chroméno [3,2-c] chromène-8,9-dione (**8**).

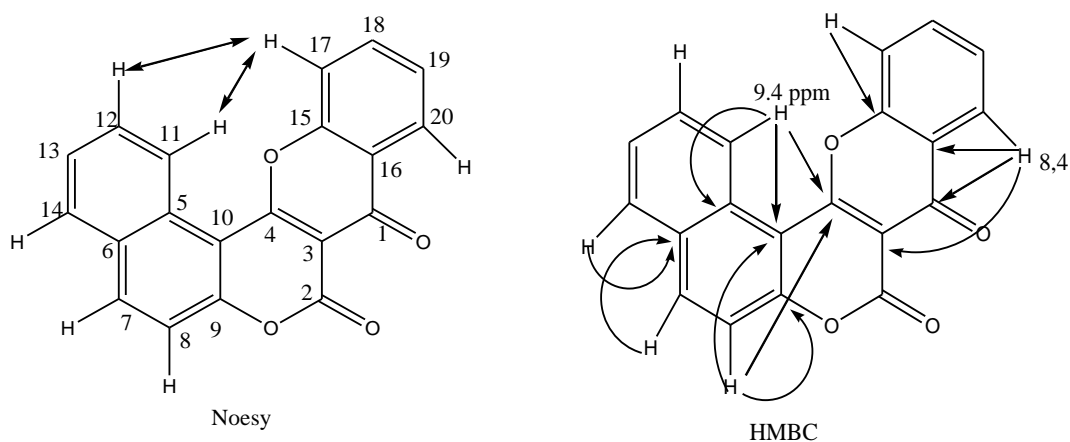


Figure III.5 : Les principales corrélations NOESY et HMBC du composé **8**

III.6. Marquage du composé **4** à l'iode 125

III.6.1. Pureté radiochimique (PRC)

La figure III.6 montre que le pourcentage de pureté radiochimique du composé **4**-¹²⁵I était de 99,98%.

Pour la chromatographie sur papier, l'iode radioactif libre est resté proche de l'origine, tandis que le composé **4**-¹²⁵I s'est déplacé avec le front de solvant.

La chromatographie sur papier a été utilisée pour déterminer la pureté radiochimique.

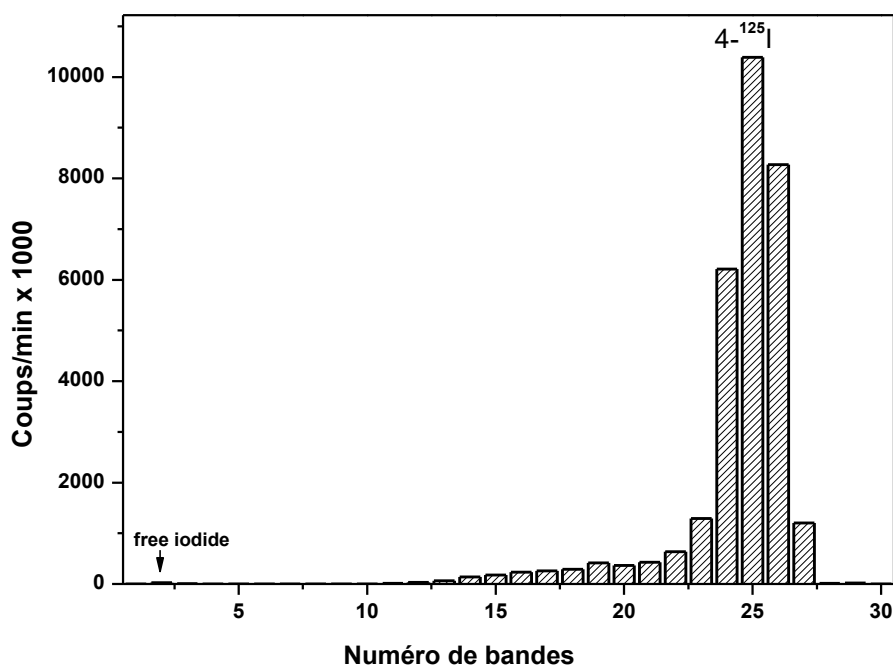


Figure III.6 : Pureté radiochimique du composé 4 -[¹²⁵I]

III.6.2. Pourcentage radiochimique du composé 4-[¹²⁵I]

Le pourcentage radiochimique de marquage du composé 4-[¹²⁵I] a été calculé à partir des comptes des fractions de surnageant et des fractions de sédiment, un pourcentage de 64,5% est obtenu (Tableau III.4)

Tableau III.4 : Calcul du pourcentage radiochimique du composé 4-[¹²⁵I]

Activité totale (μCi)	Comptage fraction du surnageant (μCi)	Comptage fraction du culot (μCi)	Pourcentage radiochimique%
517.8	133.47	333.88	64.5

L'iodation et le radiomarquage du composé 4 ont été effectuées sans grande difficulté et des résultats attendus ont été obtenus.

III.7. Calcul du rendement quantique et des moments dipolaires

Dans ce travail, nous avons étudié l'effet de la polarité du solvant et la position du substituant sur le rendement quantique de la fluorescence. Nous nous sommes aussi intéressés à calculer les moments dipolaires à l'état excité et à l'état fondamental des composés coumariniques **5**, **6** ainsi que les composés issus de l'iodation **7** et **8** par la méthode des déplacements solvatochromiques et la méthode théorique pour cela, une étude des paramètres spectroscopiques de nos composés doit être faite au préalable.

III.7.1. Détermination des spectres électroniques d'absorption et d'émission de fluorescence

III.7.1.1. Spectres d'absorption UV/Visible

Les spectres d'absorption UV-vis des composés **5**, **6**, **7** et **8** (concentration 5×10^{-5} M) ont été enregistrés immédiatement après la dissolution des produits et la filtration sur papier. Les amplitudes de décalage de Stokes varient entre 3339 et 3776 cm^{-1} pour les composés **5** et **6** et entre 2530 et 4548 cm^{-1} pour les composés cyclisés **7** et **8**. Les valeurs du décalage de Stokes indiquent également la transition de transfert de charge (Tableau III.5).

Le spectre d'absorption des composés **5** et **6** présente une large bande dans tous les solvants, attribuée à la transition $\pi-\pi^*$ en relation avec le groupe carbonyle [Figure III.7 a) et b)]. Ces bandes peuvent être attribuées au transfert de charge entre le cycle benzénique de la coumarine et le pôle électro-attracteur, constitué par le groupe carbonyle qui amplifie la force d'attraction des électrons sur ce côté des molécules. De plus, la longueur d'onde et l'intensité des spectres d'absorption ont été affectés lors du changement des substituants de la coumarine. Le composé **6** montre une intensité plus forte et une longueur d'onde plus élevée.

Concernant les spectres d'absorption des composés **7** et **8** [Figure III.7 (c) et (d)], ils montrent deux bandes bien distinctes sous forme d'épaulement situés autour de 288nm et 319nm de faible énergie pour le composé **7** et autour de 361 nm et 380nm pour le composé **8** d'énergie légèrement plus élevée que le composé **7**. Une bande correspond au chromène et l'autre au reste de la molécule. Le composé **8** montre une intensité plus forte et une longueur d'onde plus élevée.

Pour les quatre composés nous remarquons que la longueur d'onde d'absorption dans divers solvants n'est pas affectée par la polarité du solvant.

Tableau III.5 : Les caractéristiques spectroscopiques et photophysiques des composés **5**, **6**, **7** et **8** dans différents solvants

Composés	Solvants	λ_{abs} (nm)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	$\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f$ (cm^{-1})	$\bar{\nu}_a + \bar{\nu}_f$ (cm^{-1})	$\Phi_{\text{f}} \times 10^2$
5	DMSO	326	310	371	3721	57629	14.4
	DMF	325	305	370	3742	55707	14.6
	ACN	334	310	380	3624	56256	24.0
	CH ₂ Cl ₂	341	325	385	3351	55299	6.5
	Ethyl Acetate	336	320	380	3339	55299	15.6
	CHCl ₃	341	330	390	3344	54626	9.3
6	DMSO	364	345	422	3776	51169	22.2
	DMF	363	345	420	3739	51358	21.7
	ACN	365	345	423	3757	51038	15.6
	CH ₂ Cl ₂	373	350	430	3554	50065	10.1
	Ethyl Acetate	368	350	424	3589	50759	1.7
	CHCl ₃	376	345	434	3554	49637	8.8
7	DMSO	297 324	300	380	4548	57180	0.155
	DMF	295 323	300	378	4505	57415	0.098
	ACN	293 320	300	372	4368	58132	0.186
	CH ₂ Cl ₂	293 318	300	366	4124	58769	0.0116
	Ethyl Acetate	289 319	300	369	4247	58448	0.035
	CHCl ₃	292 318	300	367	4198	58694	0.253
8	DMSO	362 378	375	418	2530	50378	0.204
	DMF	361 378	375	418	2532	50378	0.058
	ACN	359 377	375	417	2544	50506	0.133
	CH ₂ Cl ₂	361 375	375	415	2570	50763	0.005
	Ethyl Acetate	358 376	375	416	2557	50634	0.073
	CHCl ₃	363 374	375	414	2583	50896	0.150

(λ_{ex} : longueurs d'onde d'excitation, λ_{em} : longueur d'onde d'émission, $\nu_a - \nu_f$: différence de Stokes, Φ_{f} : rendement quantique).

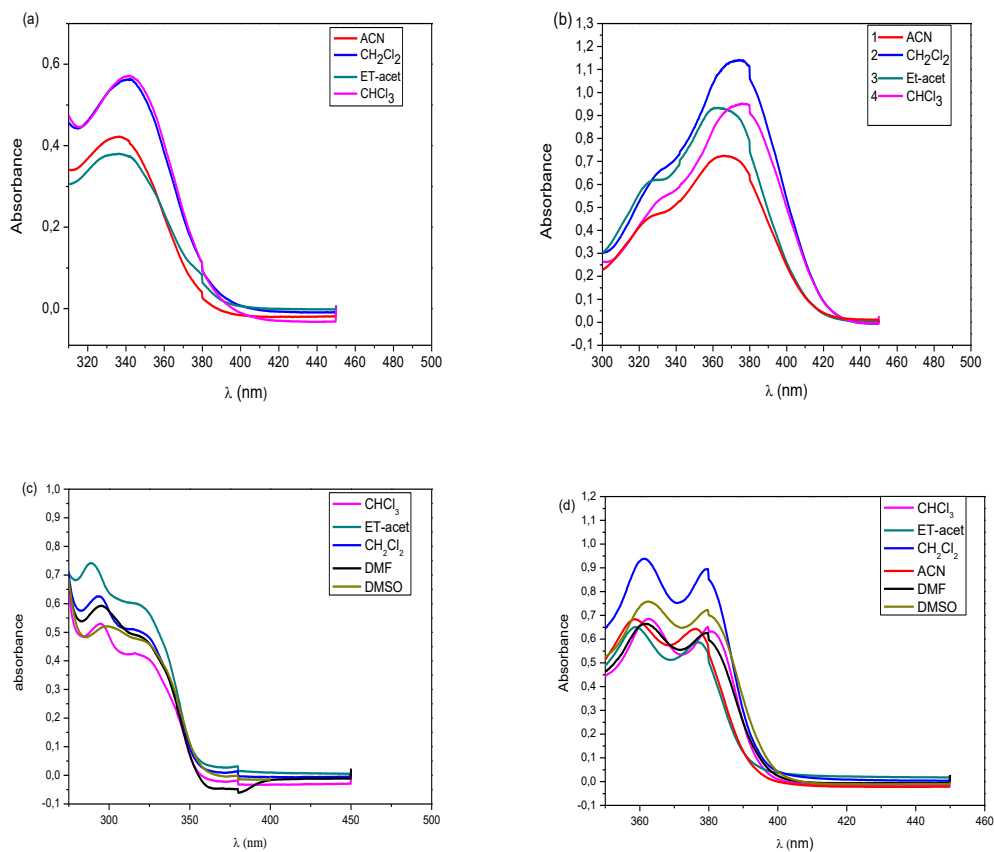


Figure III.7 (a-d) : Spectres UV/vis des composés (a) **5**, (b) **6**, (c) **7** et (d) **8** dans différents solvants .

III.7.1.2. Spectre électronique de fluorescence :

La fluorescence des quatre composés, **5**, **6**, **7** et **8** dans les différents solvants a été étudiée à température ambiante du laboratoire et à une concentration de $5.10^{-5}M$.

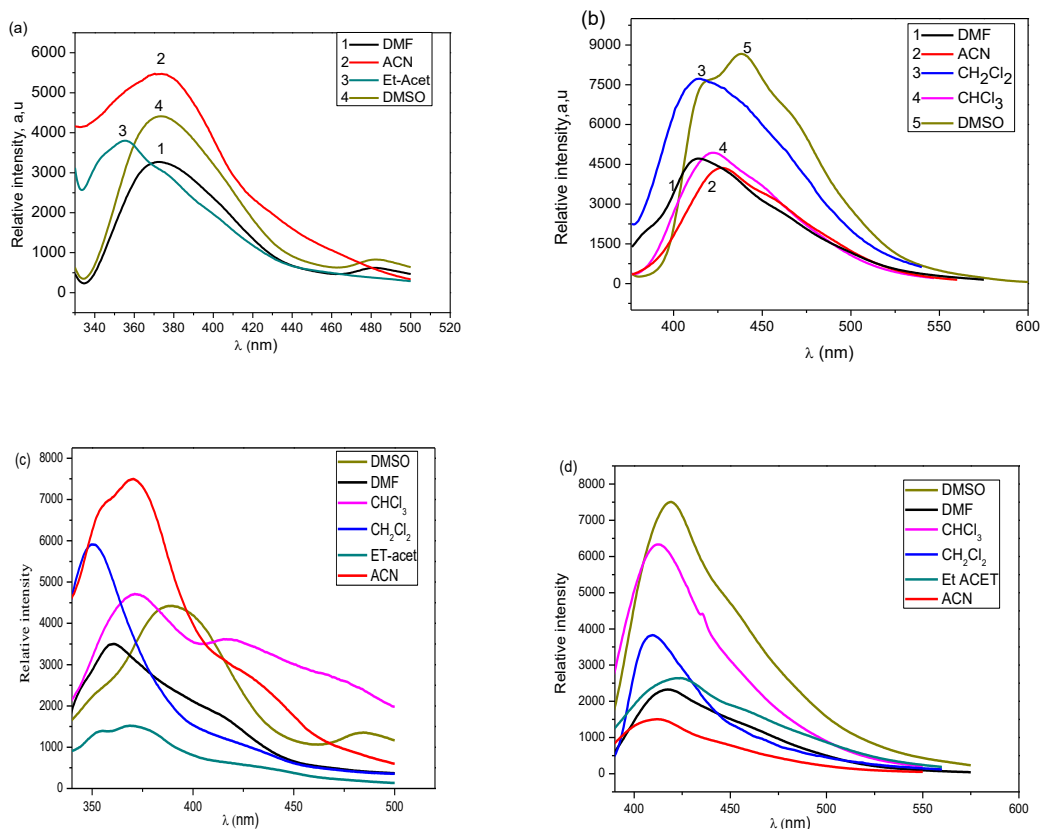


Figure III.8 (a-d): Spectre d'émission des composés (a) **5**, (b) **6**, (c) **7** et (d) **8** dans différents solvants.

Les spectres d'émission montrent un changement quand la polarité du solvant diminue, selon le milieu, de larges variations sont observées au niveau de la forme des spectres et de l'intensité de la fluorescence.

La forme et la position des spectres d'émission des composés **5** et **6** sont indépendantes de la longueur d'onde d'excitation, confirmant ainsi qu'une seule espèce émet dans chaque solution et ne montre qu'un seul pic [Figure III.8(a) et (b)].

De grandes variations ont été observées dans la forme des spectres d'émission selon les milieux. Un déplacement bathochromique est constaté pour les deux composés, associé à une augmentation de la polarité du solvant, ce déplacement est causé par une différence significative dans les distributions de charge entre l'état fondamental et l'état excité qui a été induite par une interaction forte avec les solvants polaires à l'état excité.

Le faible décalage du spectre d'absorption électronique comparé aux spectres d'émission de fluorescence indique que les composés sont moins polarisés par les solvants polaires dans l'état fondamental que dans l'état excité.

Tandis qu'en émission de fluorescence [Figure III.8 (a) et (b)] le DMSO exalte les phénomènes d'absorption le DMF lui provoque l'effet inverse pour le composé **6**. Ces comportements mettent en évidence le rôle des interactions spécifiques entre le soluté et le solvant [6,7].

Une augmentation de la polarité du solvant associée au déplacement bathochromique dans les maxima d'absorption ($\lambda_{\text{abs-max}}$) indiquent que ces principales bandes correspondent à une transition électronique π - π^* de ces composés. Les processus de transfert de charge intramoléculaire (TIC) sont connus pour être stabilisés dans des solvants avec une constante diélectrique plus élevée conduisant à un décalage vers le rouge des spectres de l'absorbance λ_{absmax} et de l'émission λ_{emmax} [8].

En fait, dans le DMSO, les coumarines **5** et **6** présentaient les plus grands déplacements bathochromiques, résultant de cette TIC. La stabilisation du transfert de charge intramoléculaire chez les coumarines a été corrélée à la capacité des solvants polaires forts à stabiliser leur état singulet excité [9,10]. De plus, la longueur d'onde et l'intensité des spectres d'émission ont été affectés lors du changement des substituants de la coumarine.

La grande magnitude du décalage de Stokes indique que la géométrie à l'état excité peut être différente de celle de l'état fondamental associé à une variation du moment dipolaire lors de l'excitation (Tableau III.5), et il est raisonnable de supposer des interactions spécifiques impliquant le groupe carbonyle et les molécules de solvant [7,11]. Le composé **6** montre l'intensité la plus forte et la longueur d'onde d'émission la plus élevée.

Concernant les composés **7** et **8**, ils n'ont pas montré un important déplacement bathochromique les pics pour le composé **7** montre une grande diversité dans la forme et l'intensité, la plus grande intensité est enregistrée dans l'ACN, la plus faible dans l'éthyl acétate. Quant au composé **8** nous remarquons que les pics sont presque dans le même domaine et ce pour tous les solvants, la plus grande intensité est enregistrée dans le DMSO.

III.7.1.3. Rendement quantique en fluorescence

Le rendement quantique de fluorescence Φ_f a été déterminé à la longueur d'excitation λ_{ex} des composés (Tableau III.5) et se situait entre $1,7 \times 10^{-2}$ et $22,2 \times 10^{-2}$ pour les composés **5** et **6** et entre $0,005 \times 10^{-2}$ et $0,253 \times 10^{-2}$ pour les composés **7** et **8**.

Les coumarines **5** et **6** dans le DMSO, le DMF et le l'ACN ont présenté une augmentation de Φ_f alors que nous nous attendions à une réduction de Φ_f dans un solvant plus polaire qui pourrait mieux stabiliser les TIC. Ce phénomène inverse pourrait s'expliquer par une réduction de la torsion des liaisons simples impliquées dans le transfert de charge à l'état excité pour certains solvants spécifiques, comme décrit pour d'autres coumarines [8]. Dans la plupart des solvants, le rendement quantique de **5** était inférieur à celui de **6**. Cependant, le composé **6** est plus fluorescent que **5**. Néanmoins, ces deux coumarines ne possèdent pas de propriétés de fluorescence aussi importantes que certaines coumarines connues à ce jour.

Quant aux composés cyclisés **7** et **8** leur rendement quantique est quasi nul pour cela la suite de l'étude se focalisera sur les composés **5** et **6**. L'influence des solvants sur les spectres d'émission en fluorescence a été étudiée uniquement sur les composés **5** et **6**.

III.7.2. Calcul du moment dipolaire à l'état fondamental et excité par la méthode solvatochromique

Afin de déterminer les moments dipolaires de l'état fondamental et excité, nous avons utilisé ici la méthode solvatochromique (interactions soluté-solvant).

Deux méthodes dépendant de l'effet du champ électrique interne (solvatochromisme) ont été utilisées dans la présente étude.

III.7.2.1. Méthode I

Les expressions des déplacements solvatochromiques sont données par les équations de A. Kawski et P. Bojarski [12-14] et qui sont les équations qui donnent les meilleurs résultats dans les changements des moments dipolaires :

La différence $\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f$:

$$\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f = S_1 f(\varepsilon, n) + const \quad \text{Eq. (1)}$$

Et la somme $\bar{\nu}_a + \bar{\nu}_f$:

$$\bar{\nu}_a + \bar{\nu}_f = -S_2 \Phi(\varepsilon, n) + const \quad \text{Eq. (2)}$$

où

$$\Phi(\varepsilon, n) = f(\varepsilon, n) + 2g(n) \quad \text{Eq. (3)}$$

Et

$$g(n) = \frac{3}{2} \frac{n^4 - 1}{(n^2 + 2)^2} \quad \text{Eq. (4)}$$

ν_a et ν_b représentent respectivement les maxima des nombres d'ondes d'absorption et de fluorescence en cm^{-1} , n et ϵ sont l'index de réfraction et la constante diélectrique des solvants

L'expression de $f(\epsilon, n)$ et $\Phi(\epsilon, n)$ sont données ci après par A. Kawski [12-14]:

$$f(\epsilon, n) = \frac{2n^2 + 1}{n^2 + 2} \left[\frac{\epsilon - 1}{\epsilon + 2} - \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right] \quad \text{Eq. (5)}$$

$$\Phi(\epsilon, n) = \left(\frac{2n^2 + 1}{(n^2 + 2)} \left(\frac{\epsilon - 1}{\epsilon + 2} - \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right) + \frac{3(n^4 - 1)}{(n^2 + 2)^2} \right) \quad \text{Eq. (6)}$$

Dans l'équation (5) et (6) ϵ et n représentent respectivement la constante diélectrique et l'indice de réfraction du solvant. Les valeurs des paramètres de polarité des solvants calculés $f(\epsilon, n)$ et $\Phi(\epsilon, n)$ sont présentés dans le tableau III.6.

Tableau III.6 : propriétés des solvants et leurs valeurs calculées des paramètres de polarité $f(\epsilon, n)$ et $\Phi(\epsilon, n)$

Solvant	μ	ϵ	n	$f(\epsilon, n)$	$\Phi(\epsilon, n)$	E_T^N
CHCl_3	1.04	4.81	1.4460	0.372	0.972	0.259
CH_2Cl_2	1.60	8.90	1.4244	0.590	1.166	0.309
Ethyl acetate	1.88	6.02	1.3720	0.489	0.996	0.228
CH_3CN	3.92	37.50	1.3441	0.863	1.332	0.460
DMF	3.82	38.00	1.4300	0.839	1.423	0.386
DMSO	3.96	46.70	1.4787	0.841	1.488	0.444

A partir de l'équation (1) et (2) l'expression des pentes S_1 et S_2 sont données ci-après.

$$S_1 = \frac{2(\mu_e - \mu_g)^2}{hca_0^3} \quad \text{Eq. (7)}$$

$$S_2 = \frac{2(\mu_e^2 - \mu_g^2)}{hca_0^3} \quad \text{Eq. (8)}$$

$h = 6,62 \cdot 10^{-27} \text{erg.s}$ est la constante de Planck.

$c = 3 \cdot 10^{10} \text{cm/s}$ est la célérité de la lumière.

a_0 est le rayon de la cavité d'Osanger du soluté [15-16]. Sa valeur est obtenue à partir de la formule suivante prise de l'équation de Suppan : $a_0 = (3M / 4\pi\delta N)^{1/3}$

M = la masse molaire du soluté

N = nombre d'Avogadro

δ = densité du soluté

La détermination des pentes des droites obtenues à partir des équations (1) et (2) nous a permis de calculer les moments dipolaires au premier état excité des coumarines.

La mesure des moments dipolaires se fait directement à partir des équations (9) et (10).

$$\mu_g = \frac{|S_2 - S_1|}{2} \left(\frac{hca_0^3}{2S_1} \right)^{1/2} \quad \text{Eq. (9)}$$

$$\mu_e = \frac{|S_2 + S_1|}{2} \left(\frac{hca_0^3}{2S_1} \right)^{1/2} \quad \text{Eq. (10)}$$

$$\frac{\mu_e}{\mu_g} = \frac{|S_2 + S_1|}{|S_2 - S_1|} \quad \text{Slope } S_2 > \text{Slope } S_1 \quad \text{Eq. (11)}$$

Les moments dipolaires du premier état excité et de l'état fondamental sont déterminés à partir des pentes S1 et S2 des graphes de $(\nu_a - \nu_f)$ et $(\nu_a + \nu_f)$ en fonction de $f(\epsilon, n)$ et $\Phi(\epsilon, n)$ respectivement dans différents solvants. Les corrélations de A. Kowski et P. Bojarski, sont regroupés dans le tableau III.7.

III.7.2.2. Méthode II

La dépendance à la polarisation et les effets de liaison hydrogène ont été corrélés à la polarité du solvant microscopique E_T^N , qui est une mesure empirique basée sur le comportement solvatochromique des colorants à la bétaine en tant que soluté sonde. La base théorique de la corrélation du décalage spectral avec E_T^N a été développée par Ravi et al. [17] selon l'équation (12).

$$(\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f) = S_3 E_T^N + const \quad \text{Eq. (12)}$$

$$S_3 = 11307 \left[\left(\frac{\Delta\mu}{\Delta\mu_b} \right)^2 \left(\frac{a_B}{a_0} \right)^3 \right] \quad \text{Eq. (13)}$$

Où $\Delta\mu_b = 9D$ et $a_B = 6,2 \text{ \AA}$ sont les modifications du moment dipolaire à l'excitation et du rayon de Onsager du colorant à la bétaine; $\Delta\mu$ et a_0 sont les grandeurs correspondantes

pour la molécule de soluté d'intérêt. E_T^N est défini par l'équation (14), en utilisant de l'eau ($E_T^N = 1$) et du tétraméthylsilane ($E_T^N = 0$) comme solvant de référence.

$$E_T^N = \frac{E_T(\text{solvent}) - E_T(\text{TMS})}{E_T(\text{water}) - E_T(\text{TMS})} = \frac{E_T(\text{solvent}) - 30.7}{32.4} \quad \text{Eq. (14)}$$

Enfin, l'évolution du moment dipolaire ($\Delta\mu$) peut être déterminée par l'équation (15):

$$\Delta\mu = (\mu_e - \mu_g) = \sqrt{\frac{S_3 \cdot 81}{(6.2/a_0)^3 \cdot 11307.6}} \quad \text{Eq. (15)}$$

Où S_3 est la pente obtenue à partir de la représentation linéaire du décalage de Stokes en fonction de la polarité du solvant microscopique (E_T^N) à l'aide de l'équation (12).

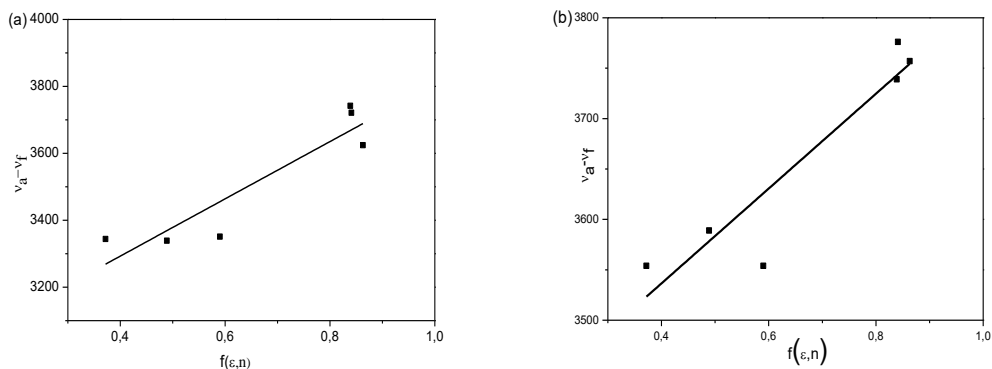


Figure III.9: (a-b) Variation de Stokes en utilisant l'équation (1) dans différents solvants (a) pour 5 et (b) pour 6.

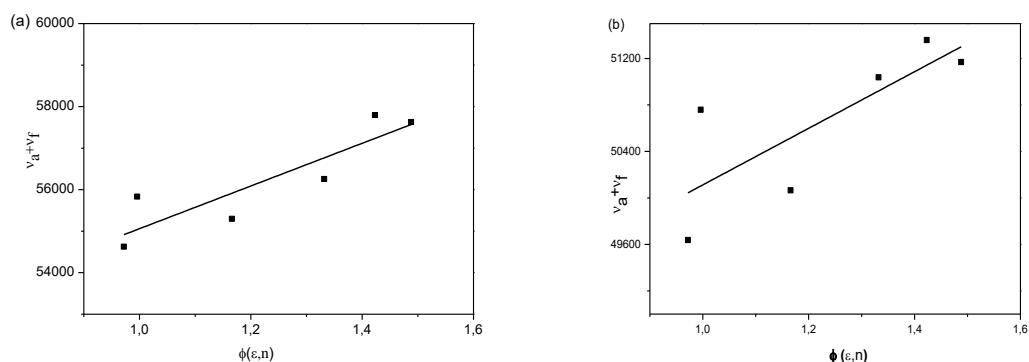


Figure III.10 : Variation de Stokes avec $\Phi(\epsilon, n)$ en utilisant l'équation(2) dans différents solvants (a) pour 5 et (b) pour 6.

Tableau III.7 : Traitement statistique de corrélation des composés **5** et **6**.

Composés	pen­te	Intersection (cm ⁻¹)	Coefficient de corrélation (R)	Nombre de point
Eq. (1) corrélation				
5	855.50239	2950.68725	0.92	6
6	470.45506	3348.33375	0.93	6
Eq. (2) corrélation				
5	5140.88507	49919.28181	0.89	6
6	2434.87605	47677.3199	0.79	6
Eq. (12) corrélation				
5	1771.80875	2904.16782	0.88	6
6	998.62544	3314.14456	0.91	6

Les déplacements de Stokes ($\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f$) et la moyenne arithmétique du décalage de Stokes ($\bar{\nu}_a + \bar{\nu}_f$) pour les coumarines **5** et **6** dans différents solvants ont été calculés à partir de leurs maxima d'absorption et d'émission) afin d'estimer les moments dipolaires à l'état excité. Les décalages sur les pics d'émission avec les changements de polarité du solvant sont plus prononcés que ceux des pics d'absorption. Cela indique que $\Delta\mu$ est positif, ce qui signifie que le moment dipolaire de **5** et **6** augmente en mode excité.

Les figures III.9 (a) et (b) montrent les graphiques des déplacements spectraux ($\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f$) par rapport aux fonctions de polarité de solvant $f(\epsilon, n)$, les figures III.10 (a) et (b) représentent les graphiques des déplacements spectraux ($\bar{\nu}_a + \bar{\nu}_f$) respectifs par rapport aux fonctions de polarité de solvant $\Phi(\epsilon, n)$, tandis que les figures III.11 (a) et (b) tracent les graphiques des déplacements de Stoke ($\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f$) en fonction de la polarité du solvant microscopique E_T^N .

Les pentes S1, S2 et S3 ont ensuite été obtenues à partir de ces graphiques.

De bons coefficients de corrélation ont été obtenus pour tous les cas (les coefficients de corrélation, les pentes et les intersections des droites ajustées sont donnés dans le tableau

III.7). Les valeurs des moments dipolaires à l'état fondamental et à l'état excité ainsi que des rapports ($\frac{\mu_e}{\mu_g}$) des molécules de soluté ont été estimées à l'aide des équations (9-11) et présentées dans le tableau III.8. De plus, la variation du moment dipolaire $\Delta\mu$ a été calculée à partir de la première méthode. ($\mu_e - \mu_g$) et de la seconde méthode (Eq. 15) et elles sont présentées dans le tableau III.8.

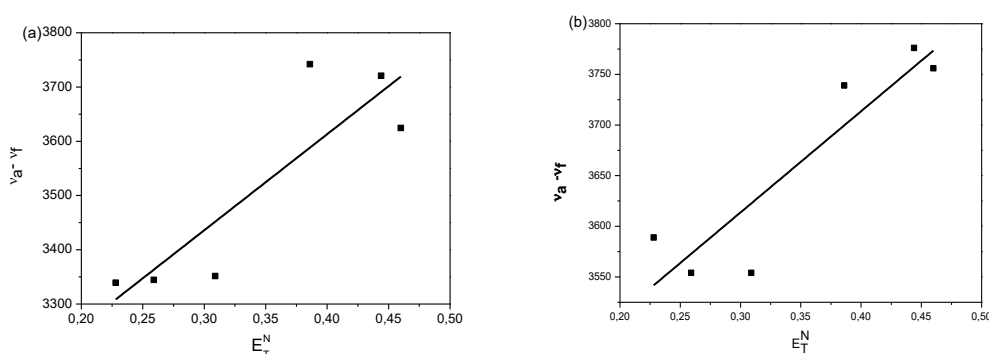


Figure III.11: Variation de Stokes avec la polarité microscopique du solvant (E_T^N) en utilisant l'équation (12) dans différents solvants pour **5** (a) et **6** (b)

Les moments dipolaires des deux dérivés de la coumarine **5** et **6** étaient plus élevés à l'état excité par rapport au premier état fondamental et changent avec la nature du substituant de la coumarine.

Les moments dipolaires diminuent dans le cas de la benzo [f] coumarine **6**. Une bonne concordance a été observée pour un changement de moment dipolaire ($\Delta\mu$) de **5** avec un petit rayon de la cavité de Onsager. Le grand changement de moment dipolaire à l'excitation suggère que l'état excité est un transfert de charge intramoléculaire torsadé (TICT).

L'augmentation des moments dipolaires à l'état excité par rapport aux moments dipolaires à l'état fondamental indique une redistribution substantielle des densités d'électrons- π dans un état excité plus polaire pour les deux coumarines **5** et **6**.

Les valeurs élevées de μ_e et μ_g et la variation du moment dipolaire pour les composés **5** et **6** peuvent être interprétées en fonction de leurs structures possibles de résonance, comme le montre la figure III.12.

Lors de l'excitation, les groupes carbonyle deviennent de puissants groupes attracteurs d'électrons, ce qui explique la valeur plus élevée du moment dipolaire dans les deux états excités pendant le processus de transfert de charge.

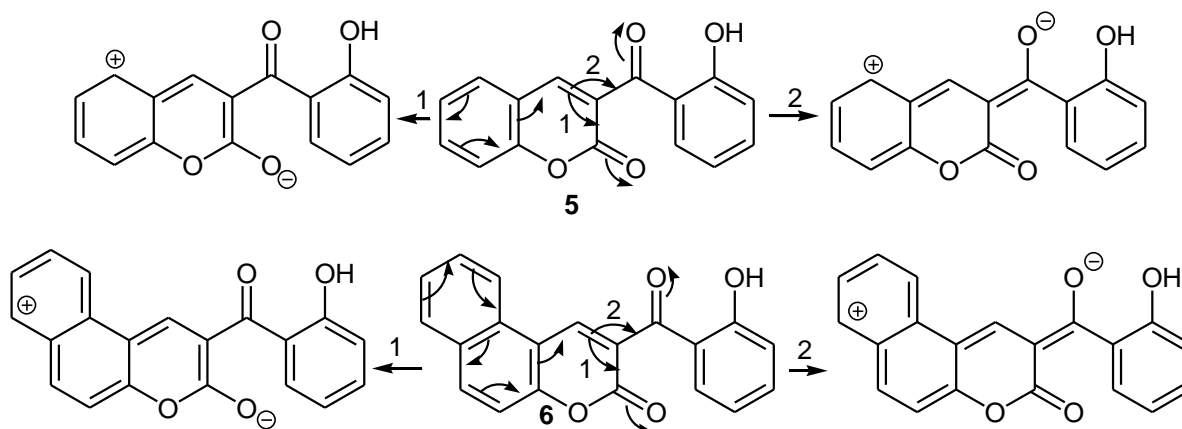


Figure III.12. Résonance Possible des structures des coumarines **5** et **6**

Tableau III.8 : Moments dipolaires à l'état fondamental et excité des composés **5** et **6** avec a_0 calculé avec ChemOffice(i) et a_0 calculé avec B3LYP (ii).

composés		Rayon (Å°)	$\mu_g(\text{D})^a$	$\mu_e(\text{D})^b$	$\Delta\mu(\text{D})^c$	$\Delta\mu(\text{D})^d$	μ_e/μ_g^e
5	(i)	4.23	13.87	19.41	5.65	4.66	1.40
	(ii)	4.95	17.58	24.60	7.02	5.86	1.40
6	(i)	4.46	7.18	10.62	3.44	2.90	1.48
	(ii)	5.21	9.06	13.41	4.35	3.67	1.48

Debye = $3.33564 \times 10^{-30} \text{c.m}$

(a) Le moment dipolaire de l'état fondamental calculé à partir de l'équation (9).

(b) Le moment dipolaire de l'état excité calculé à partir de l'équation (10).

(c) La différence du moment dipolaire calculé à partir des équations de A. Kawski et P. Bojarski (7).

(d) La différence du moment dipolaire calculé à partir de l'équation (15).

(e) Le rapport μ_e et μ_g calculé à partir de l'équation (11).

III.7.3. Calcul du moment dipolaire par la méthode théorique (méthode de simulation)

III.7.3.1. La Stabilité relative

Afin de comparer les observations expérimentales aux calculs théoriques, nous avons effectué des calculs de chimie quantique à l'état fondamental en phase gazeuse et dans

différents solvants avec la méthode DFT / B3LYP pour l'état S_0 et TD-DFT / B3LYP pour l'état S_1 . La figure III.13 illustre la représentation schématique des différents rotamères des coumarines **5** et **6**. Les énergies relatives pour différents rotamères calculées au niveau B3LYP / 6-31G (d) sont résumées dans le tableau III.9.

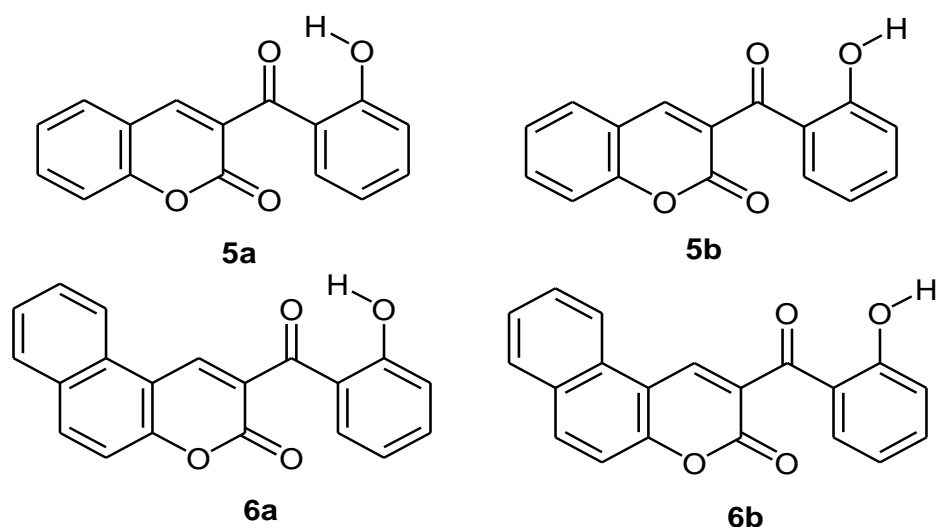


Figure III.13 : Représentation schématique des différents rotamères des coumarines **5** et **6**.

Les modèles moléculaires ainsi que les géométries d'équilibres ont été construits avec l'interface graphique du programme GausView. Les optimisations des géométries d'équilibre ont été effectuées avec le programme GAUSSIAN 09W.

L'environnement est probablement l'un des facteurs les plus déterminants de la répartition des rotamères. L'étude de l'interaction entre soluté et solvant est normalement un processus compliqué, mais l'étude des interactions soluté-solvant est basée sur le modèle de continuum CPCM (conductor-like polarizable continuum model) qui permet de déterminer le rotamère le plus abondant avec une assez bonne stabilité.

Ce modèle de continuum est efficace en termes de calcul pour la prévision des tendances de stabilité en phase liquide [6]. Les paramètres énergétiques des rotamères dans différents solvants calculés au niveau théorique de B3LYP / 6-31G (d) sont également répertoriés dans le tableau III.9.

Le rayon moléculaire (\AA) de la cavité sphérique obtenu pour des géométries optimisées pour les coumarines **5** et **6** est calculé avec la méthode B3LYP / 6-31G (d), parmi les

nombreux rotamères possibles, nous n'avons considéré que les plus stables obtenus dans la phase liquide (Tableau III.9).

Un examen des énergies relatives des rotamères présenté dans le tableau 9 montre une différence relativement significative entre les rotamères et révèle que la variation de l'orientation spatiale du groupe OH en **5** et **6** a un effet significatif sur leurs stabilités relatives.

Tableau III.9 : Energies relatives $\Delta E_{(ZPVE)}$ (kcal/mol) dans la phase gazeuse, énergies relatives ΔE_0 dans la phase solvant, moment dipolaire (Debye) calculé par la méthode DFT B3LYP / 6-31G(d)

	Phase gazeuse $\Delta E_{(ZPVE)}$ μ	CHCl ₃ ΔE_0 μ	CH ₂ Cl ₂ ΔE_0 μ	Et-acet ΔE_0 μ	ACN ΔE_0 μ	DMF ΔE_0 μ
5						
5a	0.00 5.31	0.00 7.08	0.00 7.39	0.00 7.21	0.00 7.70	0.00 7.70
5b	33.86 5.47	32.10 6.80	31.66 7.14	31.91 6.95	31.20 7.50	31.20 7.50
6						
6a	0.00 5.96	0.00 7.83	0.00 8.15	0.00 7.96	0.00 8.46	0.00 8.46
6b	38.68 5.79	36.84 7.20	36.38 7.54	24.15 7.48	24.23 7.94	35.89 7.91

III.7.3.2. Les moments dipolaires

Le moment dipolaire reflète le degré de répartition des charges dans une molécule.

Habituellement, il est utilisé pour illustrer une variété de propriétés physiques et chimiques.

Les moments dipolaires des dérivés des deux coumarines ont été calculés par la méthode B3LYP /6-31+G(d,p) (Tableau III.9). Comme on peut le constater, il apparait une variation importante dans le moment dipolaire de la phase gazeuse vers la phase de l'état liquide. Il est à noter que les valeurs du moment dipolaire sont plus élevées à la phase liquide. La valeur du moment dipolaire augmente avec la constante diélectrique dans l'ordre suivant :

DMF > Acétonitrile > dichloromethane > ethyl acétate > chloroforme > phase gazeuse.

Des valeurs élevées du moment dipolaire (Tableau III.10) ont été observées à l'état excité par rapport à l'état fondamental correspondant indiquant ainsi un transfert de charge intramoléculaire (ICT).

Nous avons remarqué qu'il existe une corrélation directe entre le moment dipolaire et l'ordre de stabilité des molécules. Le rotamère polaire présente un moment dipolaire élevé dans des solvants polaires, ce qui fait croître la stabilité de la molécule.

Tableau III.10 : Moments dipolaires en Debye des composés **5a** et **6a** calculés par la méthode DFT/B3LYP et TD-DFT/B3LYP à l'état fondamental et excité dans la phase gazeuse et le DMSO

Composés	Gas phase		DMSO	
	μ_g	μ_e	μ_g	μ_e
5a	5.31	7.83	7.52	10.12
6a	5.96	9.06	8.30	11.57

Les différences entre les moments dipolaires excités expérimentaux et théoriques résultent de l'équation de Kawski et al. [12-14] et de toutes les équations utilisées pour le traitement de l'effet solvatochromique (Tableau III.8) et au niveau théorique B3LYP / 6-31G (d) dans différents environnements (Tableau III.9) peuvent expliquer que le moment dipolaire de molécules organiques dépende du processus de transfert au sein de la molécule. Nous avons constaté que **5a** et **6a** sont plus polaires à l'état excité que l'état fondamental et sont donc plus sensibles aux effets des solvants.

Nous avons donc adopté les rotamères **5a** et **6a** pour le reste de l'étude théorique

III.7.3.3. Calculs chimiques quantiques

Les géométries des états fondamental et excité calculées aux niveaux DFT et TD-DFT pour **5a** et **6a** sont représentées sur la figure III.14 pour la numérotation des atomes.

En premier lieu, la géométrie des deux composés avec la direction du moment dipolaire à l'état fondamental (S_0) et l'état excité singulet (S_1) ont été optimisés [Figures III.15. (a) et (b)].

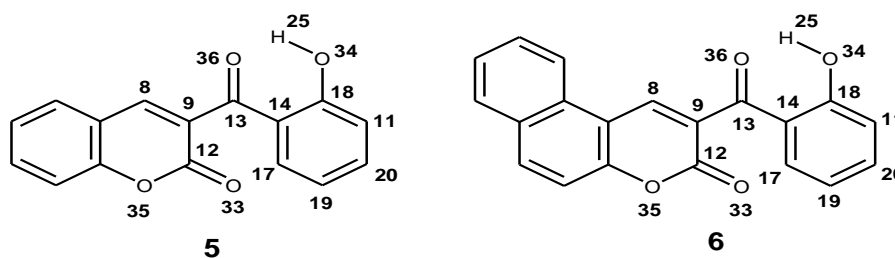


Figure III.14 : Numérotation arbitraire pour faciliter la comparaison

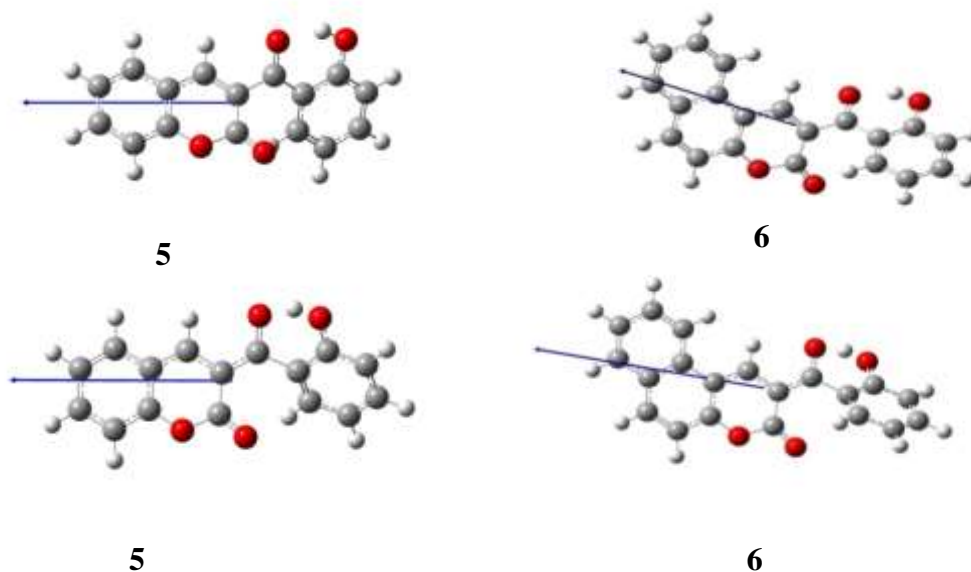


Figure.III.15a : Géométrie optimisée à l'état fondamental des composés **5** et **6** (état S_0 , rangée du haut) et à l'état singulet excité (état S_1 , rangée du bas) ainsi que la direction des moments dipolaires. La phase gazeuse a été prise en considération dans les calculs opérés par B3LYP/6-31g(d).

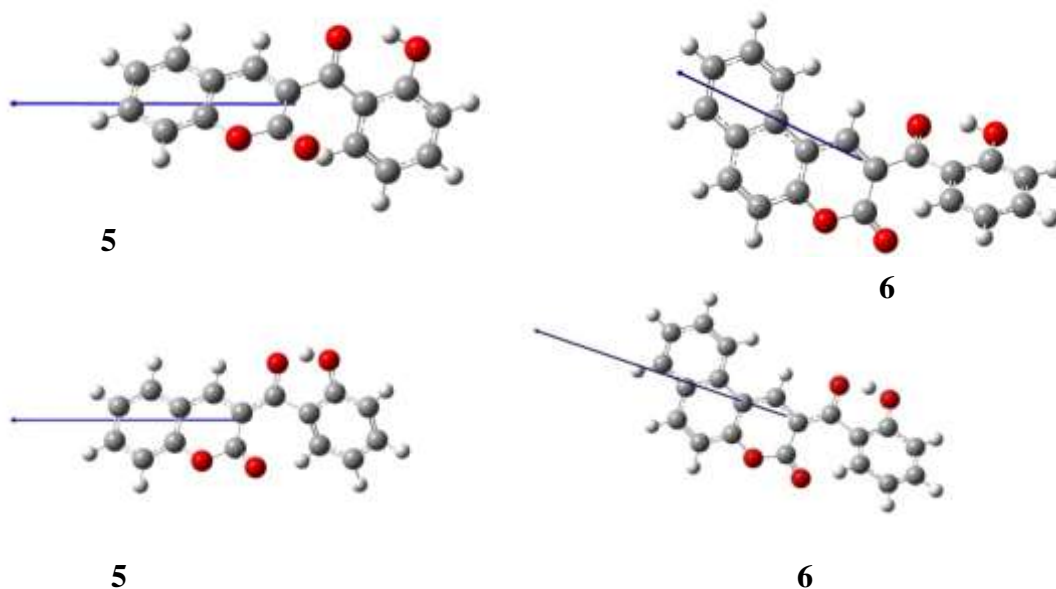


Figure III.15b : Géométrie optimisée à l'état fondamental des composés **5** et **6** (état S_0 , rangée du haut) et à l'état singulet excité (état S_1 , rangée du bas) ainsi que la direction des moments dipolaires. Le DMSO a été prise en considération dans les calculs (modèle PCM) opérés par B3LYP/6-31g(d).

Généralement, les composés prennent une géométrie coplanaire (c'est-à-dire situés sur un même plan) à l'état S_0 , mais pour les deux groupes **5a** et **6a** en phase gazeuse, nous avons constaté que le noyau de la coumarine et le fragment 2-hydroxybenzoyle prenaient une conformation torsadée, soit l'angle diédral ($D_{S_0}^5$) ($C_{12}C_9C_{13}C_{14}$) de **5a** 51,88 ° et de -49,44 ($D_{S_0}^6$) ($C_{12}C_9C_{13}C_{14}$) pour **6a**.

Il convient de noter que la géométrie de l'état fondamental a été utilisée pour l'optimisation du premier état excité de géométrie singulet.

Les angles dièdres de **5a** et **6a** à l'état excité sont respectivement de $D_{S_1}^5 = 8,89$ ° et de $D_{S_1}^6 = -8,78$ °.

Dans le DMSO, l'angle dièdre ($D_{S_0}^5$) de **5a** est égal à 55,39 ° et égal à -52,35 ° ($D_{S_0}^6$) pour **6a** à l'état S_0 .

A l'état S_1 , les angles dièdre de **5a** et **6a** à l'état excité sont respectivement de $D_{S_1}^5 = 16,10$ ° et de $D_{S_1}^6 = -16,90$ °.

Pour la géométrie de l'état fondamental, le noyau de la coumarine et le 2-hydroxybenzoyle de la molécule prennent une conformation torsadée.

À l'état S_1 , les deux composants prennent une géométrie plus coplanaire qui confirme que la conformation de la molécule est stabilisée à l'état excité.

Les spectres d'absorption UV-vis et d'émission de **5a** et **6a** ont été calculés sur la base de la géométrie optimisée des états S_0 et S_1 , avec la méthode TD-DFT.

Pour le composé **6**, l'effet de substitution (benzo fondu) pourrait expliquer la forme et la position des spectres d'absorption et d'émission.

En général, une extension du système π s'accompagne d'un décalage des spectres d'absorption et de fluorescence vers les plus grandes longueurs d'onde. Les spectres d'absorption UV-vis et d'émission calculés sont en accord avec les résultats expérimentaux. Par exemple, le maximum d'absorption calculé de **5a** est à 351 nm, très proche de l'absorption observée expérimentalement à 326 nm, pour **6a**, le maximum d'absorption calculé est à 407 nm, ce qui est en accord avec les résultats expérimentaux de 364 nm.

Afin d'étudier l'émission de **5a** et **6a**, le gap d'énergie $S_0 - S_1$ calculé (longueur d'onde d'émission) est de 392 nm, ce qui est proche du résultat expérimental de 371 nm pour **5a**. Pour **6a**, la longueur d'onde d'émission calculée est de 455 nm, ce qui est en accord avec le résultat expérimental de 422 nm.

Les FMO ou les orbitales moléculaires frontières [orbitale moléculaire occupée la plus haute (HOMO) et orbitale moléculaire moins occupée (LUMO)] impliquées dans l'excitation verticale de **5a** et **6a** sont présentées dans les figures III.16 (a et b).

Comme on peut le constater, dans les états fondamental et excité de **5a** et **6a**, dans tous les cas, le HOMO est localisé dans le fragment 2-hydroxybenzoyle et le LUMO migre sur la molécule entière. Par conséquent, le transfert de charge se produit du fragment 2-hydroxybenzol au noyau de la coumarine dans la transition HOMO-LUMO.

Ainsi, la nature ICT de l'état S_1 est démontrée. L'écart énergétique d'HOMO-LUMO pourrait expliquer l'interaction éventuelle de transfert de charge au sein de la molécule.

Les valeurs énergétiques calculées des niveaux HOMO et LUMO pour l'état fondamental dans la phase gazeuse de **5a** sont respectivement de -6,11 eV et -2,46 eV, soit la différence d'énergie de 3,66 eV. Pour **6a**, cette différence d'énergie est de 3,57 eV (Tableau III.11).

Lorsque les molécules sont excitées, la différence d'énergie HOMO et LUMO diminue à 1,97 eV pour **5a** et à 1,93 eV pour **6a**. La faible valeur de l'écart de l'orbitale moléculaire frontière de **5a** et **6a** à l'état excité indique que la molécule est plus réactive.

Tableau III.11: Les paramètres thermodynamiques calculés de **5a** et **6a** dans la phase gazeuse et dans le DMSO.

	DFT/B3LYP		TD DFT/B3LYP	
	5a	6a	5a	6a
Phase gazeuse				
Energie (Hartree)	-916.63193471	-1070.27590943	-916.60202281	-1070.24739941
E_{HOMO} (eV)	-6.11	-6.05	-5.32	-5.23
E_{LUMO} (eV)	-2.49	-2.54	-3.35	-3.30
ΔE_{LUMO-HOMO} (eV)	3.62	3.51	1.97	1.93
Angle dihedre (°) C₁₂-C₉-C₁₃-C₁₄	51.88	-49.44	8.89	-8.78
DMSO				
Energie (Hartree)	-916.644453504	-1070.28921887	-916.62161561	-1070.268175
E_{HOMO} (eV)	-6.34	-6.16	-5.77	-5.74
E_{LUMO} (eV)	-2.46	-2.54	-3.17	-3.16
ΔE_{LUMO-HOMO} (eV)	3.88	3.62	2.6	2.58
Angle dihedre (°) C₁₂-C₉-C₁₃-C₁₄	55.39	-52.35	16.10	-16.90

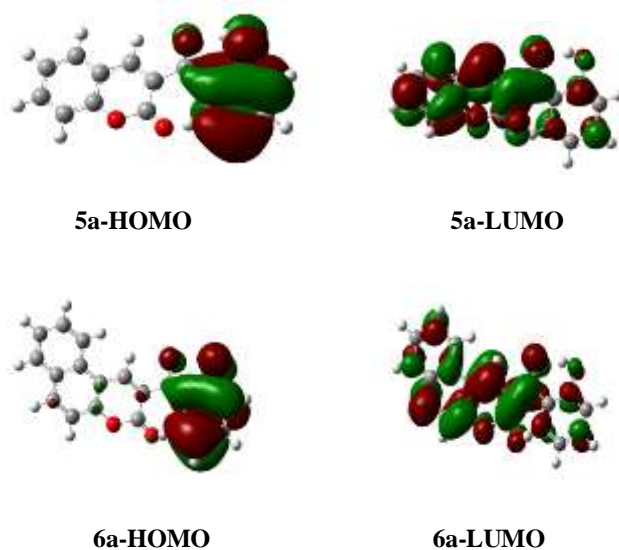


Figure III.16a: Représentation 3D des orbitales frontières HOMO et LUMO dans la phase gazeuse état fondamental de **5a** et **6a**.

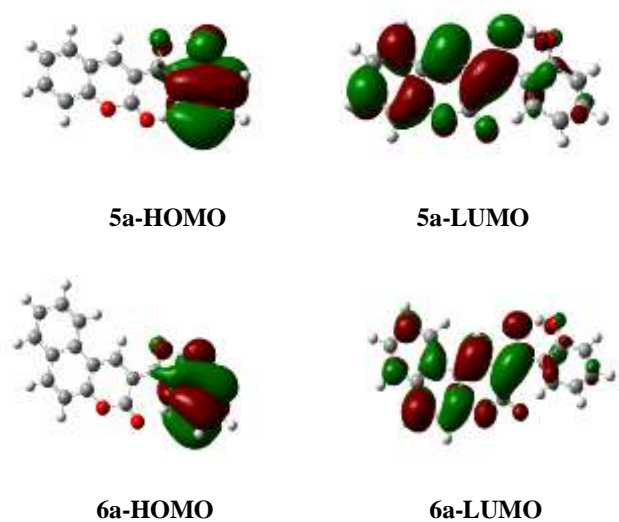


Figure.III.16.b: Représentation 3D des orbitales frontières HOMO et LUMO à l'état le plus faiblement excité de **5a** et **6a**.

Les charges atomiques de Mulliken sur chaque atome de **5a** et **6a** étudiées dans un milieu gazeux et DMSO sont listées et schématisées en annexe.

Pour ces deux composés, tous les atomes d'hydrogène sont associés à une charge positive. Dans **5a**, la plupart des atomes de carbone C(3-7), C(11-13), C(15-16) et tous les atomes d'oxygène sont associés à une charge négative, indiquant qu'il s'agit d'atomes donneurs, les autres atomes de carbone étant associés à des charges positives se comportent comme des atomes accepteurs. Ainsi, le transfert d'électrons du noyau benzo au groupe carbonyle via le cycle 2H-pyrano fait du groupe carbonyle un donneur d'électrons et la fraction 2-hydroxybenzoyle d'un accepteur d'électrons.

Les valeurs maximales de charge négatives et positives dans le DMSO sont respectivement de -0,660278 pour O (28) et de 0,585529 pour C (8) dans la molécule (voir annexe).

Dans **6a**, la plupart des atomes de carbone (12/20) et des atomes d'oxygène sont associés à une charge négative, indiquant qu'il s'agit d'atomes donneurs, alors que C (1), C (2), C (5), C (6), C (12), C (13), C (14), C (18) associés avec une charge positive se comportent comme des atomes accepteurs. Le transfert d'électrons du cycle benzo au groupe carbonyle via le cycle benzopyrano fait du groupe carbonyle un donneur d'électrons et le groupe 2-hydroxybenzoyle d'un accepteur d'électrons. Les valeurs maximales de charge négatives et positives sont respectivement de -0,661071 pour O (34) et de 0,578580 pour C (12) dans la molécule.

Les cartes de potentiel électrostatique moléculaire [Figures III.17. (a) et (b)] des molécules polaires représentent le potentiel électrostatique autour de la molécule en fonction des sites d'attaque électrophiles et nucléophiles ainsi que des interactions de liaison hydrogène dans un solvant.

Mais il faut garder à l'esprit que les cartes représentent le potentiel dû à l'ensemble des électrons et qu'un site pauvre en électrons dans la molécule n'est donc pas nécessairement le site le plus électrophile.

Les MESP (molecular electrostatic potential) des molécules polaires font un excellent résultat de prédiction de la possibilité d'interactions charge-dipole et dipôle-dipôle. Le potentiel électrostatique moléculaire à la surface est représenté par différentes couleurs. La couleur rouge indique le caractère électronégatif responsable de l'attaque électrophile, la couleur bleue indique la région positive représentant l'attaque nucléophile et la couleur verte représentant le potentiel zéro. Il est important de mentionner que les mêmes régions sont également identifiées dans les charges de Mulliken.

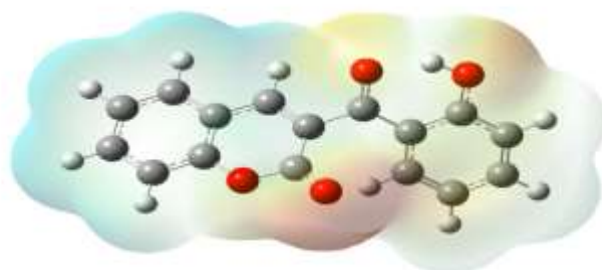


Figure III.17a: Surface de potentiel électrostatique moléculaire de **5a**

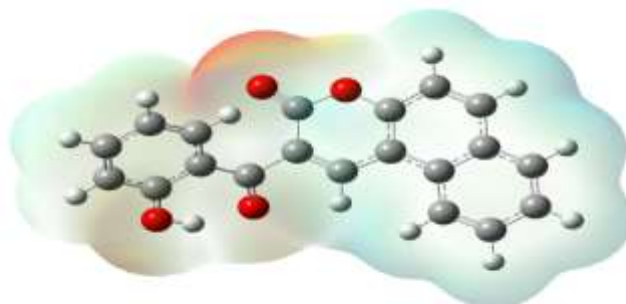


Figure.III.17b : Surface de potentiel électrostatique moléculaire de **6a**

III.8. Etude de l'activité biologique

III.8.1. Lecture des antibiogrammes : Méthode de diffusion de disques sur milieu solide

La lecture des antibiogrammes se fait par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions au tour des disques. La sensibilité aux différents produits est classée selon le diamètre des zones d'inhibition comme suit [18]:

- Non sensible (-) pour le diamètre moins de 8 mm ;
- Sensible (+) pour un diamètre entre 9 à 14 mm;
- Très sensible (+ +) pour un diamètre entre 15 à 19 mm et extrêmement sensible (+++) pour le diamètre plus que 20 mm.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau III.12: Diamètres des zones d'inhibition (en mm) des produits **5, 6, 7 et 8** ainsi que les antibiotiques de référence acide Nalidixique (NA) Cefoxitine (FOX), et Augmentin (Aug).

Composés	Diamètre de la zone d'inhibition des produits de synthèse (mm).				Diamètre de la zone d'inhibition des antibiotiques de référence (mm).		
	5	6	7	8	NA	FOX	Aug
Souche							
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	-	-	-	-	25±0.2	28±0.5	20±1
<i>Klebsiela</i> <i>Pneumonia</i> ATCC700603	-	-	-	-	16±0.1	20±0.1	14±0.1
<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> ATCC43300	20±0.3	-	-	-	10±0.3	45±0.2	40±0.2
<i>Bacillus</i> <i>Cereus</i> ATCC10876	28±0.7	-	-	-	21±0.7	14±0.5	13±0.6

(-): Pas d'inhibition.

Comme le montre le tableau III.12 et la figure III.18, les souches bactériennes se comportent différemment vis-à-vis des produits testés.

En effet, les bactéries à gram négatif *Escherichia coli* et *Klebsiela pneumonia* se sont révélées résistantes à tous les produits testés.

Les deux autres souches *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* ne présentent aucune sensibilité aux produits **6, 7 et 8**.

Seul, le produit **5** montre une forte activité contre les bactéries à gram positif *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* avec des diamètres de 20 et 28 mm respectivement.

En comparant ce résultat avec ceux des trois antibiotiques testés, des zones d'inhibitions comprises entre 10 et 45mm et entre 13 et 21mm pour les souches *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* respectivement, nous pouvons conclure que ces deux dernières sont extrêmement sensibles au produit **5** avec une zone d'inhibition nettement supérieure telles illustrées dans la figure III.18.

Nous remarquons ainsi clairement, que la présence du groupement hydroxyle dans les molécules de structure ouverte (**5** et **6**) joue un rôle major dans ce test, mais cet effet est désactivé par le deuxième benzène de la coumarine du produit **6**. Contrairement aux produits de structure fermée (**7** et **8**) qui ne présentent aucune sensibilité aux micro-organismes testés.

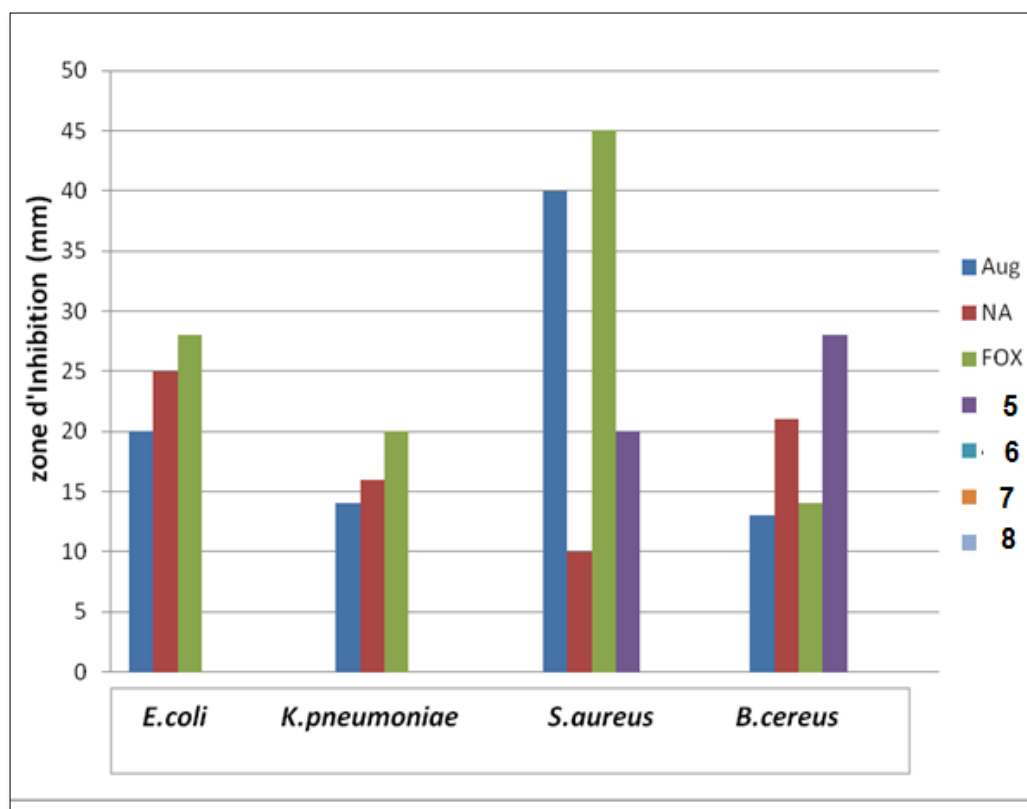


Figure III.18 : Diamètres des zones d'inhibition des produits ainsi que les antibiotiques de référence Augmentin, acide Nalidixique et Cefoxitine

III.8.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

Nous avons déterminé les valeurs de CMI du produit **5** pour les souches bactériennes, qui se sont montrées sensibles (20 - 28 mm) par la méthode de diffusion des disques sur milieu solide, la lecture s'effectue à l'œil nu et est résumée dans le tableau suivant :

Tableau III.13: Résultats des CMI du composé **5**.

Dilutions Souches	Solution mère 10mg/ml	1 ^{ère} dilution 5mg/ml	2 ^{ème} dilution 2.5mg/ml	3 ^{ème} dilution 1.25mg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	Pas de trouble	Pas de trouble	trouble	trouble
<i>Bacillus cereus</i>	Pas de trouble	trouble	trouble	trouble

En pratique après avoir observé la CMI, on considère tous les tubes de dilutions décroissantes en allant vers la plus faible non inhibitrice.

Aligiannis et ses collaborateurs [19] ont proposés une classification sur la base des résultats des CMI, comme suit :

- forte inhibition: CMI inférieure à 500µg/ml;
- inhibition modérée: CMI varie de 600 µg/ml à 1500 µg/ml;
- faible inhibition: CMI supérieure à 1600 µg/ml.

Ainsi, selon cette classification, on constate une très faible inhibition pour notre produit dilué. Cependant la souche de *Staphylococcus aureus* s'est montrée plus sensible au produit avec une valeur de 5mg/ml contre une CMI de 10 mg/ml avec la souche *Bacillus cereus* malgré sa très forte activité dans le milieu solide (une zone d'inhibition de 28mm).

III.9. Activité antioxydante

L'activité antiradicalaire testée pour les composés **5-6** et **7-8** montre que seul le composé **7** présente une activité antiradicalaire et est exprimée en le comparant à celui de l'AA standard (Figure III.19).

Le tableau III.14 montre que le composé **7** présente une activité antiradicalaire moyenne de 71% pour la concentration la plus élevée 10^{-1} M, alors que l'AA standard présente une inhibition de 96,89%. Le tableau III.15 résume les valeurs des concentrations minimales inhibitrices CI_{50} du composé **7** testé.

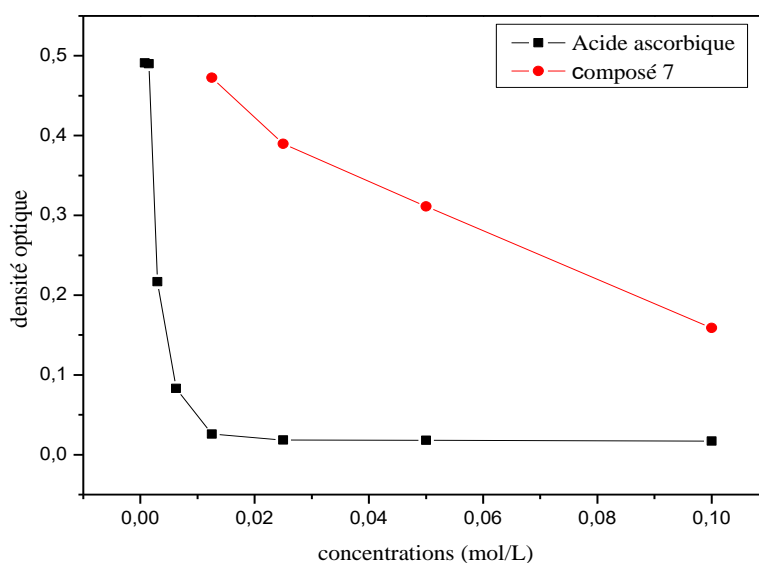


Figure III.19: Variation de l'absorbance en fonction des concentrations du composé 7 et du standard (AA)

Tableau III.14 : Activité antiradicalaire du composé 7 et de l'acide ascorbique

% d'inhibition				
Dilutions	10^{-1} M	5×10^{-2} M	2.5×10^{-2} M	1.25×10^{-2} M
Composés testés				
Composé 7	71	43,13	28,74	13,62
Acide ascorbique	96,89	96,71	96,62	95,27

Tableau III.15: Valeurs des CI_{50} du composé 7 et du témoin déterminées par le test au DPPH.

Composés testés	CI_{50} (mol/l)
Composé 7	0,064
Acide ascorbique	0,0034

Il semble que, pour les produits 5 et 6 de forme ouverte, la présence du groupement hydroxyle n'a aucun effet sur le pouvoir de piégeage du radical libre DPPH..

Notons aussi que, l'addition d'un deuxième noyau benzénique (produit **8**) désactive la molécule dans ce test contrairement à la molécule **7** qui ne présente qu'un seul noyau benzénique.

- Les pourcentages du DPPH· résiduels en fonction des concentrations des échantillons, nous permettent d'obtenir la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration de DPPH. initiale à 50%. Cette valeur est appelée la concentration efficace EC_{50} et parfois notée IC_{50} (concentration inhibitrice minimale). Plus cette valeur d' EC_{50} est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande. La concentration inhibitrice minimale (CI_{50}) est estimée par extrapolation à 50% d'inhibition en traçant la droite % inhibition en fonction de la concentration.

A ces concentrations utilisées (0.1, 0.05, 0.025 et 0.0125 M) nous n'avons pas pu déterminer la $CI_{50\%}$ de l'acide ascorbique, nous avons alors continué les dilutions à un demi jusqu'à 0.00078M.

Notons que, la $IC_{50\%}$ du produit **7** est de 0,064M et celle de l'Acide Ascorbique est de 0,0034M. De ce fait, nous pouvons conclure que le composé **7** possède une activité antioxydante mais très inférieure à l'activité de la référence utilisée (acide ascorbique).

III. 10. Activité cytotoxicité

Les composés (**5-6** et **8**) ont été évalués pour leur effet cytotoxique in vitro en utilisant le test d'exclusion au bleu Trypan dans Sp2-0 / Ag14.

Les résultats ont indiqué que les composés **6** et **8** présentaient un effet cytotoxique contre la lignée cellulaire cancéreuse murine Sp2-0 / Ag14: $CC_{50} = 6,5 \mu\text{M}$ pour le composé **6** et $CC_{50} = 4,3 \mu\text{M}$ pour le composé **8**, tandis que le composé **5** ne présentait pas d'effet cytotoxique ($CC_{50} > 100 \mu\text{M}$, inactif).

Le composé **8** était le plus cytotoxique vis-à-vis des cellules Sp2-0 / Ag14, entraînant une altération cellulaire ou décès par rapport aux cellules témoins non traitées (Figure III.20).

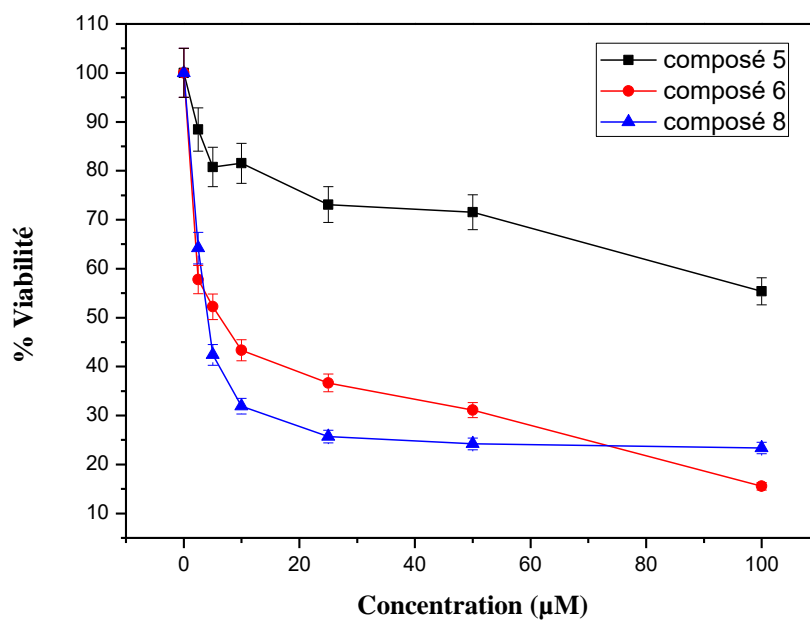


Figure III.20: Cytotoxicité des composés 5, 6 et 8

Références bibliographiques

- [1] Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Scalmani, G., Barone, V., Petersson, G.A., Nakatsuji, H., Li, X., Caricato, M., Marenich, A.V., Bloino, J., Janesko, B.G., Gomperts, R., Mennucci, B., Hratchian, H.P., Ortiz, J.V., Izmaylov, A.F., Sonnenberg, J.L., Williams-Young, D., Ding, F., Lipparini, F., Egidi, F., Goings, J., Peng, B., Petrone, A., Henderson, T., Ranasinghe, D., Zakrzewski, V.G., Gao, J., Rega, N., Zheng, G., Liang, W., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Throssell, K., Montgomery Jr., J.A., Peralta, J.E., Ogliaro, F., Bearpark, M.J., Heyd, J.J., Brothers, E.N., Kudin, K.N., Staroverov, V.N., Keith, T.A., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A.P., Burant, J.C., Iyengar, S.S., Tomasi, J., Cossi, M., Millam, J.M., Klene, M., Adamo, C., Cammi, R., Ochterski, J.W., Martin, R.L., Morokuma, K., Farkas, O., Foresman, J.B., Fox, D.J., 2016. Gaussian, Inc., Wallingford CT.
- [2] (a) Besler, B.H., Kollman, P.A., and Merz Jr, K.M. (1990). Atomic charges derived from semiempirical methods. *J. Comput. Chem.* 11:431-439. doi:10.1002/jcc.540110404; (b) Singh, U.C., and Kollman, P.A. (1984). An approach to computing electrostatic charges for molecules. *J. Comput. Chem.* 5, 129-145. doi: 10.1002/jcc.540050204.
- [3] Reed, A.E., and Weinhold, F.J. (1983). Natural bond orbital analysis of near-Hartree-Fock water dimer. *J. Chem. Phys.* 78, 4066-4073. doi:10.1063/1.445134.
- [4] Lele, S. S., and Sethna, S. (1956). Iodination of 7-Hydroxy-, and 5-Hydroxy-4-methylcoumarin and Their Methyl Ethers. *J. Org. Chem.* 23(11): 1731-1734. doi:10.1021/jo01105a041.
- [5] Khatir-Hamdi, N., Makhloufi-Chebli, M., Grib, H., Brahimi, M., and Silva, A.M.S. (2019). Synthesis, DFT/TD-DFT theoretical studies and experimental solvatochromic shift methods on determination of ground and excited state dipole moments of 3-(2-hydroxybenzoyl)coumarins. *J. Mol. Struct.* 1175, 811-820. doi: 10.1016/j.molstruc.2018.08.039
- [6] Cossi, M., Rega, N., Scalmani, G., and Barone, V. (2003). Energies, structures, and electronic properties of molecules in solution with the CPCM solvation model. *J. Comput. Chem.* 24 : 669-681. doi:10.1002/jcc.10189.

- [7] Chipem, F.A.S., Mishra,A., and Krishnamoorthy,G.(2012). The role of hydrogen bonding in excited state intramolecular charge transfer .*Phys. Chem. Chem. Phys.* 14: 8775-8790.doi:10.1039/C2CP23879A.
- [8] Cigáň,M., Donovalová,J.,Vojtech Szöcs,V.,Gašpar,J.,Jakusová,K., and Gáplovský,A.(2013).7-(Dimethylamino)coumarin-3-carbaldehyde and Its Phenylsemicarbazone: TICT Excited State Modulation, Fluorescent H-Aggregates, and Preferential Solvation.*J. Phys.Chem.* 117, 4870-4883.doi:10.1021/jp402627a.
- [9] Dahiya,P., Kumbhakar,M., Mukherjee,T., and Pal,H.(2005). Effect of protic solvents on twisted intramolecular charge transfer state formation in coumarin-152 and coumarin-481 dyes.*Chem. Phys. Lett.* 148-154.doi : 10.1016/j.cplett.2005.08.051.
- [10] Satpati, A.S., Kumbhakar,M., Nath,S., and Pal,H.(2009). Photophysical Properties of Coumarin-7 Dye: Role of Twisted Intramolecular Charge Transfer State in High Polarity Protic Solvents.*Photochem. Photobiol.* 85 :119-129.doi :10.1111/j.1751-1097.2008.00405.x.
- [11] Panda,D.,and Datta,A.(2006).The role of the ring nitrogen and the amino group in the solvent dependence of the excited-state dynamics of 3-aminoquinoline .*J. Chem.Phys.* 125: 1-9.doi:10.1063/1.2232199
- [12]Billot,A.,and Kawski,A.(1962).ZurTheorie des Einflusses von Lösungsmitteln auf die Elektronenspektren der Moleküle. *Z. Naturforsch.*17A:621–627.doi:10.1515/zna-1962-0713.
- [13] Kawski,A.(1992). in: *Progress in Photochemistry and Photophysics*, J.R. Rabek(Ed.), CRC, New York, pp. 1–47.
- [14] Kawski,A.,andBojarski,P.(2011).Comments on the determination of excited state dipole moment of molecules using the method of solvatochromism.*Spectrochim. Acta AMol. Biomol. Spectrosc.*82: 527–528.doi:10.1016/j.saa.2011.05.102.
- [15] Mannekutla, J. R.,Mulimani, B. G.,andInamdar, S. R.(2008). Solvent effect on absorption and fluorescence spectra of coumarin laser dyes: Evaluation of ground and excited state dipole moments.*Spectrochim. Acta A*, 69: 419–426.
- [16] Suppan,P.(1983).Excited-state dipole moments from absorption/fluorescence solvatochromic ratios.*Chem. Phys. Lett.* 94 :272–275.doi: 10.1016/0009-2614(83)87086-9
- [17] Ravi,M.,Soujanya,T., Samanta,A., Radhakrishnan, T. P. (1995). Excited-state dipole moments of some Coumarin dyes from a solvatochromic method using the

solvent polarity parameter, E_{NT} . J. Chem. Soc., Faraday Trans. 91:2739-2742.doi:10.1039/FT9959102739.

[18] Ravi,M., Soujanya,T., Samanta,A., and Radhakrishnan, T. P.(1995). Excited-state dipole moments of some Coumarin dyes from a solvatochromic method using the solvent polarity parameter, E_{T}^{N} . J. Chem. Soc., Faraday Trans. 91 2739-2742.doi:10.1039/FT9959102739.

[19] Aligiannis N., Kalpotzakis E., Mitaku S., and Chinou I. B.(2001). Composition and antimicrobial activityof the essential oils of two Origanum species.*J. Agric, Food Chem*, 40, 4168-4170.doi:10.1021/jf001494m.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Conclusion générale

Dans ce travail nous avons synthétisé quelques dérivés de la 4-hydroxy-coumarine en développant des méthodes de synthèse simples rapides et peu coûteuses dans le respect des exigences de la protection de l'environnement. La synthèse assistée par micro-onde s'est révélée bien adaptée à ces exigences. La pureté des produits et leurs propriétés spectroscopiques ont été largement étudiées. Certaines coumarines sont fluorophores et d'intérêt pratique, cette propriété ne nous a pas échappée et nous avons soumis certaines de nos coumarines à une étude spectroscopique (Uv-visible et de fluorescence) avec estimation du moment dipolaire par la méthode solvatochromique et la méthode de simulation théorique.

Un décalage bathochromique est observé lors de la diminution de la polarité du solvant pour les composés **5** et **6**, indiquant une transition $\pi - \pi^*$. Nous avons constaté que les composés possèdent des valeurs de moment dipolaire plus élevées à l'état excité qu'à l'état fondamental et que le moment dipolaire du 3- (2-hydroxybenzoyl) -2H-chromène-2-one **5** était supérieur à celui de **6**. Ceci pourrait être attribué à l'effet intense de résonance électronique du groupe carbonyle à l'état singulet excité. Les interactions entre les systèmes π et les chromophores C = O conduisent à une forte délocalisation de l'état excité qui rend les composés beaucoup plus polaires, ce qui entraîne une plus grande valeur des moments dipolaires.

Les valeurs les plus élevées des moments dipolaires à l'état excité obtenues pour les coumarines **5** et **6** sont également confirmées par des calculs théoriques (B3LYP). La 3- (2-hydroxybenzoyl) -2H-chromène-2-one **5** et la 3- (2-hydroxybenzoyl) -2H-benzo [f] chromène-2-one **6** sont caractérisées par une efficacité de fluorescence modeste, même dans les milieux polaires aprotiques.

Certains dérivés coumariniques appartiennent à des classes thérapeutiques variées il nous a paru intéressant de soumettre nos composés aux tests biologiques actuellement réalisables localement. L'activité antibactérienne a été déterminée sur quatre souches bactériennes, selon la méthode de diffusion de disques, seul le composé **5** possède une activité antimicrobienne contre les souches à Gram positif contrairement aux souches à Gram négatif qui manifeste une résistance pour tous les produits testés.

Le produit **5** qui semblait être actif a fait l'objet de la détermination de la CMI.

L'activité antioxydante de ces composés a été évaluée par la méthode de DPPH.

Les résultats obtenus ont montré que la réduction de DPPH n'est enregistré que pour le composé **7** mais qui reste faible par rapport à la référence utilisée.

L'activité anticancéreuse ou effet cytotoxique des composés a été explorée à l'aide d'une lignée de cellules cancéreuses murine Sp2-0 / Ag14 , en utilisant le test d'exclusion au bleu Trypan .Les composés **6** et **8** ont été les seuls à présenter une activité cytotoxique

Si dans un premier temps nous nous sommes préoccupés de la synthèse dans les conditions préconisées par la "Chimie verte" et nous avons proposé avec succès la synthèse assistée par micro-onde; nous nous sommes heurtés à des difficultés de taille pour le marquage radioactif :

- Comment prédire par exemple l'aptitude d'une molécule au marquage par l'iode radioactif ^{125}I dans les conditions de la substitution électrophile aromatique ?

- Comment produire le moins de déchets radioactifs ?

- Les chimistes expérimentés, quand il s'agit de l'usage de l'iode, conseillent de porter une plus grande attention aux réactions catalysées par cette entité chimique.

C'est tout une stratégie que nous avons développée afin d'apporter des solutions à chacune de ces difficultés.

Pour l'étude de la réactivité des composés **4**, **5** et **6** qui sont des hétérocycles aromatiques nous avons eu recours aux théories quantiques de réactivité qui permettent actuellement d'élaborer des mécanismes réactionnels, des profils énergétiques, de justifier et de prédire les chimiosélectivités. Les nouveaux concepts chimiques et indices de réactivité dérivant de la théorie de la fonctionnelle (DFT) nous ont permis de comparer les réactivités de **4**, **5** et **6** et de prédire leur réactivité vis-à-vis de l'ion iodonium I^+ dans les conditions du mécanisme de substitution électrophile. De toute évidence, à ce stade de notre travail, il ne fallait pas lancer directement le radiomarquage des composés, au risque d'obtenir des composés indésirables dérivant de l'action catalytique de l'iode généré au cours de l'expérience et surtout pour éviter la production des déchets radioactifs.

Il fallait donc entreprendre un protocole de marquage « froid » c'est-à-dire en utilisant l'iode (sous forme de NaI) donc l'iode non radioactif, ce protocole a été adapté aux contraintes d'un marquage radioactif (simplicité, rapidité et rendement efficace). Il a révélé que le produit **4** a été effectivement monoiodé par contre les deux composés **5** et **6** n'ont pas été iodés mais ils ont subi une hétérocyclisation intra-moléculaires pour conduire aux composés **7** et **8** dont les structures ont été amplement justifiées par les analyses spectroscopiques en particulier par l'étude des corrélations des spectres à 2D de la RMN : NOESY et HMBC.

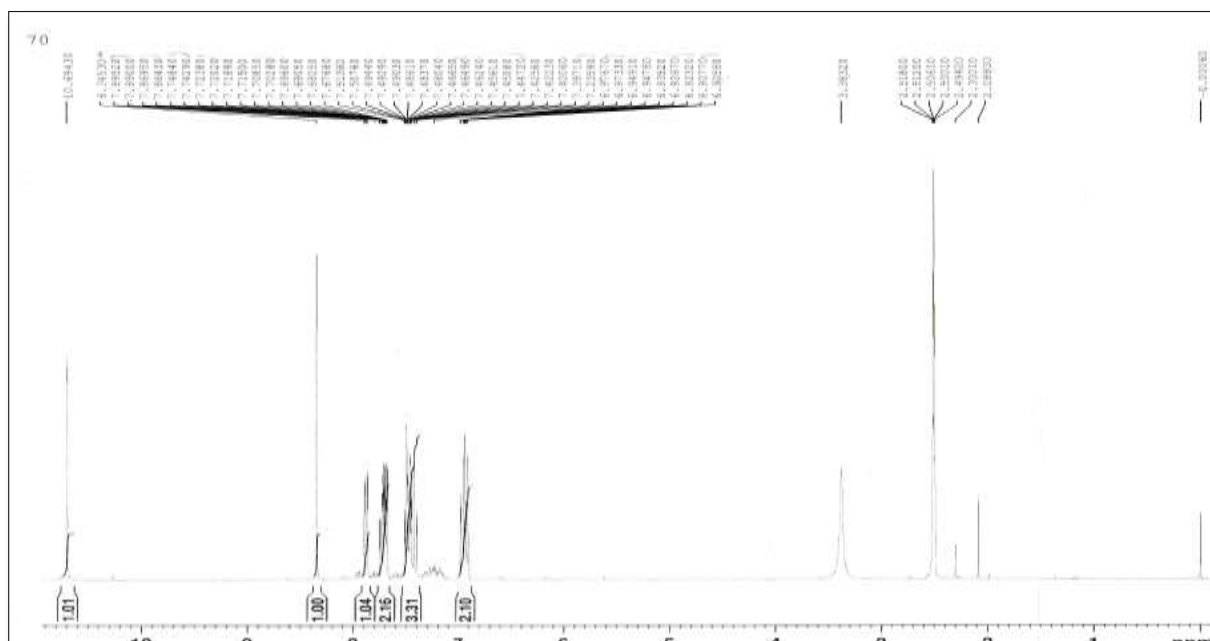
A ce stade, le comportement des composés **5** et **6** est à retenir comme exemple afin de ne pas tenter des expériences de radiomarquage sans les tests préliminaires que nous avons proposés.

A l'issue de ces résultats que nous avons enregistrés au cours de ce travail et des informations relevées dans la littérature nous pouvons conclure que les indices de réactivité locaux et globaux dérivant de la DFT sont fiables pour la prédiction des sites d'attaque électrophiles ou nucléophiles quand on utilise une méthode performante comme la B3LYP. Cette approche théorique conjuguée avec les tests d'iodation à froid s'est révélée une bonne stratégie de radio-iodation économique et respectueuse de l'environnement.

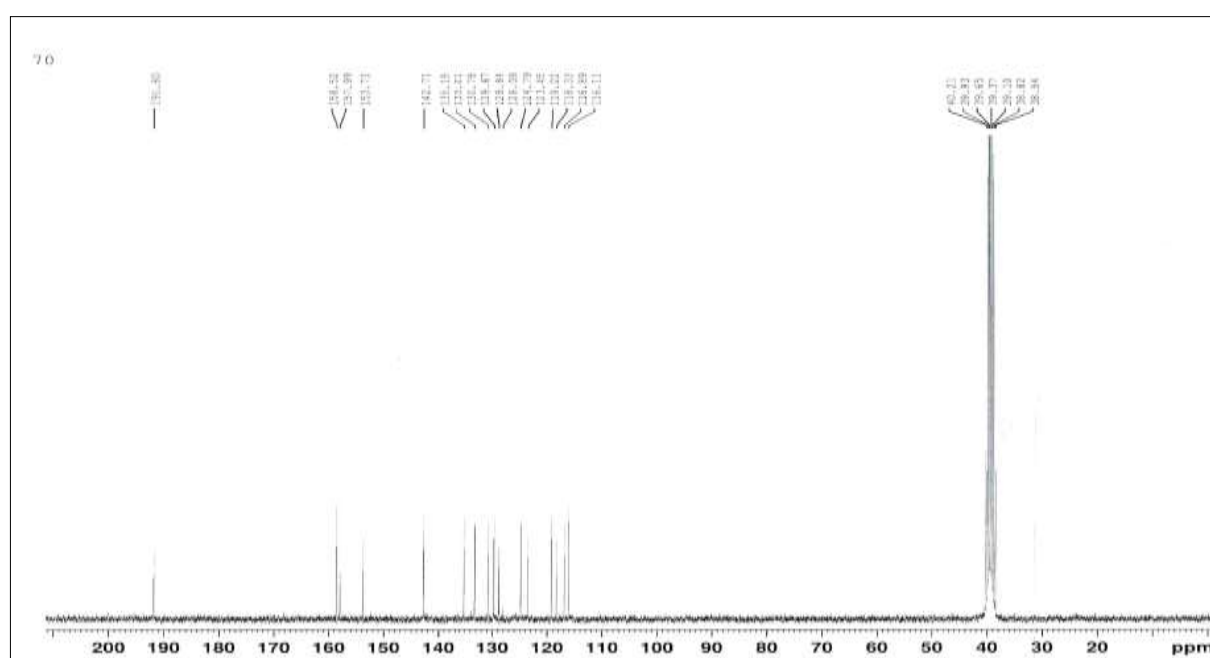
A la suite de cette partie du travail les perspectives envisageables sont:

- a) Application des nouvelles méthodes performantes de la chimie théorique.
- b) Recherche de milieux réactionnels où la réaction d'iodation électrophiles (à froid) est majoritaire.
- c) Utiliser particulièrement les molécules fluorescentes pour le radiomarquage afin de mettre au point de nouvelles sondes.
- d) Étudier l'amélioration des propriétés photochimiques des composés **5** et **6** en particulier par l'utilisation de 2-hydroxyaldéhydes aromatiques diversement substitués.
- e) La modeste étude cytotoxique doit être complétée par une étude sur les cellules cancéreuses humaines qui représentent les cancers humains les plus répons (par exemple : HeLa, HepG2, MCF-7, DLD-1 et SK-N-BE).

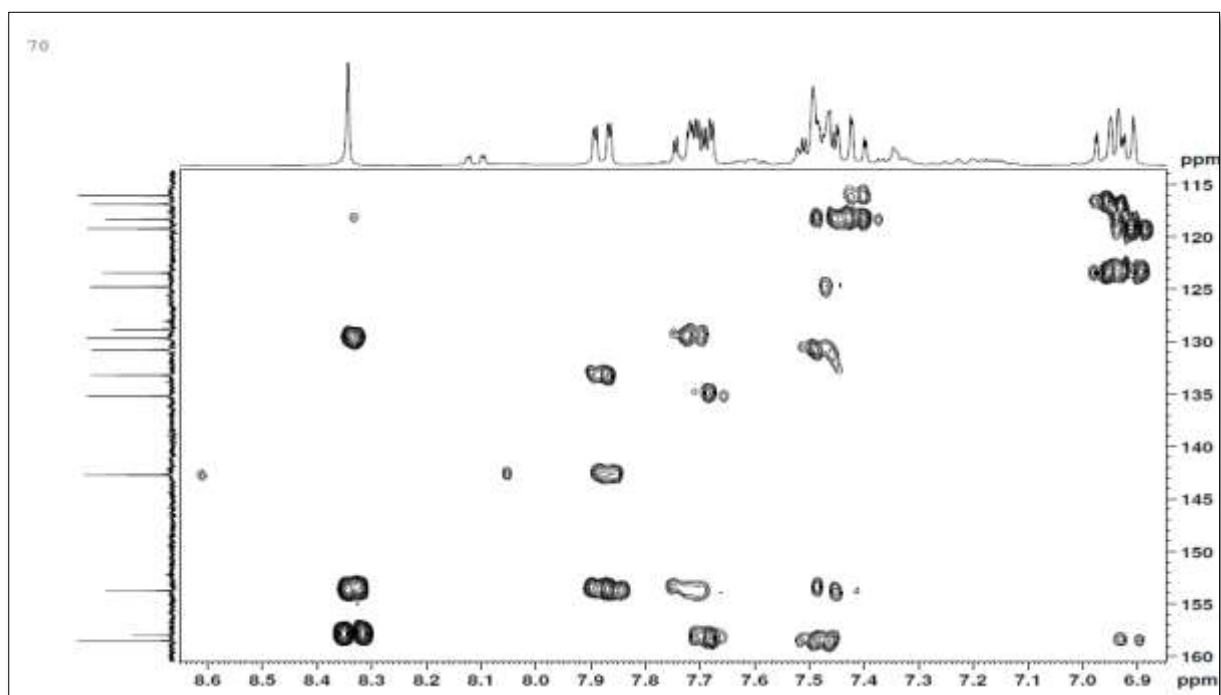
ANNEXE



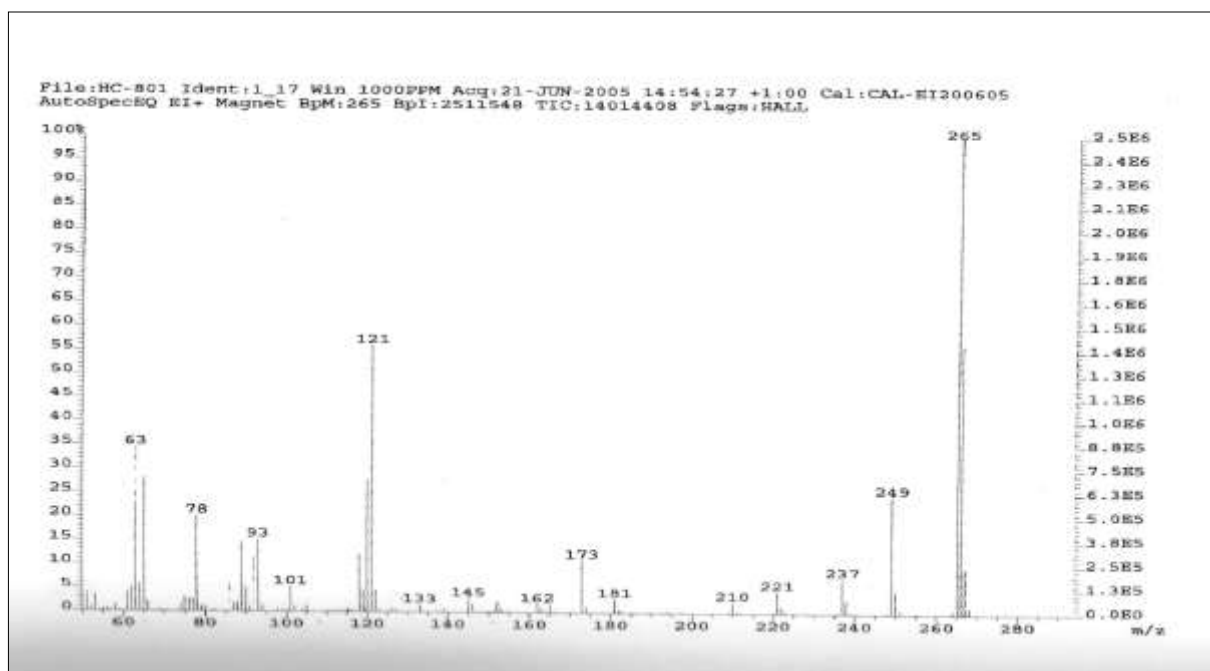
RMN du H1 du produit 5 réalisé dans le DMSO comme solvant et à 300.13 MHz



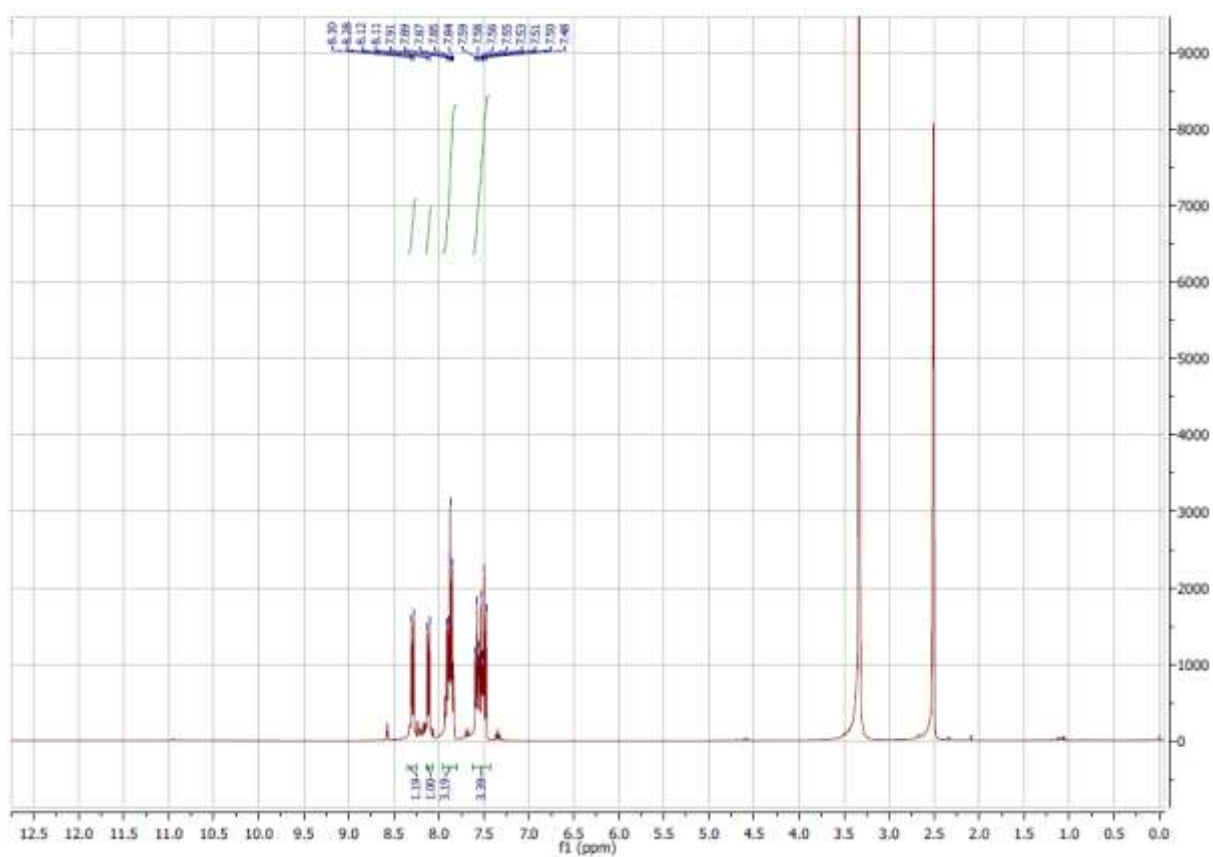
RMN du C13 du composé 5



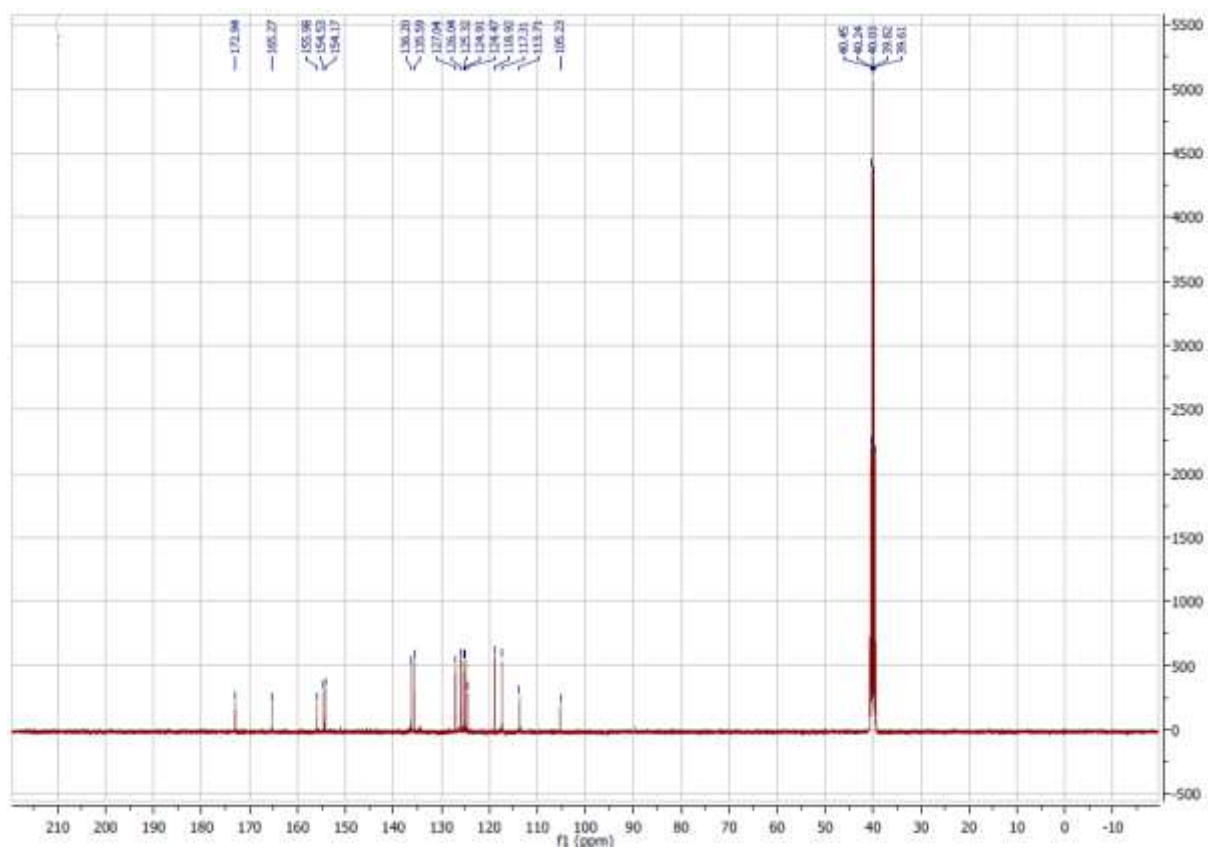
Spectre RMN à 2D HMBC composé 5



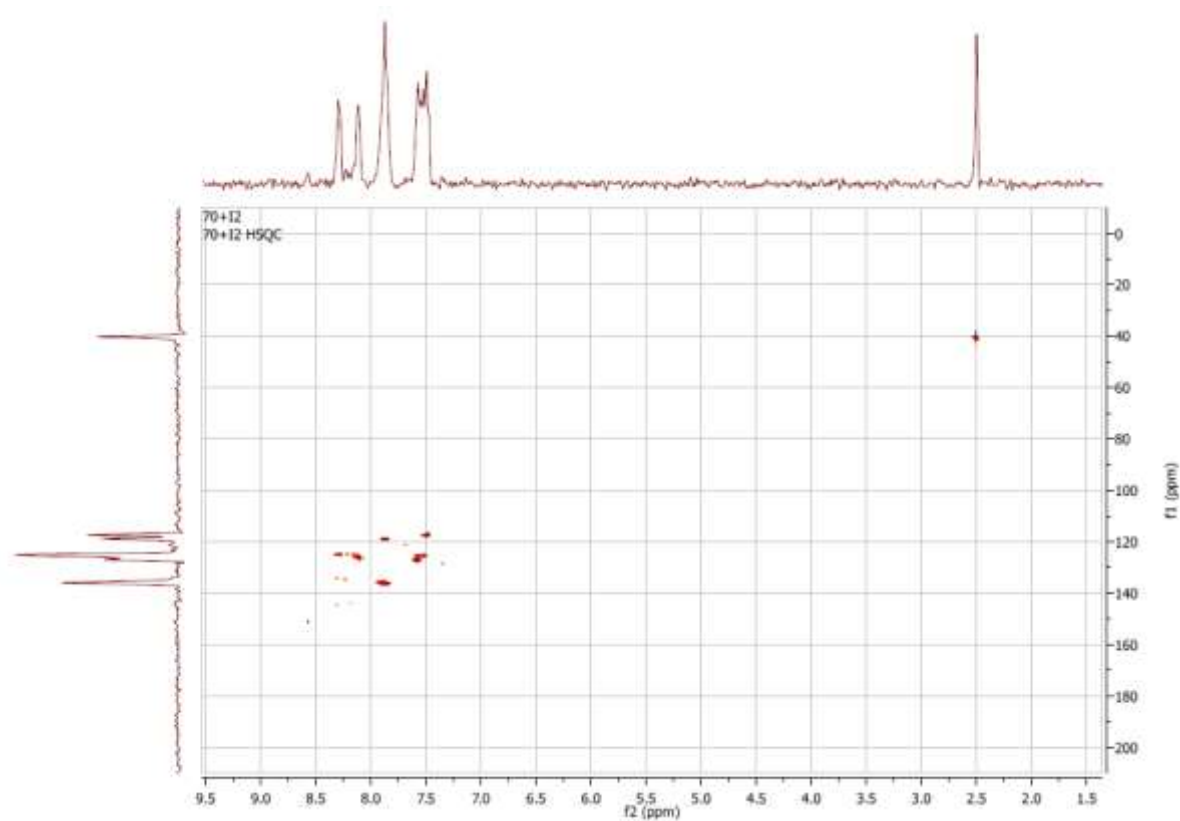
Spectre de masse du composé 5



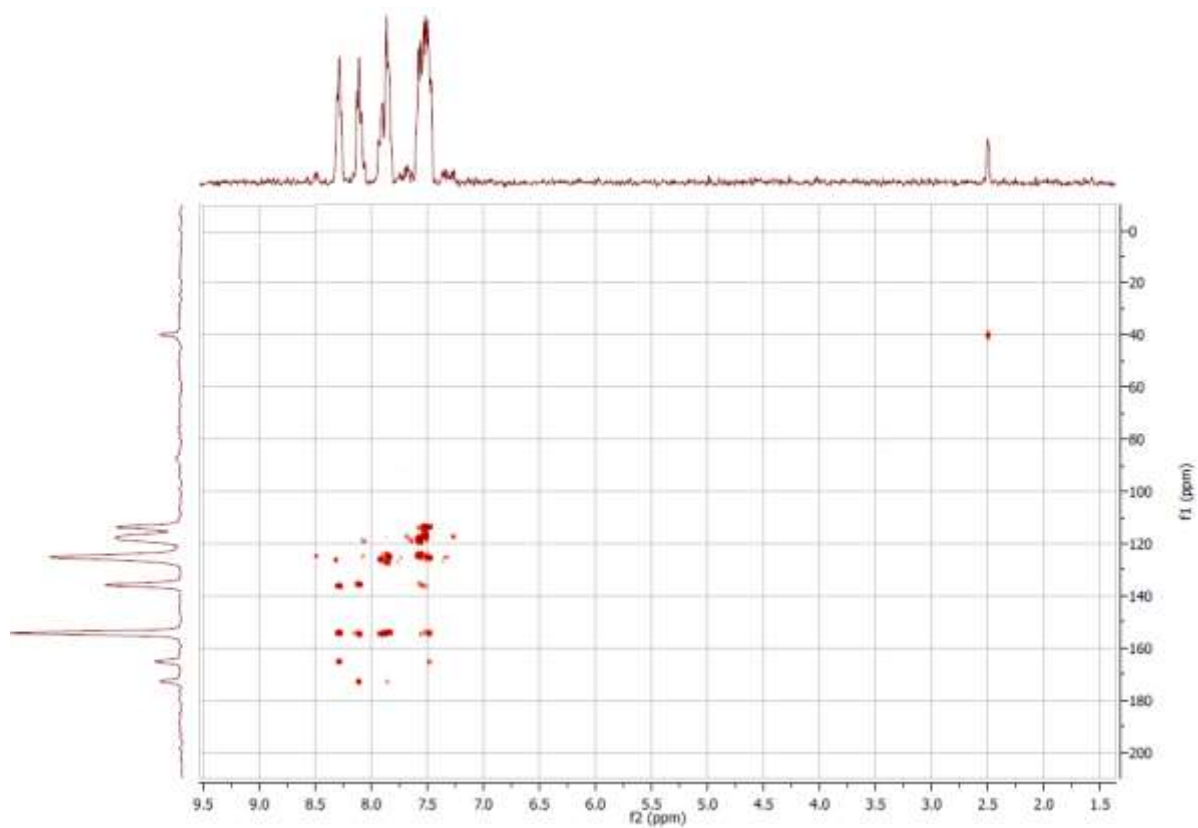
RMN du H1 du produit 5 taité avec I₂ et H₂SO₄ réalisé dans le DMSO comme solvant et à 300.13 MHz



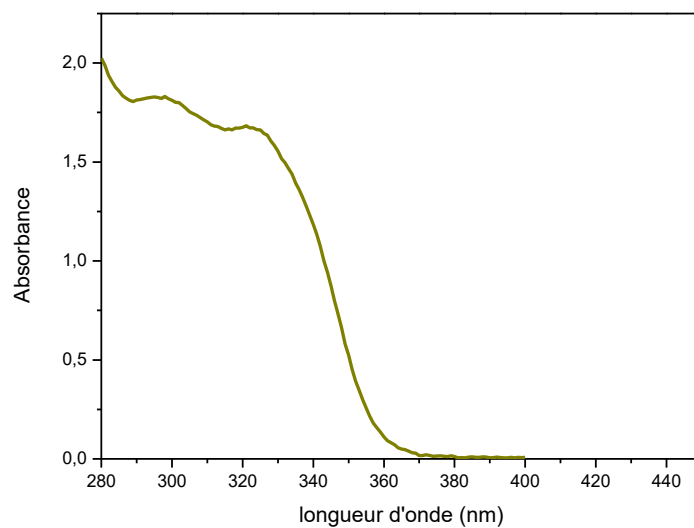
RMN du C13 du produit 5 traité avec I₂ et H₂SO₄ réalisé dans le DMSO comme solvant et à 300.13 MHz



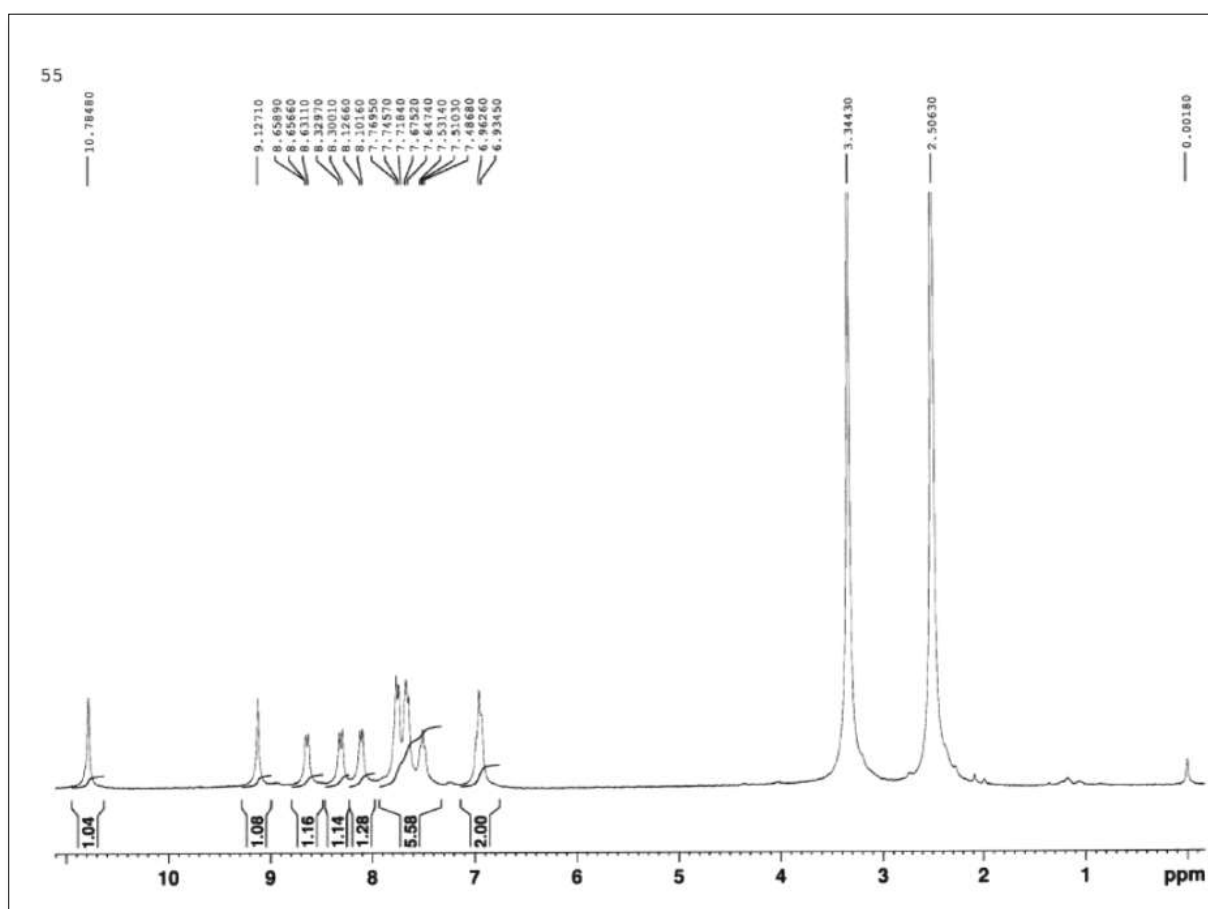
Spectre HSQC du composé 5 traité avec I₂ et H₂SO₄



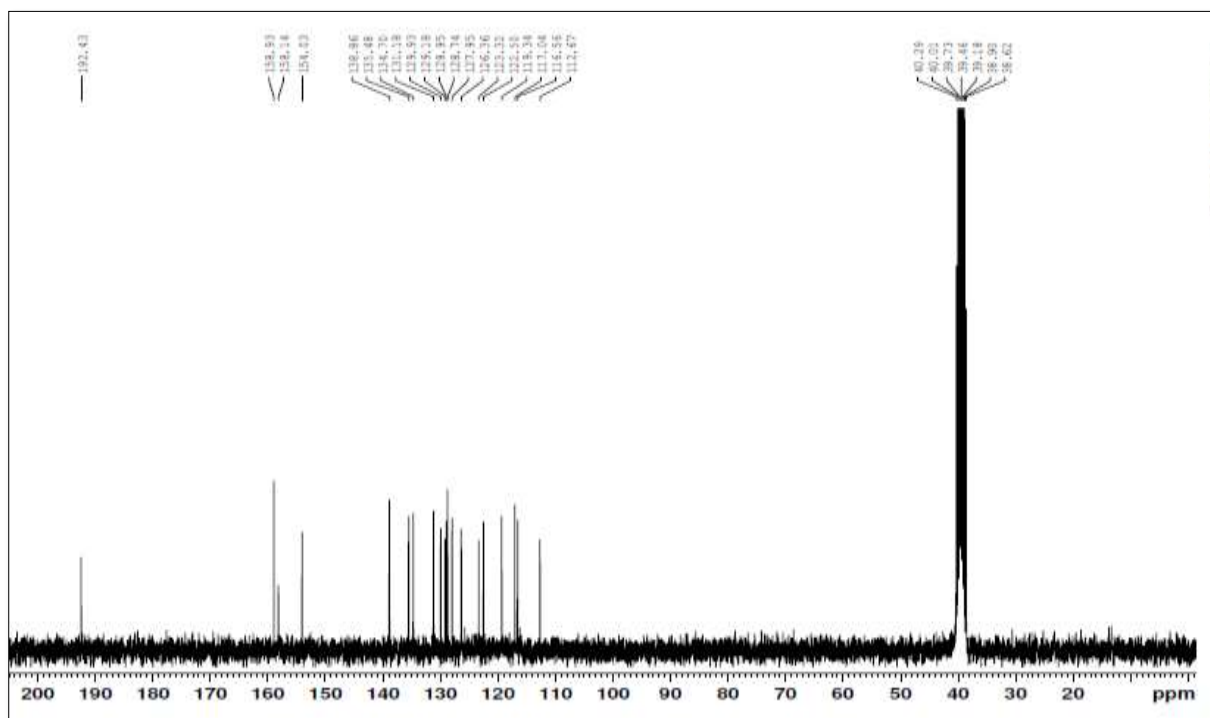
Spectre HMBC du composé 5 traité avec avec I₂ et H₂SO₄



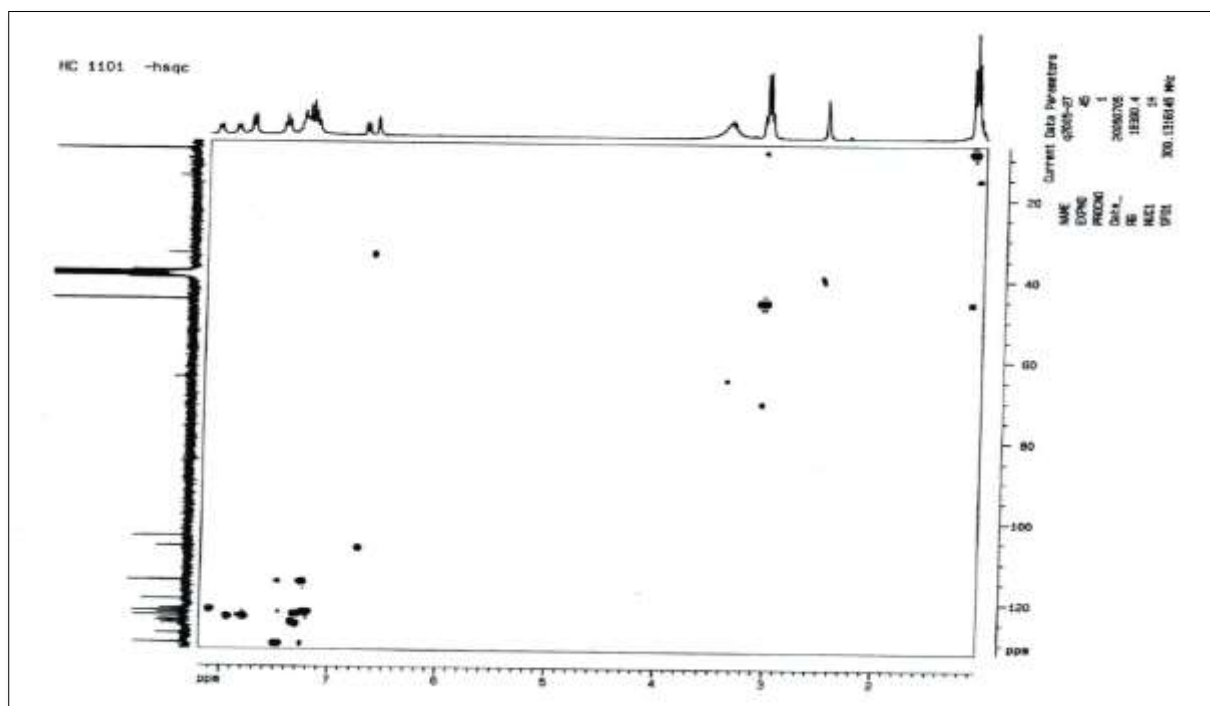
Spectre d'absorbance du composé 5 traité avec I₂ et H₂SO₄ dans le DMSO



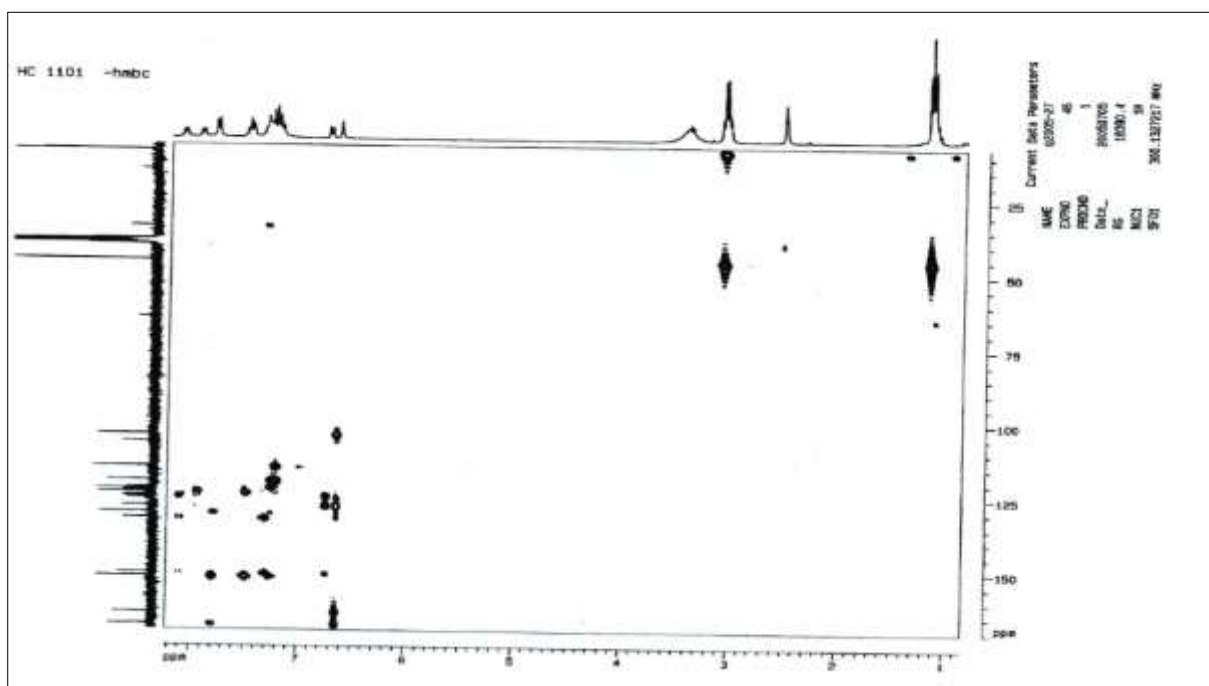
RMN du H1 du produit 6 réalisé dans le DMSO comme solvant et à 300.13 MHz



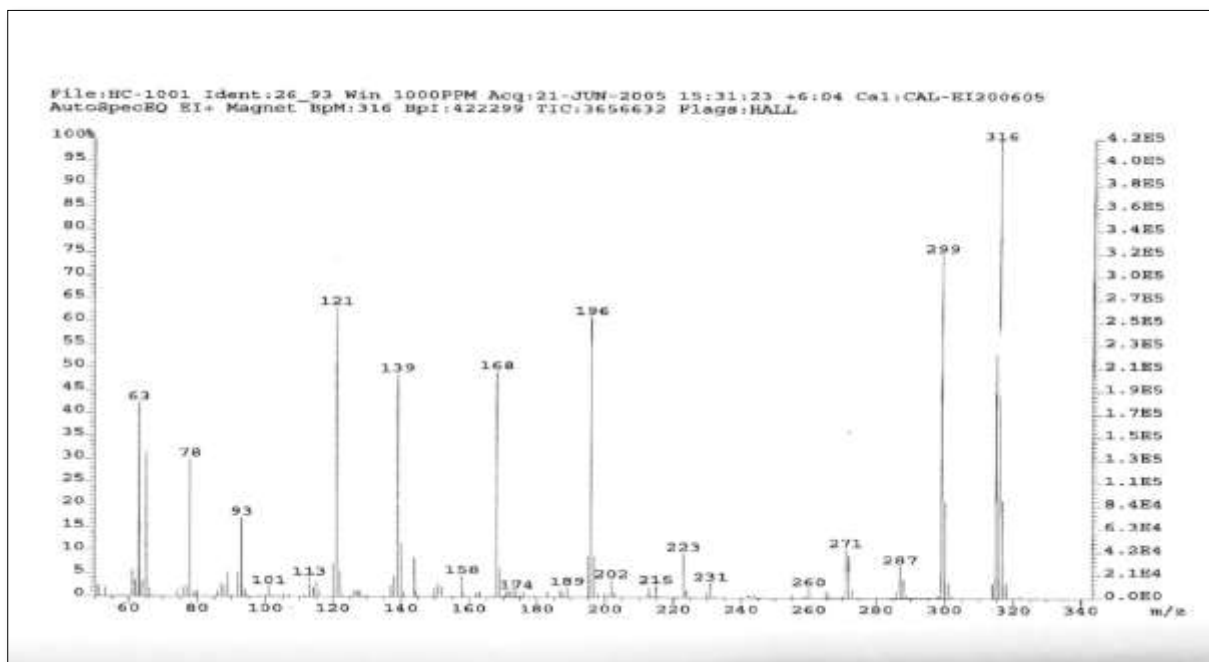
RMN du C13 du composé 6



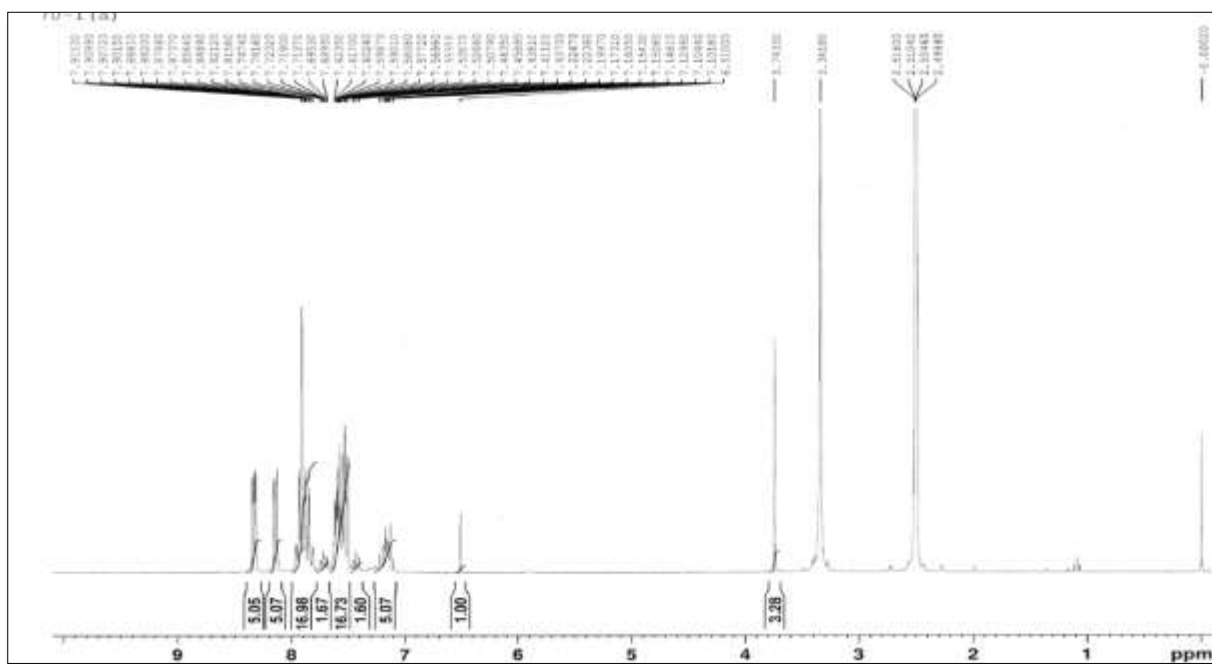
Spectre RMN à 2D HSQC composé 6



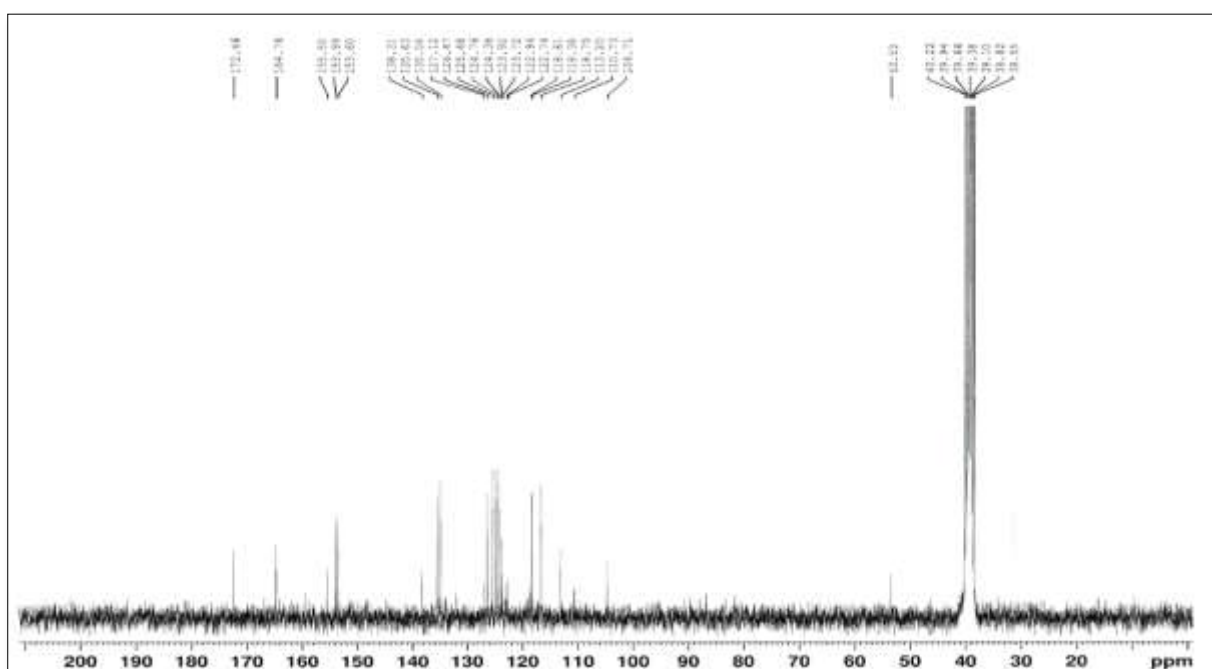
Spectre RMN à 2D HMBC composé 6



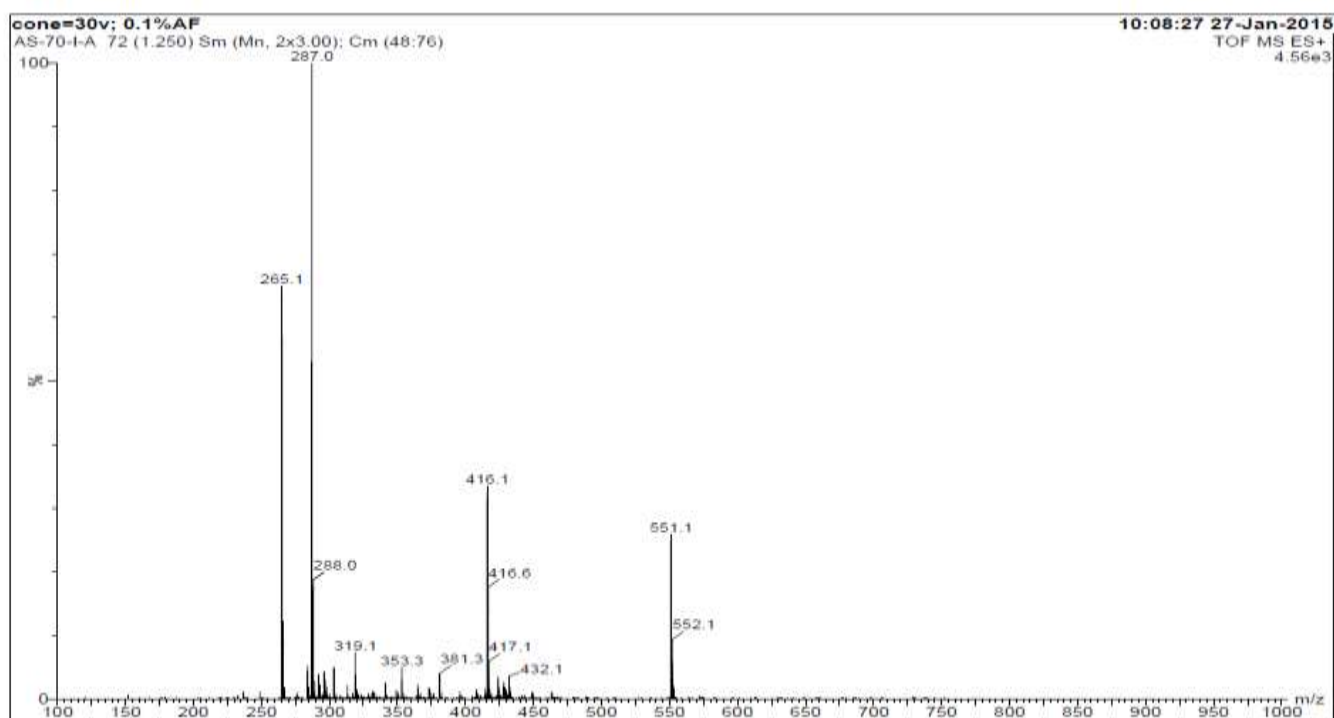
Spectre de masse du composé 6



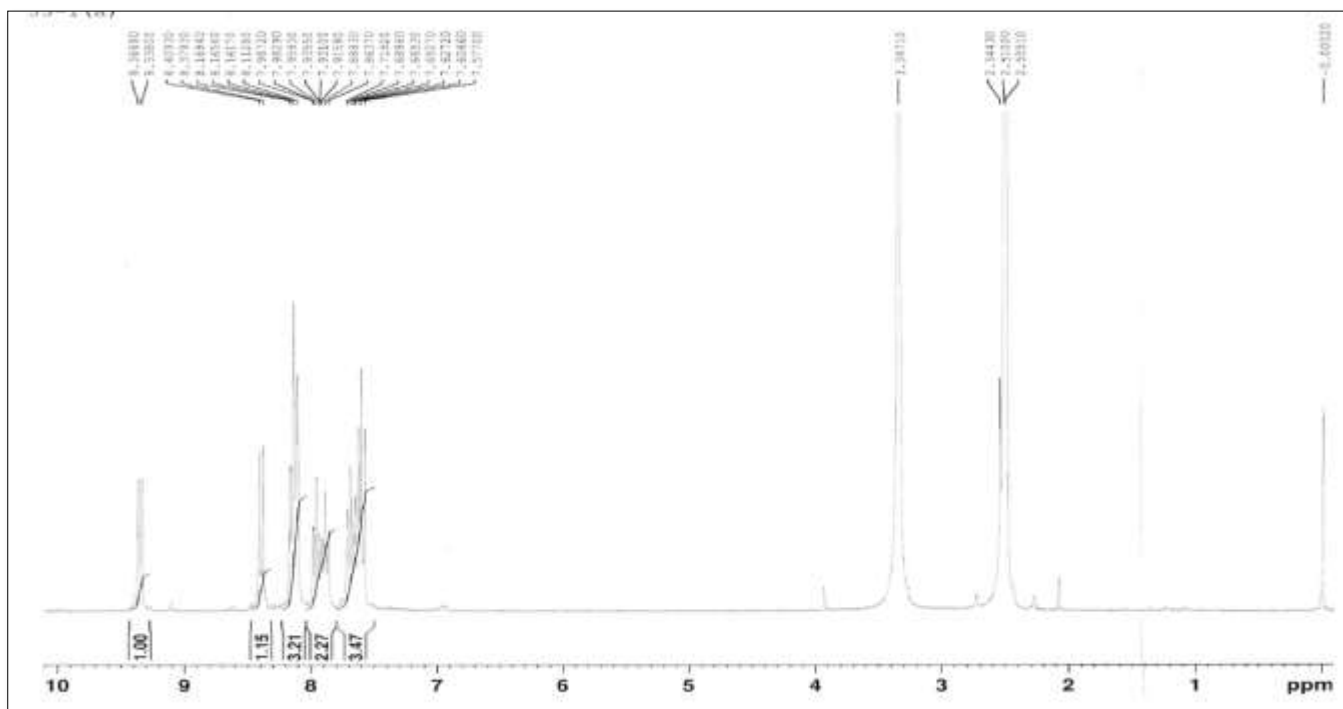
RMN du $\text{H}1$ produit 7 réalisé dans le DMSO comme solvant et à 300.13 MHz



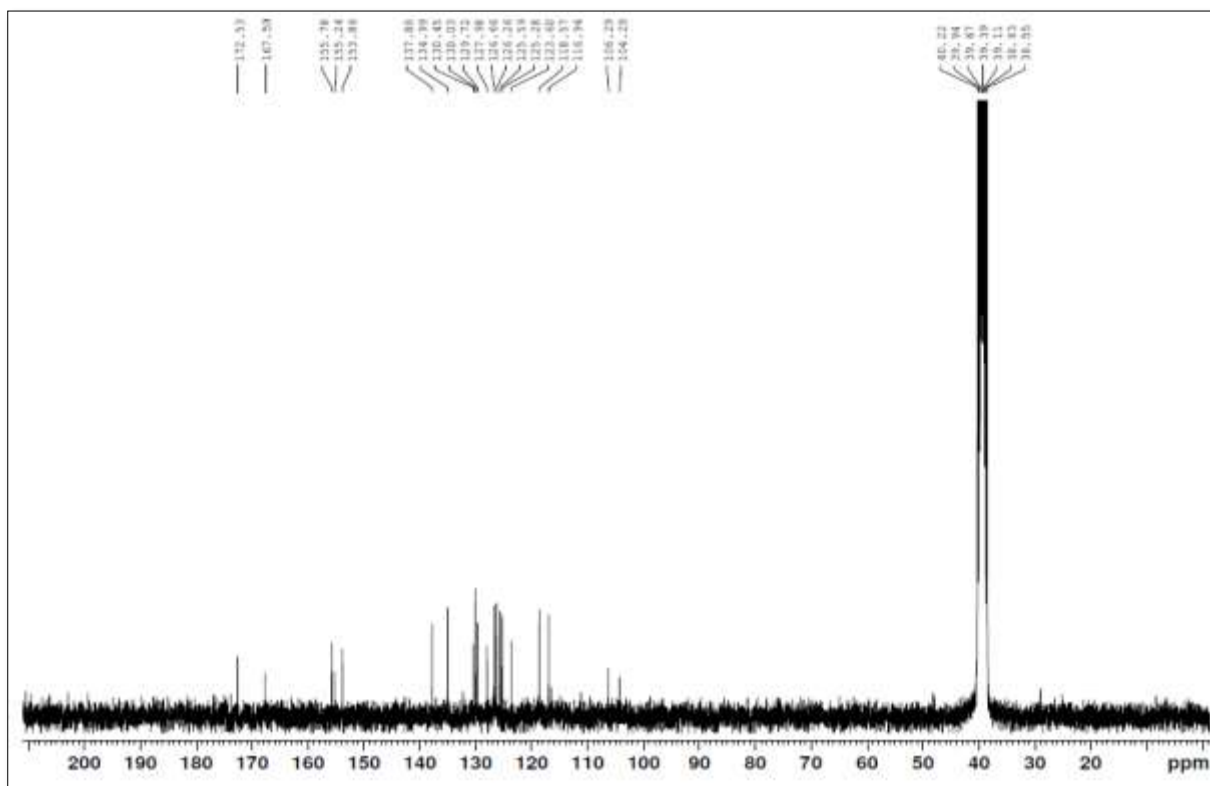
RMN du $\text{C}13$ du composé 7



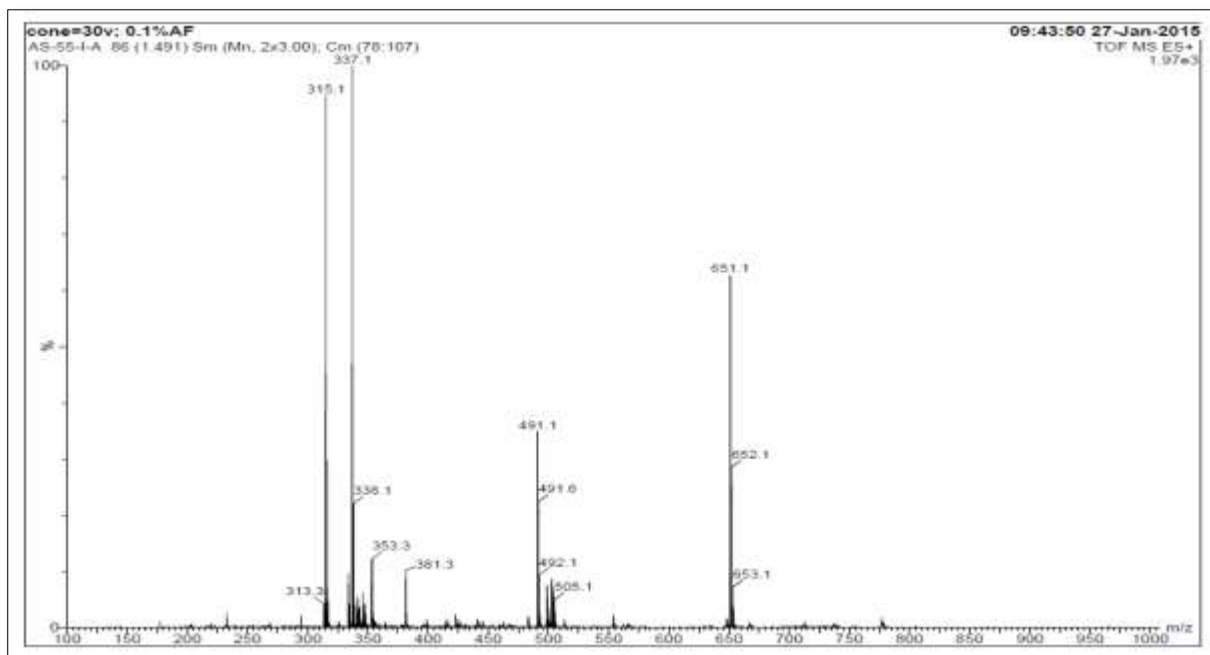
Spectre de masse du composé 7



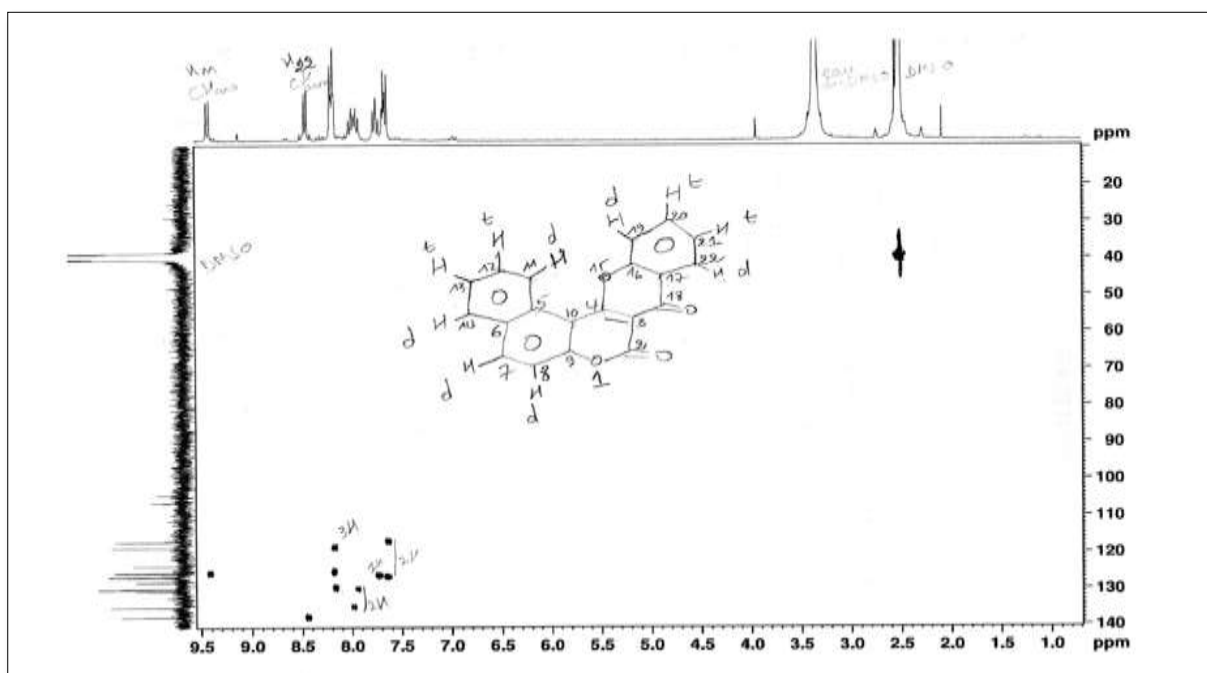
RMN du H1 produit 8 réalisé dans le DMSO comme solvant et à 300.13 MHz



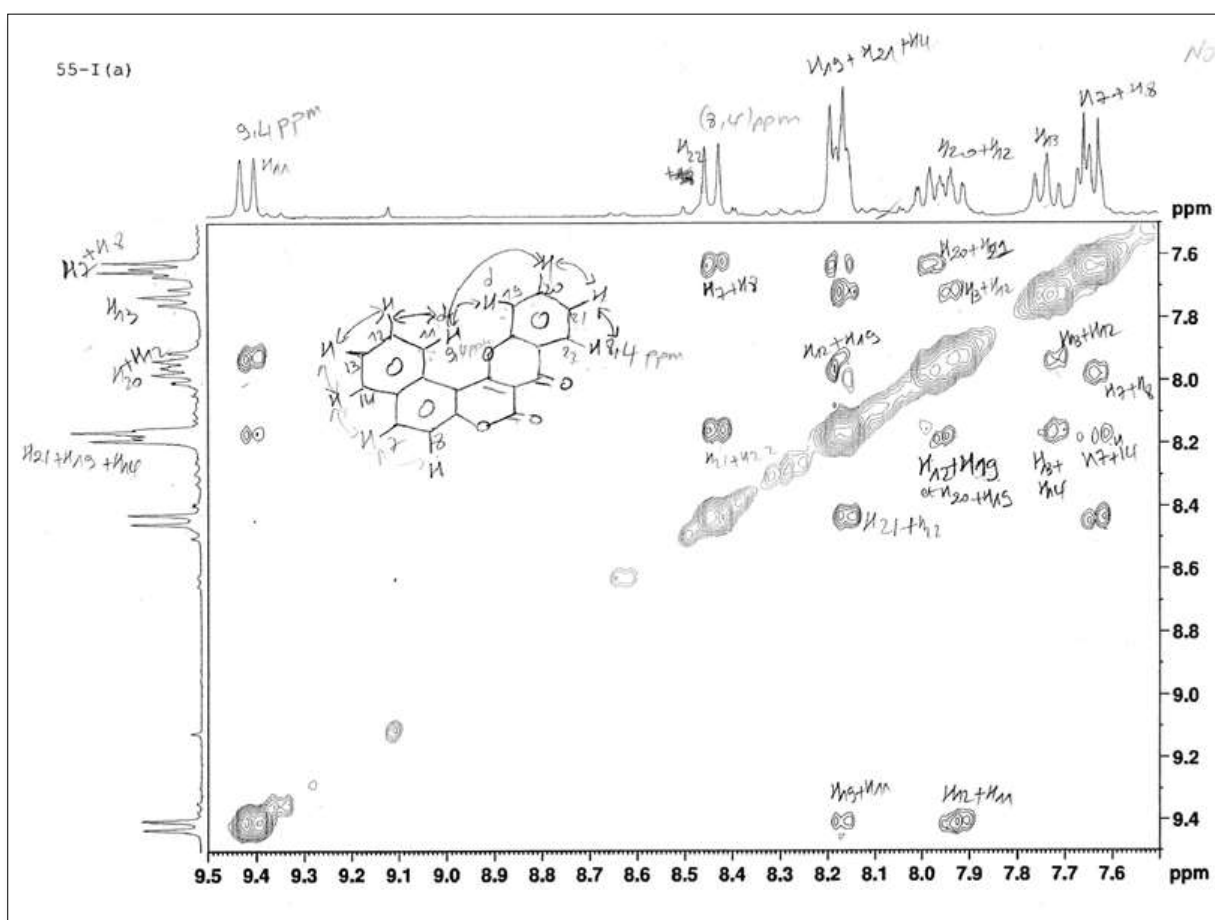
RMN du C13 composé 8



Spectre de masse du composé 8



Spectre HSQC du composé 8



NOESY du composé 8

Calcul de l'activité d'un gramme d'iode 125

A : activité

 λ =constante radioactive

T= période ou demi-vie physique (iode 60 jours)

N=nombre d'atome

 N_A = nombre d'Avogadro

M=masse molaire

$$A = \lambda \times N \quad \lambda = \ln 2 / T$$

$$\lambda = 0.693 / 60 \times 24 \times 3600 = 1.34 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$$

$$m = M \times N / N_A$$

$$N = N_A \times m / M$$

si m=1g

$$N = N_A / M = 6.02 \times 10^{23} / 125 = 4.81 \times 10^{21}$$

donc l'activité d'un gramme d'iode :

$$A = 1.34 \times 10^{-7} \times 4.81 \times 10^{21} = \mathbf{6.44 \times 10^{14} \text{ Bq}}$$

Donc 1g d'iode a une activité de $6.44 \times 10^{14} \text{ Bq}$ Si $A = 1.85 \times 10^7 \text{ Bq}$ ou 0.5mCi donc la quantité en gramme d'iode = $2.872 \times 10^{-8} \text{ g}$

En mole :

$$1 \text{ mole} \longrightarrow 125 \text{ g}$$

$$X \longrightarrow 2.872 \times 10^{-8}$$

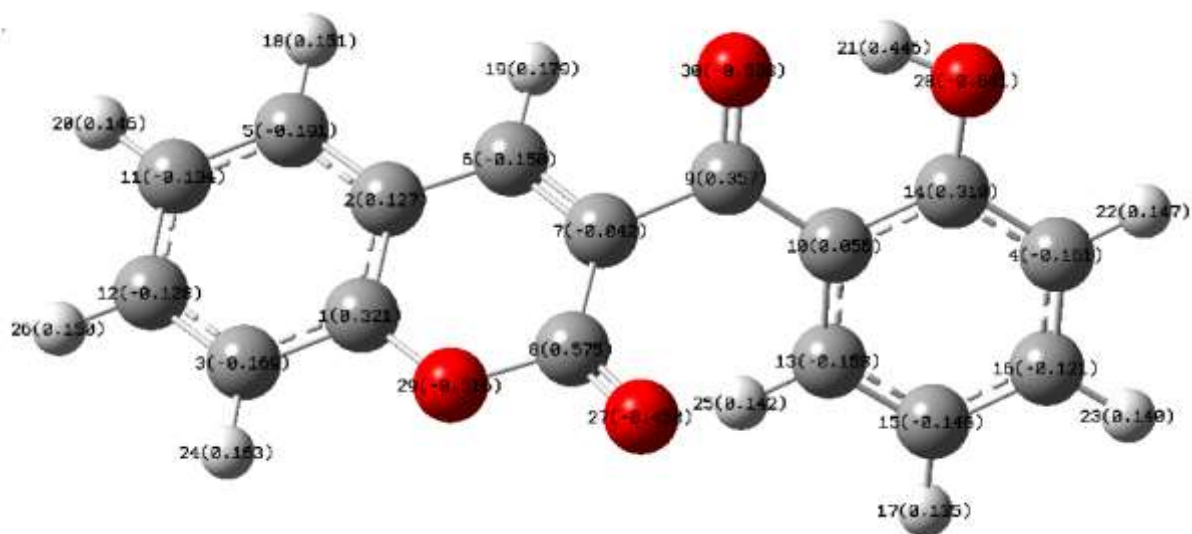
$$\mathbf{X = 2.3 \times 10^{-10} \text{ mole ou } 0.23 \times 10^{-11} \text{ mole}}$$

Ratio de mole :

$$\text{Composé 4} = 2 \times 10^{-6} \text{ mole}$$

$$\text{Iode 125} = 0.23 \text{ nmole}$$

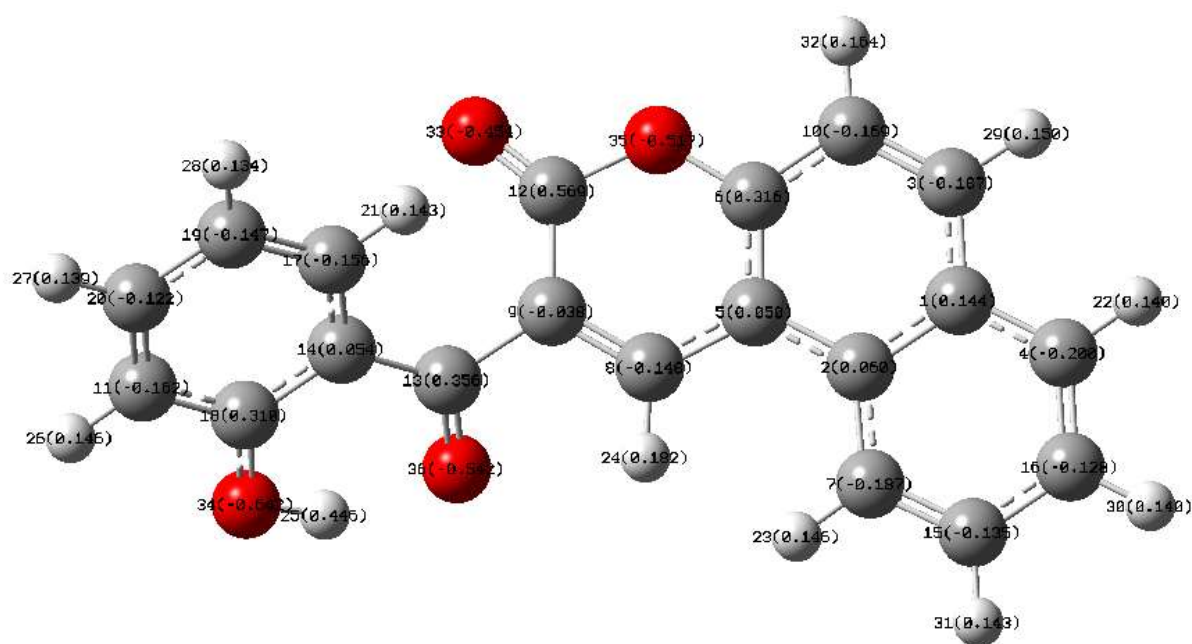
$$\text{Ratio} = \text{n.de mole du composé 4} / \text{n.nombre de mole d'iode} = 1 : 0.000115$$



Mulliken charges (MPA) representation of 5a in gas-phase

Mulliken atomic charges:5a gas-phase

1	C	0.321491
2	C	0.126688
3	C	-0.169171
4	C	-0.161497
5	C	-0.190714
6	C	-0.149539
7	C	-0.041780
8	C	0.574905
9	C	0.357266
10	C	0.055538
11	C	-0.133701
12	C	-0.128435
13	C	-0.157776
14	C	0.310483
15	C	-0.146365
16	C	-0.121468
17	H	0.134970
18	H	0.150592
19	H	0.178536
20	H	0.145689
21	H	0.446378
22	H	0.146677
23	H	0.140347
24	H	0.162637
25	H	0.142160
26	H	0.150214
27	O	-0.450132
28	O	-0.640617
29	O	-0.515796
30	O	-0.537581

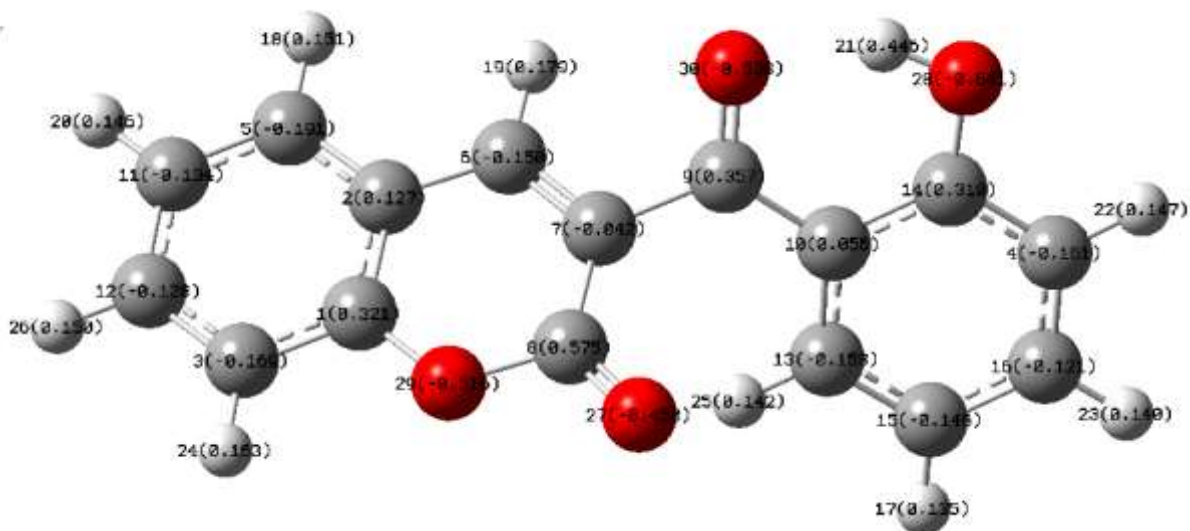


Mulliken charge (MPA) representation of 6a in gas-phase.

Mulliken atomic charges: 6a gas-phase

1	C	0.144233
2	C	0.059980
3	C	-0.187487
4	C	-0.199770
5	C	0.049511
6	C	0.315986
7	C	-0.186568
8	C	-0.147861
9	C	-0.038364
10	C	-0.168682
11	C	-0.161888
12	C	0.569118
13	C	0.355887
14	C	0.054274
15	C	-0.135280
16	C	-0.127725
17	C	-0.156173
18	C	0.309629
19	C	-0.146984
20	C	-0.121521
21	H	0.142713
22	H	0.140072
23	H	0.146201
24	H	0.182384
25	H	0.446113
26	H	0.145732
27	H	0.139430
28	H	0.134216
29	H	0.149817
30	H	0.140492
31	H	0.142536
32	H	0.164055
33	O	-0.454201
34	O	-0.641518

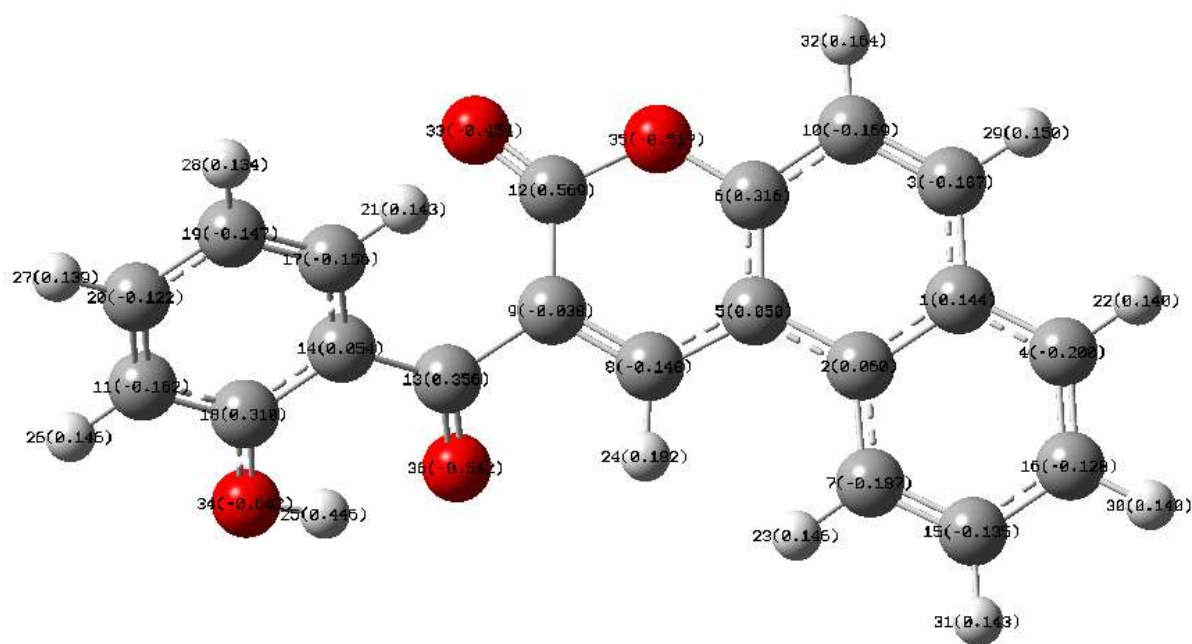
35 O -0.516688
36 O -0.541669



Mulliken charge (MPA) of 5a in DMSO.

Mulliken atomic charges: 5a DMSO

1	C	0.325733
2	C	0.119940
3	C	-0.177684
4	C	-0.175514
5	C	-0.194534
6	C	-0.139871
7	C	-0.041662
8	C	0.585529
9	C	0.363858
10	C	0.048392
11	C	-0.143514
12	C	-0.134869
13	C	-0.176077
14	C	0.306531
15	C	-0.160627
16	C	-0.131330
17	H	0.154540
18	H	0.173805
19	H	0.195781
20	H	0.165402
21	H	0.447730
22	H	0.156042
23	H	0.162394
24	H	0.172902
25	H	0.160928
26	H	0.170879
27	O	-0.496499
28	O	-0.660278
29	O	-0.526408
30	O	-0.553741

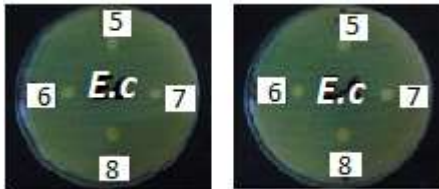


Mulliken charge representation of 6a DMSO.

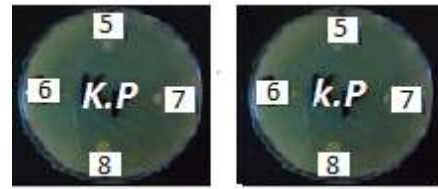
Mulliken atomic charges: 6a DMSO

1		
1	C	0.133455
2	C	0.056378
3	C	-0.190086
4	C	-0.209157
5	C	0.049762
6	C	0.323216
7	C	-0.198346
8	C	-0.140336
9	C	-0.038065
10	C	-0.176736
11	C	-0.176048
12	C	0.578580
13	C	0.362388
14	C	0.046872
15	C	-0.146377
16	C	-0.139528
17	C	-0.174863
18	C	0.305669
19	C	-0.161365
20	C	-0.131585
21	H	0.160768
22	H	0.161221
23	H	0.163556
24	H	0.196431
25	H	0.447600
26	H	0.155492
27	H	0.161857
28	H	0.153943
29	H	0.174861
30	H	0.157406
31	H	0.159157
32	H	0.175733
33	O	-0.500336
34	O	-0.661071

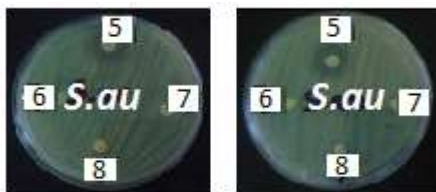
35 O -0.526526
36 O -0.557055



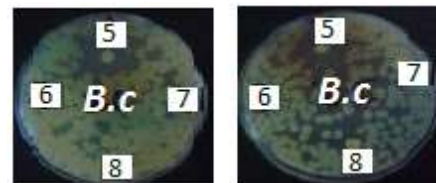
Escherichia coli
ATCC25922



Klebsiella pneumoniae
ATCC700603

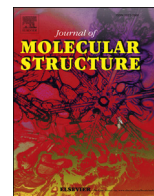


Staphylococcus aureus
ATCC43300



Bacillus cereus
ATCC10876

Effet des produits testés sur les souches bactériennes.



Synthesis DFT/TD-DFT theoretical studies and experimental solvatochromic shift methods on determination of ground and excited state dipole moments of 3-(2-hydroxybenzoyl) coumarins

Nejla Khatir–Hamdi ^{a, b}, Malika Makhloufi-Chebli ^{c, d, *}, Hocine Grib ^{b, **},
Meziane Brahimi ^e, Artur M.S. Silva ^{f, ***}

^a Centre de Recherche Nucléaire de Draria (CRND), BP 43, Sebala, Draria, Algeria

^b Département du Génie de l'Environnement, École Nationale Polytechnique, 10 Avenue des Frères Ouadek, Hassen badi, BP 182 El Harrach, Algiers, 16200, Algeria

^c Laboratoire de Physique et Chimie des Matériaux LPCM, Faculté des Sciences, Université Mouloud Mammeri, 15000, Tizi Ouzou, Algeria

^d Laboratoire de Chimie Organique Appliquée (Groupe Hétérocycles), Faculté de Chimie, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediène, BP32, El-Alia, 16111, Bab-Ezzouar, Algiers, Algeria

^e Laboratoire de Physico chimie Théorique et Chimie Informatique (LPCTCT), Faculté de Chimie, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediène USTHB, BP32, El-Alia, 16111, Bab-Ezzouar, Algiers, Algeria

^f QOPNA, Department of Chemistry, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 April 2018

Received in revised form

9 August 2018

Accepted 11 August 2018

Available online 16 August 2018

Keywords:

3-(2-Hydroxybenzoyl)coumarins

Dipole moment

Solvatochromic method

Theoretical calculation

ABSTRACT

Solvatochromic behaviour of two 3-(2-hydroxybenzoyl) coumarins **3** and **4** has been studied in different solvents at room temperature. Both derivatives show emission at 371 nm and 422 nm with large Stokes shift of 45 and 74 nm, respectively. Higher values of dipole moment have been observed for excited state compared to the corresponding ground state values, indicating an intramolecular charge-transfer (ICT). The electronic structural and spectroscopic properties of **3** and **4** in gas and in different solvents were calculated by the conductor-like polarizable continuum model (CPCM) and have been investigated by DFT/TD-DFT calculations to account for solute-solvent interaction. Excitation energies and oscillator strengths were calculated and HOMO-LUMO levels have been investigated in gas and solvent phases. The comparison of the atomic charge distributions in the ground and excited states of both **3a** and **4a** rotamers implies also the intramolecular charge transfer (ICT) process during the excitation period.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The effect of solvent on the absorption and fluorescence characteristics of organic compounds has been a subject of several research works [1–5]. Photon excitation molecule causes a redistribution of charges leading to conformational changes in the excited state. This can result in the dipole moment change of the excited state compared to the ground state. The dipole moment of an electronically excited molecule is an important property that

provides information on their electronic and geometrical structure in the short-lived state. All the methods available so far for the singlet excited-state dipole moment determination are based on the spectral shift caused either externally by electrochromism or internally by solvatochromism. The solvent effect can be evaluated by the solvatochromic polarity scale [6,7], which is based on the shift of absorption and fluorescence maxima in solvents of varying polarity. Extensive experimental and theoretical studies on ground (μ_g) and excited (μ_e) states dipole moments using different techniques in a variety of organic fluorescent compounds like coumarins, indoles, purines, fluoresceins and in some laser dyes have been reported [8–19].

Coumarins are an establish family of dyes that are applicable in different fields of science and technology. They exhibit strong fluorescence in the UV–vis region, making them suitable to be used as colorants, dye laser media, and as nonlinear optical

* Corresponding author. Laboratoire de Physique et Chimie des Matériaux LPCM, Faculté des Sciences, Université Mouloud Mammeri, 15000, Tizi Ouzou, Algeria.

** Corresponding author.

*** Corresponding author.

E-mail addresses: makhloufi_malika@yahoo.fr (M. Makhloufi-Chebli), gribhocine@yahoo.fr (H. Grib), artur.silva@ua.pt (A.M.S. Silva).

chromospheres. Herein, we report on the solvent effects in the absorption and emission spectra, and estimation of ground and excited-states dipole moments of 3-(2-hydroxybenzoyl)-coumarins **3** and **4** (Fig. 1) using the solvatochromic shift method and theoretical studies on the ground state (μ_g) dipole moments using density functional theory (DFT and TD-DFT) with B3LYP functional and 6-31G(d) basis set [20]. There are no reports on determination of μ_g and μ_e values of **3** and **4**. We assumed that in **4** the presence of the benzo ring fused to the coumarin core could lead to photophysical properties different from those of **3** and eventually more interesting.

2. Experimental

2.1. Apparatus

For synthesis, the multimode microwave reactor (a modified microwave oven candy mga20 m) has a single magnetron (2450 MHz) with a maximum delivered power of 800 W. It was directly graduated in W (from 100 to 800 W). Experiments were carried out in a Pyrex reactor fitted with a condenser. During experiments, time, temperature and power were monitored. Temperature was monitored with the aid of an external infra-red IR thermometer (Flashpoint FZ400).

Melting points were determined on a Stuart scientific SPM3 apparatus fitted with a microscope and are uncorrected. IR spectrum was recorded on a BRUKER TENSOR 27 IR spectrometer. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded in DMSO- d_6 solutions on Bruker Avance 300 (300.13 MHz for ^1H and 75.47 MHz for ^{13}C) spectrometers. Chemical shifts are reported in parts per million (δ , ppm) using TMS as internal reference. ^{13}C assignments were made using HSQC, and HMBC (delays for one bond and long-range $J_{\text{C/H}}$ coupling were optimized for 145 and 7 Hz, respectively). Mass spectra were recorded on a Nermag R10-10C quadrupole mass spectrometer at 70 eV.

All spectrophotometric measurements were conducted at ambient temperature. UV–vis absorption spectra were recorded on a JENWAY 6800 spectrophotometer. The estimated experimental error was 2 nm on the band maximum and 5% on the molar extinction coefficient. Fluorescence work was performed on a JASCO-FP 8200 spectrofluorometer and the data were analysed by related software. Linear fit was done by using Origin 8.0 software. Density of the probe molecule was extracted from ACD/Chem Sketch software. The excitation source was a long life Xenon flash lamp. The fluorescence quantum yields were determined using fluorescein disodium salt ($\Phi = 0.9$, in water) as standard and were determined using the classical formula:

$$\Phi_x = \left(\Phi_s A_s F_x n_x^2 \right) / \left(A_x F_s n_s^2 \right)$$

where A is absorbance at the excitation wavelength, F the area under the fluorescence curve and n is the refractive index of the solvents used. Subscripts s and x refer to the standard and to the sample of unknown quantum yield, respectively.

2.2. Materials

Coumarins, 3-(2-hydroxybenzoyl)-2H-chromen-2-one **3** and 3-



Fig. 1. Chemical structure of **3** and **4**.

(2-hydroxybenzoyl)-2H-benzo [f]chromen-2-one **4** were synthesized in our laboratory as reported in the literature [21,22]. Their molecular structure and purity was confirmed by NMR spectroscopy (^1H , ^{13}C , hmbc, hsqc and noesy) and mass spectrometry. The solvents used in the present study, namely dimethylsulfoxide, acetonitrile, *N,N*-dimethylformamide, chloroform, ethyl acetate and dichloromethane were of HPLC and spectroscopic grade (purchased from Sigma -Aldrich-France). The required solutions were prepared at a fixed solute concentration (5×10^{-5} M).

2.3. General procedure for the synthesis of 3-(2-hydroxybenzoyl)-2H-chromen-2-one (**3**) and 3-(2-hydroxybenzoyl)-2H-benzo[f]chromen-2-one (**4**)

A mixture of 4-hydroxy-2H-chromen-2-one **1** (1.62 g, 0.01 mol), 0.01 mol of salicylaldehyde (or 2-hydroxynaphthaldehyde) **2** and 300 μl of triethylamine as catalyst was well mixed in 20 ml of methanol. These reaction mixtures were irradiated in a domestic microwave at 100 W for 1 min, and 3 cycles were performed at 450 W for 5 min. The yellow residue formed for both **3** and **4** were filtered and washed with hot ethanol. After drying the yellow powders were recrystallized from methanol (Scheme 1).

2.3.1. 3-(2-hydroxybenzoyl)-2H-chromen-2-one (**3**)

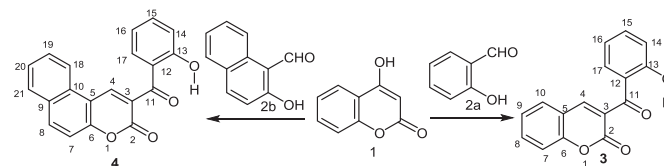
Yellow powder, Yield 76.31%; mp 175–177 °C; I.R ν (cm^{-1}) 3403 (OH), 1716 (O=C–O); ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 6.90 (s, 1H, H-4), 6.92 (t, 1H, H-18), 7.32 (t, 1H, H-17), 7.42 (t, 1H, H-9), 7.50 (d, 1H, H-10), 7.68 (d, 1H, H-7), 7.69 (t, 1H, H-8), 7.86 (d, 1H, H-16), 8.34 (d, 1H, H-19), 10.69 (s, 1H, OH); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 116.1 (C-7), 116.9 (C-5), 118.3 (C-14), 119.2 (C-16), 123.4 (C-12), 124.8 (C-9), 128.1 (C-17), 128.8 (C-10), 129.7 (C-3), 130.8 (C-8), 133.2 (C-15), 135.2 (C-4), 142.7 (C-6), 153.7 (C-2), 158.5 (C-13), 191.8 (C-11); ms (EI): m/z (% relative intensity) 266 (M^+ ; 59), 265 (100), 221 (6), 173 (23), 145 (4), 121 (72), 120 (73), 101 (19), 93 (13). Elemental analysis: Calculated for $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{O}_4$: C 72.18; H 3.79; Found: C 72.02; H 3.60.

2.3.2. 3-(2-hydroxybenzoyl)-2H-benzo[f]chromen-2-one (**4**)

Yellow powder, Yield 48.66%; mp 264–265 °C; I.R ν (cm^{-1}) 3486 (OH), 1571 (C=C-aromatic); ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 9.13 (s, 1H, H-4), 6.93 (d, 2H, H-10, H-13), 7.49 (t, 2H, H-11, H-12), 7.72 (t, 2H, H-21, H-22), 7.65 (d, 1H, H-8), 8.10 (d, 1H, H-7), 8.30 (d, 1H, H-23), 8.63 (d, 1H, H-20), 10.78 (s, 1H, OH); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ 112.3 (C-7), 116.2 (C-5), 116.9 (C-14), 119.0 (C-16), 122.1 (C-18), 123.3 (C-12), 126.0 (C-20), 127.1 (C-17), 128.4 (C-19), 128.6 (C-21), 128.9 (C-9), 129.7 (C-3), 131.1 (C-8), 134.4 (C-10), 135.3 (C-15), 138.7 (C-4), 153.9 (C-6), 157.6 (C-2), 159.0 (C-13), 192.8 (C-ms(EI)); m/z (% relative intensity): 316 (M^+ ; 100), 299 (73), 272 (10), 196 (63), 121 (64), 93 (19). Elemental analysis: Calculated for: $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{O}_4$: C 75.94; H 3.82; Found: C 75.80; H 3.75.

2.4. Estimation of the dipole moments

The dipole moment of a molecule in the excited-state is determined by the effect of electric field (internal or external) on its spectral bands position. The solvent dependence of the absorption



Scheme 1. Synthesis of coumarins **3** and **4**.

and fluorescence band maxima is used to estimate the excitation-state dipole moments of compounds **3** and **4**. Two methods depending on the internal electric field effect (solvatochromism) have been employed in the present study.

2.4.1. Method I

The equations (1) and (2) that afford the best results in the dipole moments change of an excited molecule were suggested by A. Kawski and P. Bojarski [23–25]:

The difference $\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f$:

$$\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f = S_1 f(\epsilon, n) + \text{const} \quad (1)$$

and the sum $\bar{\nu}_a + \bar{\nu}_f$:

$$\bar{\nu}_a + \bar{\nu}_f = -S_2 \Phi(\epsilon, n) + \text{const} \quad (2)$$

where

$$\Phi(\epsilon, n) = f(\epsilon, n) + 2g(n) \quad (3)$$

and

$$g(n) = \frac{3}{2} \frac{n^4 - 1}{(n^2 + 2)^2} \quad (4)$$

In these equations $\bar{\nu}_a$ and $\bar{\nu}_f$ are respectively the absorption and fluorescence maxima (cm⁻¹), and n and ϵ are the refractive index and the dielectric constant of solvents, respectively.

The expressions for the solvent parameters $f(\epsilon, n)$ and $\Phi(\epsilon, n)$ were given by A. Kawski and colleagues [23–25]:

$$f(\epsilon, n) = \frac{2n^2 + 1}{n^2 + 2} \left[\frac{\epsilon - 1}{\epsilon + 2} - \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right] \quad (5)$$

$$\Phi(\epsilon, n) = \left(\frac{2n^2 + 1}{(n^2 + 2)} \left(\frac{\epsilon - 1}{\epsilon + 2} - \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right) + \frac{3(n^4 - 1)}{(n^2 + 2)^2} \right) \quad (6)$$

The calculated values of solvent polarity parameters $f(\epsilon, n)$ and $\Phi(\epsilon, n)$ are given in Table 1.

Slopes S_1 and S_2 are given by equations (7) and (8):

$$S_1 = \frac{2(\mu_e - \mu_g)^2}{hca_0^3} \quad (7)$$

$$S_2 = \frac{2(\mu_e^2 - \mu_g^2)}{hca_0^3} \quad (8)$$

where μ_g and μ_e are ground- and excited-state dipole moments of the solute molecule, and the symbols h and c are Planck's constant and the light velocity in vacuum, respectively. a_0 is the Onsager

cavity radius of the solute molecule and the values were calculated from the molecular volume of the dyes molecules according to the Suppan's equation [26,27]: $a_0 = (3M/4\pi\delta N)^{1/3}$, where δ is the density of the solute molecule, M is the molecular weight of solute and N is the Avogadro's number.

The ground and excited state dipole moments are estimated by equations (9)–(11). Based on equations (7) and (8) and assuming that the symmetry of the investigated solute molecules remains unchanged upon electronic transition and the ground and excited state dipole moments are parallel, one obtains:

$$\mu_g = \frac{|S_2 - S_1|}{2} \left(\frac{hca_0^3}{2S_1} \right)^{1/2} \quad (9)$$

$$\mu_e = \frac{|S_2 + S_1|}{2} \left(\frac{hca_0^3}{2S_1} \right)^{1/2} \quad (10)$$

$$\frac{\mu_e}{\mu_g} = \frac{|S_2 + S_1|}{|S_2 - S_1|} \quad \text{Slope } S_2 > \text{Slope } S_1 \quad (11)$$

The slopes S_1 and S_2 were graphically determined by plotting Stokes shifts $(\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f)$ and $(\bar{\nu}_a + \bar{\nu}_f)$ versus the bulk solvent polarity functions $f(\epsilon, n)$ and $\Phi(\epsilon, n)$ respectively, for different solvents.

2.4.2. Method II

The polarization dependence and hydrogen bonding effects were correlated with microscopic solvent polarity E_T^N which is an empirical measure based on solvatochromic behaviour of betaine dyes as a probe solute. The theoretical basis for the correlation of the spectral shift with E_T^N has been developed by Ravi and al. [28] according to equation (12).

$$(\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f) = S_3 E_T^N + \text{const} \quad (12)$$

$$S_3 = 11307 \left[\left(\frac{\Delta\mu}{\Delta\mu_b} \right)^2 \left(\frac{a_B}{a_0} \right)^3 \right] \quad (13)$$

where $\Delta\mu_b = 9D$ and $a_B = 6.2 \text{ \AA}$ are the change in the dipole moment on excitation and Onsager radius of the betaine dye; $\Delta\mu$ and a_0 are the corresponding quantities for the solute molecule of interest. E_T^N is defined by equation (14), using water ($E_T^N = 1$) and tetramethylsilane ($E_T^N = 0$) as the reference solvents.

$$E_T^N = \frac{E_T(\text{solvent}) - E_T(\text{TMS})}{E_T(\text{water}) - E_T(\text{TMS})} = \frac{E_T(\text{solvent}) - 30.7}{32.4} \quad (14)$$

Finally, the change in the dipole moment ($\Delta\mu$) can be determined by the equation (15):

$$\Delta\mu = (\mu_e - \mu_g) = \sqrt{\frac{S_3 \cdot 81}{(6.2/a_0)^3 \cdot 11307.6}} \quad (15)$$

where S_3 is the slope obtained from the linear plot of Stokes shift $(\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f)$ versus microscopic solvent polarity (E_T^N) by using equation (12).

2.5. Theoretical calculations of ground-state dipole moments by computational methods

In order to compare the experimental observations with theoretical calculations, we have carried out quantum chemical

Table 1
Solvent properties and calculated values of solvent polarity parameters $f(\epsilon, n)$ and $\Phi(\epsilon, n)$.

Solvent	μ	ϵ	n	$f(\epsilon, n)$	$\Phi(\epsilon, n)$	E_T^N
CHCl ₃	1.04	4.81	1.4460	0.372	0.972	0.259
CH ₂ Cl ₂	1.60	8.90	1.4244	0.590	1.166	0.309
Ethyl acetate	1.88	6.02	1.3720	0.489	0.996	0.228
CH ₃ CN	3.92	37.50	1.3441	0.863	1.332	0.460
DMF	3.82	38.00	1.4300	0.839	1.423	0.386
DMSO	3.96	46.70	1.4787	0.841	1.488	0.444

calculations in ground and excited states in the gas phase and in different solvents. Firstly, we have calculated the thermodynamics parameters of compounds **3** and **4**. Vibrational frequencies of the optimized structures were calculated to ensure that the obtained configurations correspond to local minima on the ground and excited states. All the calculations were based on density functional theory (DFT) with B3LYP functional and 6-31G(d) basis set. DMSO was used as solvent in all the calculations (PCM model). The UV/vis absorption of the compounds (vertical excitation) was calculated with the TD-DFT methods based on the optimized ground state geometry (S0 state). For the fluorescence emission, the emission wavelength was calculated based on the optimized excited state geometry (S1). All optimization and energy calculations employed the 6-31G(d) basis set and were carried out with Gaussian 09W. The different solvents were modelled using their dielectric constants [29,30].

The different solvents were modelled using their dielectric constants [29,30].

3. Results and discussion

3.1. Solvent effect on absorption and emission spectra

The choice of few solvents was due to the poor solubility of the products. The absorption and emission maxima, quantum yields, Stokes shift $\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f$ and arithmetic sum of Stokes shift $\bar{\nu}_a + \bar{\nu}_f$ for the molecules in different solvents are given in Table 2.

3.1.1. UV/vis absorption spectra

The UV–vis absorption spectra of compounds **3** and **4** (concentration 5×10^{-5} M) were recorded immediately after products dissolution and filtration through paper. The Stokes shift magnitudes vary between 3339 and 3776 cm^{-1} . The values of the Stokes shift are also indicative of the charge transfer transition (Table 2).

The absorption spectrum for compounds **3** and **4** displays a broad band in all the solvents, attributed to the $\pi-\pi^*$ transition related with the carbonyl group [Fig. 2(a) and (b)]. These bands can be attributed to the charge transfer between the benzo ring's coumarin and the electron withdrawing pole, constituted by the carbonyl groups that reinforce the electron attracting strength on this side of the molecules. In addition, the wavelength and the intensity of the absorption spectra were affected when changing the coumarin substituents. Compound **4** with a benzo fused coumarin skeleton (extended electron cloud) shows the highest intensity and highest wavelength.

3.1.2. Fluorescence spectra

3.1.2.1. Steady-state emission spectra. The shape and position of the

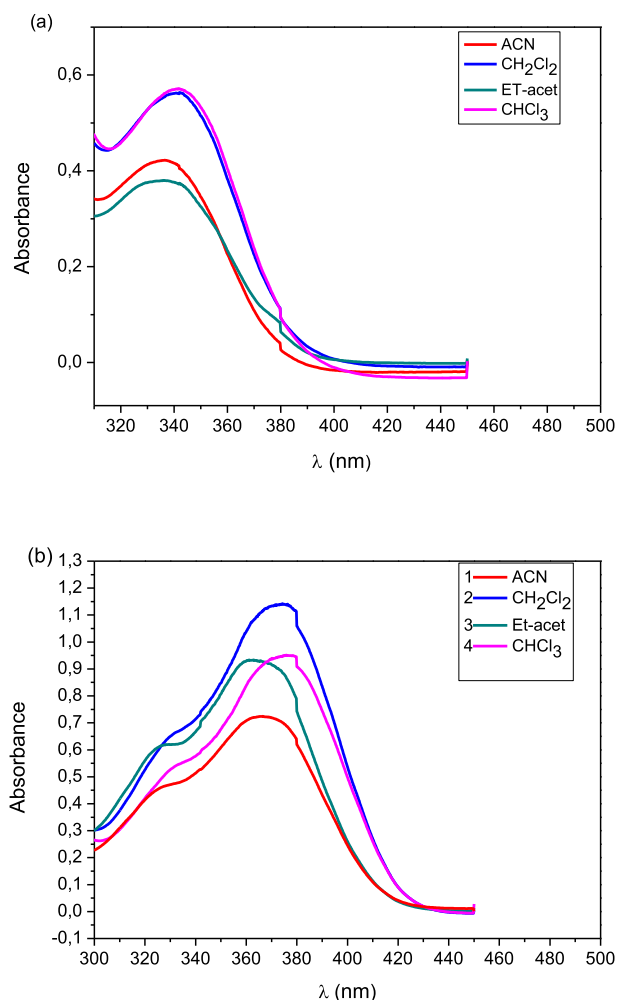


Fig. 2. Absorption spectra of compounds **3** (a), **4** (b) in different solvents.

emission spectra of compounds **3** and **4** were independent of the excitation wavelength, confirming that only one species emits in each solution and shows only one peak [Fig. 3(a) and (b)].

Large variations were found in the shape of the emission spectra according to the media. A bathochromic shift was observed for both compounds, associated with a rising of solvent polarity caused by a significant difference in charge distributions between the ground state and excited state that was induced by a strong interaction with polar solvents in the excited state.

Table 2
Spectroscopic and photophysical characteristics of coumarins **3** and **4** in different solvents.

Solvents	λ_{abs} (nm)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	$\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f (\text{cm}^{-1})$	$\bar{\nu}_a + \bar{\nu}_f (\text{cm}^{-1})$	$\Phi_f \times 10^2$
DMSO	326	310	371	3721	57629	14.4
DMF	325	305	370	3742	55707	14.6
ACN	334	310	380	3624	56256	24.0
CH ₂ Cl ₂	341	325	385	3351	55299	6.5
Ethyl Acetate	336	320	380	3339	55299	15.6
CHCl ₃	341	330	390	3344	54626	9.3
DMSO	364	345	422	3776	51169	22.2
DMF	363	345	420	3739	51358	21.7
ACN	365	345	423	3757	51038	15.6
CH ₂ Cl ₂	373	350	430	3554	50065	10.1
Ethyl Acetate	368	350	424	3589	50759	1.7
CHCl ₃	376	345	434	3554	49637	8.8

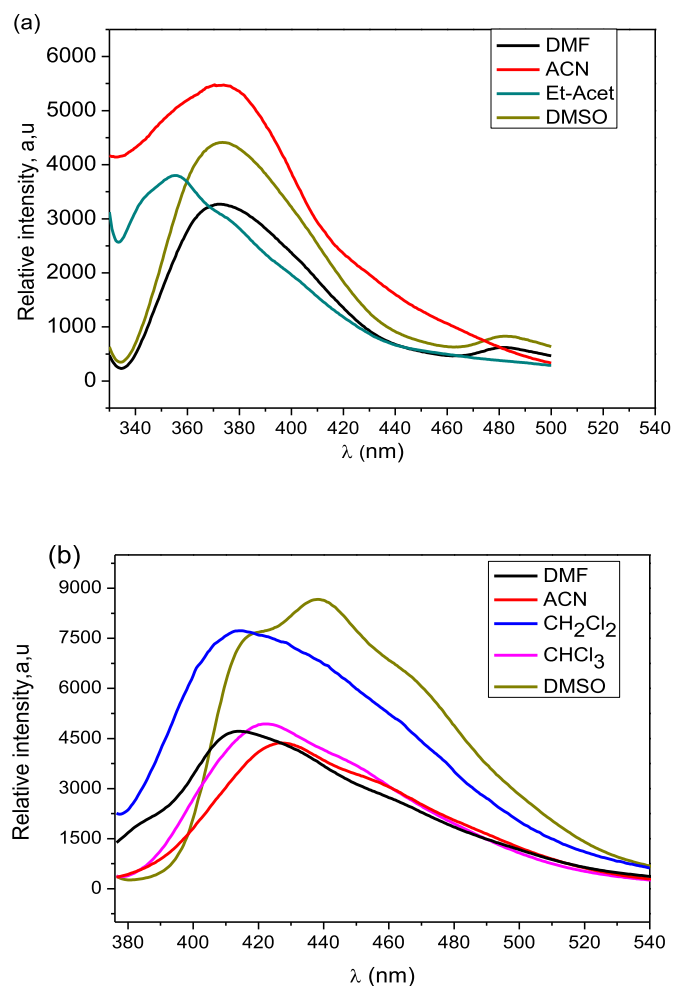


Fig. 3. Emission spectra of compounds 3 (a) and 4 (b) in different solvents.

Moreover, the weaker shift of the electronic absorption spectra compared to fluorescence emission spectra indicates that both compounds are less polarized by polar solvents in the ground state than in the excited state. Whereas in fluorescence emission [Fig. 3(a) and (b)] DMSO exalts the absorption phenomena and DMF provokes the inverse effect for 4. These behaviours highlight the role of specific interactions between the solute and the solvent [31,32]. An increase in solvent polarity associated to bathochromic shifts in absorption maxima ($\lambda_{\text{abs-max}}$) indicates that these main bands correspond to an electronic $\pi-\pi^*$ transition of these compounds. Intramolecular charge transfer (ICT) processes are known to be stabilized in solvents with greater dielectric constant leading to a red shift of both absorbance $\lambda_{\text{abs-max}}$ and emission λ_{emmax} [33] spectra. In fact, in DMSO coumarins **3** and **4** exhibited the biggest bathochromic shifts, resulting from this ICT. The intramolecular charge transfer stabilization in coumarins has been correlated to the ability of strong polar solvents to stabilize their excited singlet state [34,35]. In addition, the wavelength and the intensity of the emission spectra were affected when changing the coumarin substituents. Compound 4 shows the highest intensity and highest emission wavelength.

The large magnitude of Stokes shift indicates that the excited-state geometry could be different from that of the ground state associated with a variation of the dipole moment upon excitation (Table 2), and it is reasonable to assume specific interactions involving the carbonyl group and solvent molecules [32,36].

3.2. Fluorescence quantum yields

The fluorescence quantum yield Φ_f was determined by excitation at λ_{ex} of compounds **3** and **4** (Table 2) and they range between 1.7×10^{-2} to 22.2×10^{-2} . However, unexpectedly, in DMSO, DMF and ACN coumarins **3** and **4** showed an increase in Φ_f . We expected a reduced Φ_f in a more polar solvent that could better stabilize the ICT. This inverse phenomenon could be explained by a reduction of twisting of the single bonds involved in the charge transfer in the excited-state for some specific solvents, as described for other coumarins [33]. In most of the solvents the quantum yield of **3** was smaller than that of **4**. However, compound **4** is more fluorescent than **3**. Nevertheless, these two coumarins are not endowed with properties of fluorescence as important as some currently known coumarins.

3.3. Estimation of ground-state and excited-state dipole moments in several solvents using the solvatochromic method

Stokes shifts $\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f$ and arithmetic mean of Stokes shift $\bar{\nu}_a + \bar{\nu}_f$ for both coumarins **3** and **4** in different solvents have been calculated from their absorption and emission maxima (Table 2) to estimate the excited-state dipole moments. The shifts on the emission peaks with solvent polarity changes are more pronounced than those of absorption peaks. This indicates that $\Delta\mu$ is positive, meaning that the dipole moment of both **3** and **4** increases on the excitation mode. Table 2 summarises the band shift data of compounds **3** and **4**, along with the solvent polarity function values $f(\epsilon, n)$ and $\Phi(\epsilon, n)$ of various solvents. Fig. 4(a) and (b) show the graphs of the spectral shifts $\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f$ versus bulk solvent polarity functions $f(\epsilon, n)$, Fig. 5(a) and (b) show the graphs of the respective spectral shifts $\bar{\nu}_a + \bar{\nu}_f$ versus bulk solvent polarity functions $\Phi(\epsilon, n)$, while Fig. 6(a) and (b) plot the graphs of stoke shifts $\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f$ against the microscopic solvent polarity E_T^N . The slopes S1, S2 and S3 were then obtained from these graphs. Good correlation coefficients were obtained for all cases (correlation coefficients, slopes and intercepts of fitted lines are given in Table 3). The values of the ground and excited-state dipole moments and of the ratios ($\frac{\mu_e}{\mu_g}$) of the solute molecules were estimated from equations (9)–(11) and present in Table 4. In addition, the change in dipole moment $\Delta\mu$ was calculated from the first method ($\mu_e - \mu_g$) and the second method (Eq. (15)) and shown in Table 4.

The dipole moments of the two coumarin derivatives **3** and **4** were higher in the excited-state compared to the first ground-state and change with the nature of the substituent introduced on the coumarin structure. The dipole moments decrease in the case of benzo [f]coumarin **4**. A fair agreement has been observed in dipole moment change ($\Delta\mu$) of **3** with a small Onsager cavity radius. The large change in dipole moment on excitation suggests that the excited-state is of a twisted intramolecular charge-transfer (TICT) nature.

The increasing in the excited state dipole moments compare to ground state dipole moments indicating a substantial redistribution of π -electron densities in more polar excited state for two coumarins **3** and **4**.

The high values of μ_e and μ_g and the variation in the dipole moment for compounds **3** and **4** may be understood in terms of their possible resonance structures as shown in Fig. 7. Upon excitation the carbonyl groups become strong electron withdrawing groups, which explain the higher value of dipole moment in both excited states during the charge transfer process.

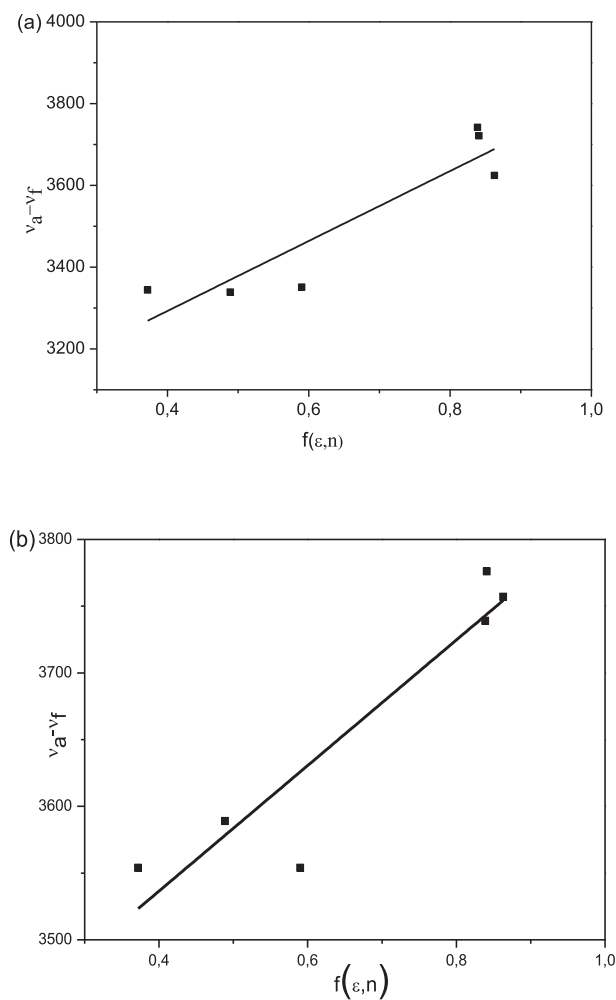


Fig. 4. The variation of Stokes shift with $f(\epsilon, n)$ by using equation (1) in different solvents for 3 (a) and 4 (b).

3.4. Theoretical study

3.4.1. Relative stability

In order to compare the experimental observations with theoretical calculations, we have carried out quantum chemical calculations in ground state in gas phase and in different solvents with DFT/B3LYP for S_0 state and TD-DFT/B3LYP for S_1 state, respectively. Fig. 8 depicts the schematic representation of the different rotamers of coumarins **3** and **4**. Relative energies for different rotamers computed at the B3LYP/6–31G(d) level are summarized in Table 5.

Probably one of the most crucial factors determining the rotamers distribution is the environment. The study of interaction between solute and solvent is normally a complicated process. A CPCM allows one to take into account long-range interactions between solute and solvent. The continuum model is computationally efficient for the prediction of stability trends in the liquid phase [31]. The energetic parameters of rotamers in different solvents calculated at the B3LYP/6–31G(d) level of theory are also listed in Table 5. The molecular radius (\AA) of the spherical cavity obtained for optimized geometries for both coumarins **3** and **4** are calculated at the B3LYP/6–31G(d), among the many possible rotamers we considered only the most stable obtained in the liquid phase (Table 5).

An inspection of the relative energies of rotamers reported in

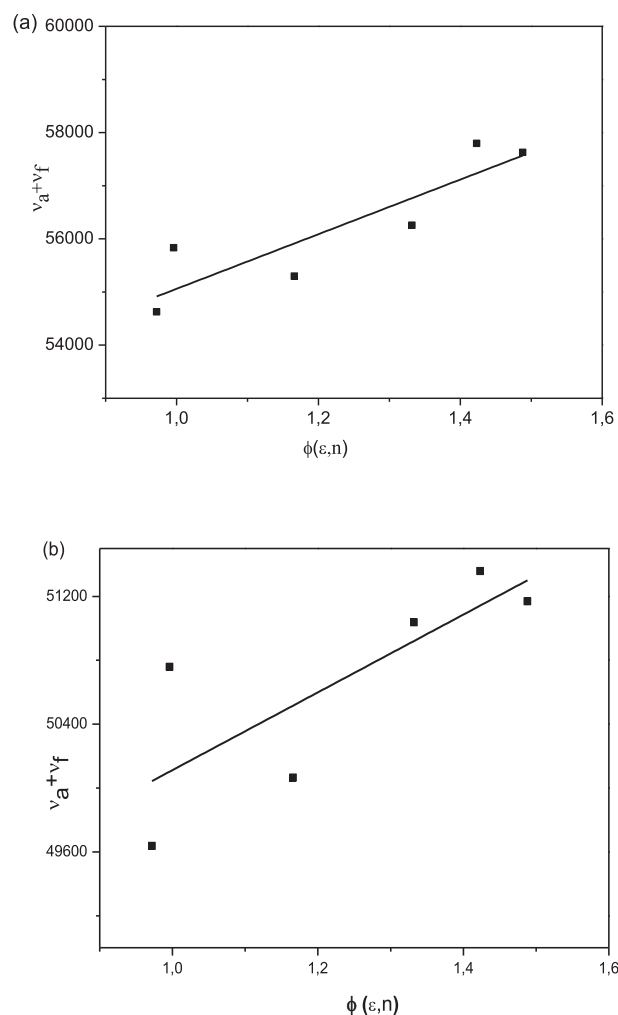


Fig. 5. The variation of arithmetic sums of Stokes shift with $\Phi(\epsilon, n)$ by using equation (2) in different solvents for 3 (a) and 4 (b).

Table 5 shows a relatively significant difference between rotamers and reveals that the variation of the spatial orientation of the OH group in **3** and **4** has a significant effect on their relative stabilities.

3.4.2. Dipole moment

Dipole moment reflects the degree of charge distribution in a molecule. Habitually it is used to clarify a variety of physical and chemical properties. The dipole moments of the both coumarins **3** and **4** have been computed at the B3LYP/6–31G(d) level of theory in different environments (Table 5). As can be seen, there is an important variation in dipole moment, while going from gas to solvent phase environments. Dipole moments of the studied compound have higher values in the solvent phase. This is due to the interactions between the solvent molecules and the dipolar molecules. The value of the dipole moments increases with dielectric constant in the following order: DMF > acetonitrile > dichloromethane > ethyl acetate > chloroform > gas phase. High values of dipole moment (Table 6) have been observed for excited state compared to the corresponding ground state indicating an intramolecular charge-transfer (ICT).

The discrepancies between the experimental and theoretical excited dipole moments resulted from Kawski et al. [23–25] and all equations used for the treatment of the solvatochromic effect (Table 4) and at the B3LYP/6–31G(d) level of theory in different

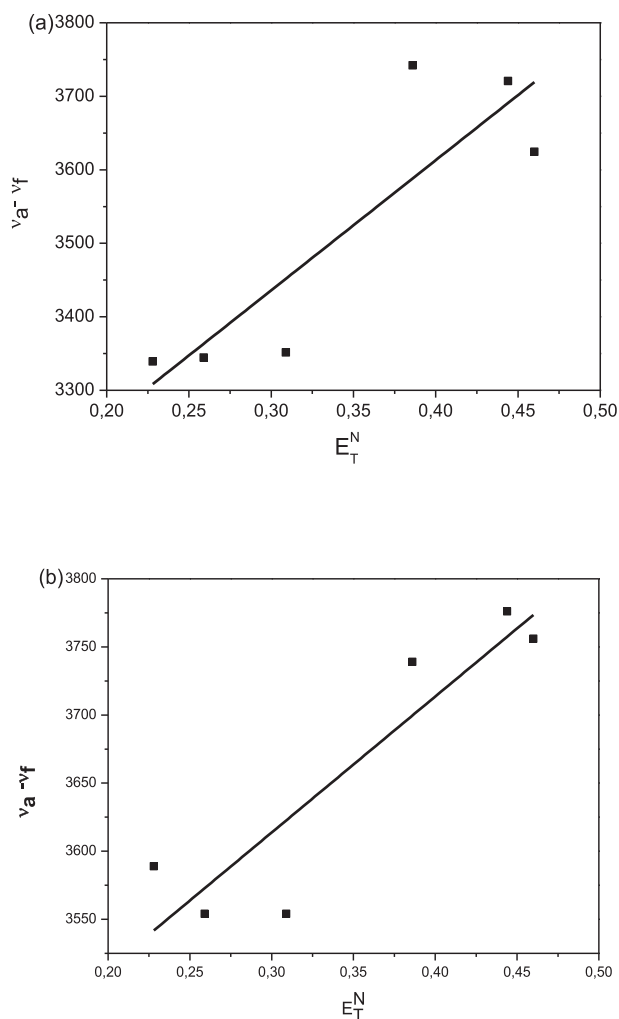


Fig. 6. Variation of Stokes shift with microscopic solvent polarity (E_T^N) using equation (12) in various solvents for 3 (a) and 4 (b).

Table 3

Statistical treatment of the correlations of solvent spectral shifts of 3 and 4.

Compound	Slope	Intercept ($C\ m^{-1}$)	Correlation Coefficient (R)	Number of data
Eq. (1) correlation				
3	855.50239	2950.68725	0.92	6
4	470.45506	3348.33375	0.93	6
Eq. (2) correlation				
3	5140.88507	49919.28181	0.89	6
4	2434.87605	47677.3199	0.79	6
Eq. (12) correlation				
3	1771.80875	2904.16782	0.88	6
4	998.62544	3314.14456	0.91	6

Table 4

Dipole moments in the ground and excited states and correlation coefficient of 3 and 4 using a_0 calculated with ChemOffice (i) and a_0 calculated with B3LYP (ii).

		Radius (Å°)	$\mu_g(D)^a$	$\mu_e(D)^b$	$\Delta\mu(D)^c$	$\Delta\mu(D)^d$	μ_e/μ_g^e
3	(i)	4.23	13.87	19.41	5.65	4.66	1.40
	(ii)	4.95	17.58	24.60	7.02	5.86	1.40
4	(i)	4.46	7.18	10.62	3.44	2.90	1.48
	(ii)	5.21	9.06	13.41	4.35	3.67	1.48

Debye = $3.33564 \times 10^{-30}\ C\ m = 10^{-18}\ esu\ C.m.$

^(a) The experimental ground-state dipole moment calculated from the Eq. (9). ^(b) The experimental excited-state dipole moment calculated from the Eq. (10). ^(c) The dipole moment change calculated by Kawski and co-workers equation (7). ^(d) The dipole moment change calculated from microscopic solvent polarity parameter (E_T^N) Eq. (15). ^(e) The ratio of μ_e and μ_g is calculated from Eq. (11).

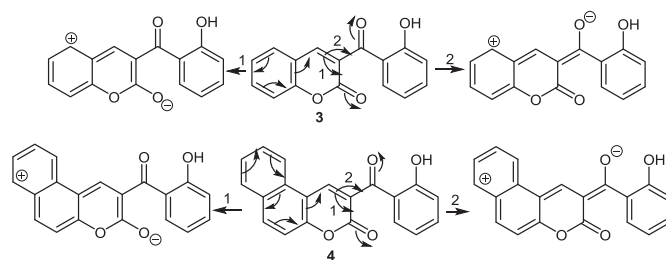


Fig. 7. Possible resonance structures of coumarins 3 and 4.

environments (Table 5) may explain that the dipole moment of organic molecules depends on the transfer process within the molecule. We found that 3a and 4a are more polar in the excited state than the ground state, and, therefore, is more sensitive to solvent effects.

3.4.3. Quantum chemical calculations

The ground and excited states geometries computed at the DFT and TD-DFT level for 3a and 4a are plotted in Fig. 9 for atom labelling. Firstly the geometry of both compounds with direction of dipole moment at ground state (S_0) and the singlet excited state (S_1) were optimized [Fig. 10(a) and (b)].

Generally, compounds takes coplanar geometry at S_0 state, but for both 3a and 4a in the gas phase we found that the coumarin core and the 2-hydroxybenzoyl moiety take a twisted conformation, being the dihedral angle ($D_{S_0}^3$) ($C_{12}C_9C_{13}C_{14}$) of 3a 51.88° and -49.44° ($D_{S_0}^4$) ($C_{12}C_9C_{13}C_{14}$) for 4a. It should be noted that the ground state geometry were used for optimization of the first singlet geometry excited state. The dihedral angle of 3a and 4a in the excited state are $D_{S_1}^3 = 8.89^\circ$ and $D_{S_1}^4 = -8.78^\circ$ respectively. In DMSO, the dihedral angle ($D_{S_0}^3$) of 3a is 55.39° and is -52.35° ($D_{S_0}^4$) for 4a at S_0 state. At the S_1 state the dihedral angle of 3a and 4a in the excited state are $D_{S_1}^3 = 16.10^\circ$ and $D_{S_1}^4 = -16.90^\circ$, respectively. For the ground state geometry, the coumarin core and the 2-hydroxybenzoyl of the molecule take a twisted conformation. At the S_1 state, the two components takes a more coplanar geometry

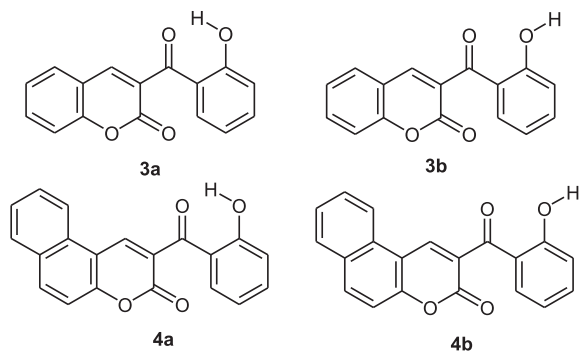


Fig. 8. Schematic representation of the different rotamers of coumarins **3** and **4**.

Table 5

Relative energies $\Delta E_{(ZPVE)}$ (kcal/mol) in gas phase, relative energies ΔE_0 in solvent phases, and dipole moment (Debye) calculated at the B3LYP/6–31 G(d) level of theory.

	Gas phase $\Delta E_{(ZPVE)}$ μ	CHCl ₃ ΔE_0 μ	CH ₂ Cl ₂ ΔE_0 μ	Et-acet ΔE_0 μ	ACN ΔE_0 μ	DMF ΔE_0 μ
3						
3a	0.00 5.31	0.00 7.08	0.00 7.39	0.00 7.21	0.00 7.70	0.00 7.70
3b	33.86 5.47	32.10 6.80	31.66 7.14	31.91 6.95	31.20 7.50	31.20 7.50
4						
4a	0.00 5.96	0.00 7.83	0.00 8.15	0.00 7.96	0.00 8.46	0.00 8.46
4b	38.68 5.79	36.84 7.20	36.38 7.54	24.15 7.48	24.23 7.94	35.89 7.91

Table 6

Ground and excited-state dipole moments in Debye (D) of **3a** and **4a** in the gas phase and DMSO calculated by DFT/B3LYP and TD-DFT/B3LYP.

Compounds	Gas phase		DMSO	
	μ_g	μ_e	μ_g	μ_e
3a	5.31	7.83	7.52	10.12
4a	5.96	9.06	8.30	11.57

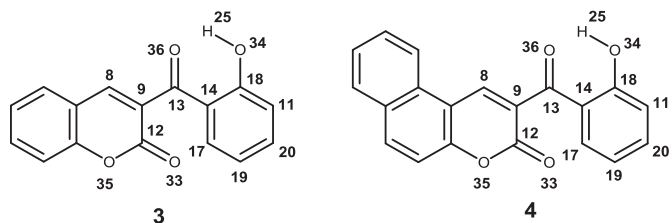


Fig. 9. Arbitrary numbering is proposed to facilitate the comparative study.

which confirms that molecule conformation is stabilized at the excited state.

The UV–vis absorption and emission spectra of **3a** and **4a** were calculated based on the optimized S_0 and S_1 states geometry respectively, with the TD-DFT method. For **4** the effect of substitute (benzo fused) could explain the shape and position of the absorption and emission spectra. In general, an extension of the π system is accompanied by the shift of the absorption and fluorescence spectra toward the longer wavelengths.

The calculated UV–vis absorption and emission spectra are in agreement with the experimental results. For example, the

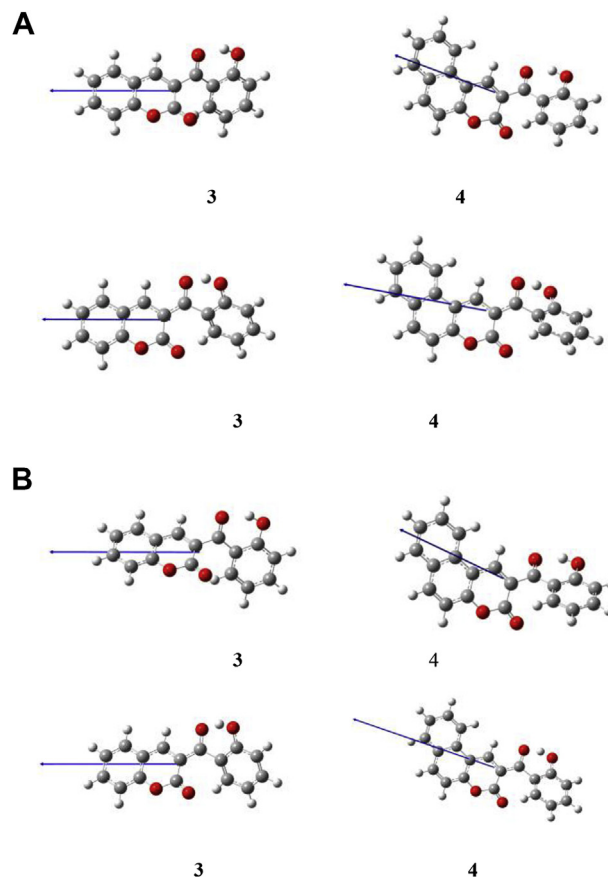


Fig. 10. a. Optimized ground state (S_0 state, top row), the singlet excited state (S_1 state, bottom row) geometry of coumarins **3** and **4** and direction of dipole moments. Gas phase was considered in the calculation. Calculated at B3LYP/6-31G(d) level with Gaussian 09W. 10b. Optimized ground state (S_0 state, top row), the singlet excited state (S_1 state, bottom row) geometry of coumarins **3** and **4** and direction of dipole moments. Solvent DMSO was considered in the calculation (PCM model). Calculated at B3LYP/6-31G(d) level with Gaussian 09W.

calculated absorption maxima of **3a** is at 351 nm, very close to the experimentally observed absorption at 326 nm, and for **4a** the calculated absorption maxima is at 407 nm, which is in agreement with the experimental results 364 nm. In order to study the emission of **3a** and **4a** the calculated S_0 – S_1 energy gap (emission wavelength) is 392 nm, which is close to the experimental result 371 nm for **3a**. For **4a** the calculated emission wavelength is 455 nm, which is in agreement with the experimental result 422 nm.

The frontier MOs [Highest Occupied Molecular Orbital (HOMO) and Lowest Unoccupied Molecular Orbital (LUMO)] involved in the vertical excitation of **3a** and **4a** were presented in Fig. 11(a and b). As can be seen, in the ground and excited states of **3a** and **4a**, in the all cases, the HOMO is localized in the 2-hydroxybenzoyl moiety and the LUMO migrates on the whole molecule. Therefore, the charge transfer occurs from the 2-hydroxybenzoyl moiety to the coumarin core in the HOMO-LUMO transition. Thus, the ICT nature of S_1 state is demonstrated. The energy gap of HOMO-LUMO could explain the eventual charge transfer interaction within the molecule. The computed energy values of HOMO and LUMO levels for ground state in the gas phase of **3a** are -6.11 eV and -2.46 eV respectively, being the energy difference 3.66 eV. For **4a** this energy difference is 3.57 eV (Table 7). When the molecules are excited the HOMO and LUMO energy difference decreases to 1.97 eV for **3a** and to 1.93 eV for **4a**. The low value of frontier molecular orbital gap of

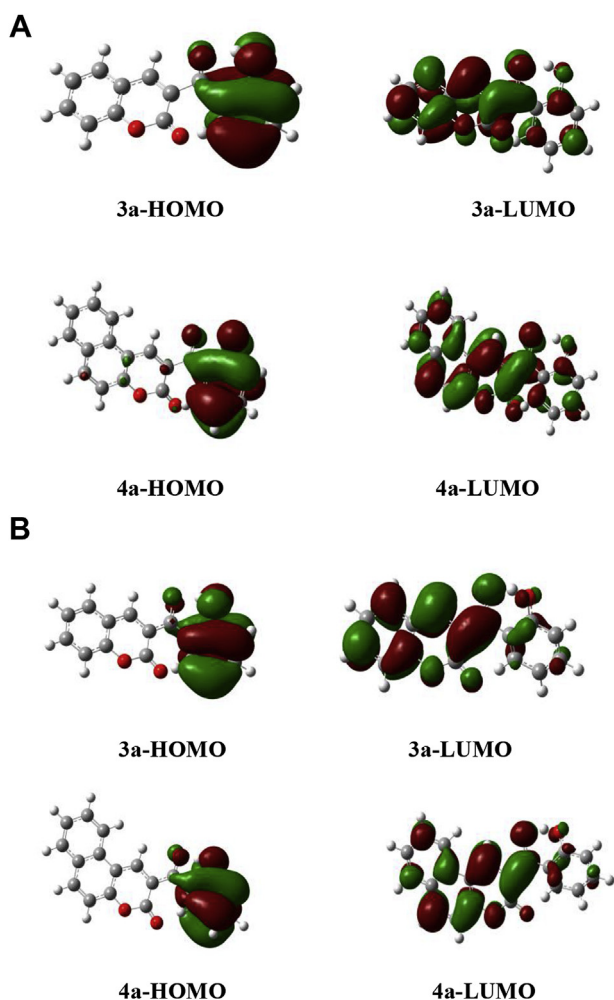


Fig. 11. a. The 3D plots of the frontier orbitals HOMO and LUMO for the ground state of **3a** and **4a**. b. The 3D plots of the frontier orbitals HOMO and LUMO for the lowest excited state of **3a** and **4a**.

3a and **4a** in the excited state indicate that the molecule is more reactive.

Mulliken atomic charges on each atom of **3a** and **4a** investigated in gas and DMSO medium have been reported in [supplementary information](#). For these two compounds all the hydrogen atoms are associated with positive charge. In **3a** most of the carbon atoms

C (3–7), C (11–13), C (15–16) and all the oxygen atoms are associated negative charge indicating that these are donor atoms, the other carbon atoms are associated with positive charge behave as acceptor atoms. Thus the electron transfer from benzo ring to carbonyl group via 2H-pyrano ring makes the carbonyl group an electron donor and 2-hydroxybenzoyl moiety an electron acceptor. The maximum negative and positive charge values in DMSO are -0.660278 for O (28) and 0.585529 for C (8) in the molecule, respectively. In **4a**, most of carbon atoms (12/20) and oxygen atoms are associated with negative charge, indicating that these are donor atoms, whereas C (1), C (2), C (5), C (6), C (12), C (13), C (14), C (18) associated with positive charge behave as acceptor atoms. The electron transfer from benzo ring to carbonyl group via benzopyrano ring makes the carbonyl group an electron donor and 2-hydroxybenzoyl group an electron acceptor. The maximum negative and positive charge values are -0.661071 for O (34) and 0.578580 for C (12) in the molecule, respectively.

Molecular electrostatic potential maps [Fig. 12(a) and (b)] for polar molecules represent electrostatic potential around the molecule based on which sites of electrophilic and nucleophilic attack as well as hydrogen bonding interactions in a solvent can be evaluated. But, keep in mind that maps represent the potential due to all electrons and thus an electron-poor site in the molecule is not necessarily the most electrophilic site. MESP of polar molecules do an excellent result predicting the possibility of the charge-dipole and dipole-dipole interactions. Molecular electrostatic potential

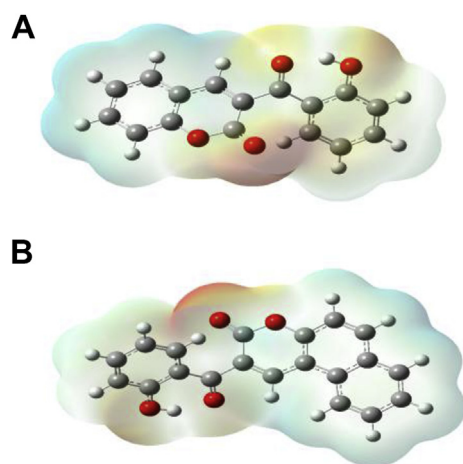


Fig. 12. a Molecular electrostatic potential surface of **3a**. b Molecular electrostatic potential surface of **4a**.

Table 7

The calculated thermodynamics parameters of **3a** and **4a** in gas phase and in DMSO.

	DFT/B3LYP		TD DFT/B3LYP	
	3a	4a	3a	4a
Gas phase				
Energy (Hartree)	-916.63193471	-1070.27590943	-916.60202281	-1070.24739941
E_{HOMO} (eV)	-6.11	-6.05	-5.32	-5.23
E_{LUMO} (eV)	-2.49	-2.54	-3.35	-3.30
$\Delta E_{\text{LUMO-HOMO}}$ (eV)	3.62	3.51	1.97	1.93
Dihedral Angle ($^{\circ}$)	51.88	-49.44	8.89	-8.78
$\text{C}_{12}-\text{C}_9-\text{C}_{13}-\text{C}_{14}$				
DMSO				
Energy (Hartree)	-916.644453504	-1070.28921887	-916.62161561	-1070.268175
E_{HOMO} (eV)	-6.34	-6.16	-5.77	-5.74
E_{LUMO} (eV)	-2.46	-2.54	-3.17	-3.16
$\Delta E_{\text{LUMO-HOMO}}$ (eV)	3.88	3.62	2.6	2.58
Dihedral Angle ($^{\circ}$)	55.39	-52.35	16.10	-16.90
$\text{C}_{12}-\text{C}_9-\text{C}_{13}-\text{C}_{14}$				

at the surface are represented by different colours. Red colour indicates electronegative character responsible for electrophilic attack, blue colour indicates positive region representing nucleophilic attack and green colour representing zero potential. It is important to mention that the same regions are identified in the Mulliken charges also.

4. Conclusion

In the present study, we report a facile synthesis of 3-(2-hydroxybenzoyl)-2H-chromen-2-one **3** and 3-(2-hydroxybenzoyl)-2H-benzo [f]chromen-2-one **4**. We described the solvent effect on the absorption and emission spectra of **3** and **4**. We have calculated the ground state dipole moment and excited state dipole moment using A. Kawski and P. Bojarski's method and the conductor-like polarizable continuum model (CPCM). All the calculation methods employed to obtain **3** and **4** excited state dipole moments render values larger than the respective ground state moments. This reveals that these molecules are more polar in the excited state than in the ground state and implies also the intramolecular charge transfer (ICT) process during the excitation period. The observed variations in the dipole moment values can also be understood in terms of their possible resonance structures.

3-(2-Hydroxybenzoyl)-2H-chromen-2-one **3** and 3-(2-hydroxybenzoyl)-2H-benzo [f]chromen-2-one **4** are characterized by modest fluorescence efficiency even in aprotic polar media. The improvement of the photochemical properties of **3** and **4** will be studied particularly by the use of the variously substituted aromatic 2-hydroxyaldehydes.

Acknowledgments

Thanks are due to FCT/MEC for the financial support of the QOPNA research Unit (FCT UID/QUI/00062/2013) through national funds and, where applicable, co-financed by the FEDER, within the PT2020 Partnership Agreement, and to the Portuguese NMR Network (PTNMR).

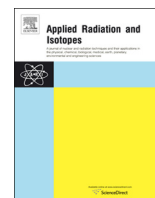
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.08.039>.

References

- [1] K.K. Rohatgi-Mukherjee, *Fundamental of Photochemistry*, Wiley Eastern Ltd., New Delhi, India, 1986.
- [2] J.R. Lackowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York, 1983.
- [3] C. Richards, *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, VCH, New York, 1991.
- [4] B. Koutek, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 43 (1978) 2356–2386.
- [5] N.R. Patil, R.M. Melavanki, S.B. Kapatkar, N.H. Ayachit, J. Saravanan, *J. Fluoresc.* 21 (2011) 1213–1222.

- [6] M.S. Zakerhamidi, A. Ghanadzadeh, H. Tajalli, M. Moghadam, M. Jassas, R. Hosseininia, *Spectrochim. Acta* 77 (2010) 337–341.
- [7] M.S. Zakerhamidi, M. Keshavarz, H. Tajalli, A. Ghanadzadeh, S. Ahmadi, M. Moghadam, S.H. Hosseini, V. Hooshangi, *J. Mol. Liq.* 154 (2010) 94–101.
- [8] R.M. Melavanki, N.R. Patil, S.B. Kapatkar, N.H. Ayachit, S. Umapathy, J. Thipperudrappa, A.R. Nataraju, *J. Mol. Liq.* 158 (2011) 105–110.
- [9] R.M. Melavanki, H.D. Patil, S. Umapathy, J.S. Kadavevaramath, *J. Fluoresc.* 22 (2012) 137–144.
- [10] J.J. Aaron, M.D. Gaye, C. Parkanyi, N.S. Cho, L. Von Szentpaly, *J. Mol. Struct.* 156 (1987) 119–135.
- [11] C. Parkanyi, M.R. Stem-Beren, O.R. Martinez, J.J. Aaron, M.B. MacNair, A.F. Arietta, *Spectrochim. Acta, Part A* 60 (2004) 1805–1810.
- [12] A. Kawski, B. Kuklinski, P. Bojarski, *Z. Naturforsch.* 57a (2002) 716–722.
- [13] K. Fukui, T. Yonezawa, H. Shingu, *J. Chem. Phys.* 20 (1952) 722–725.
- [14] M.S. Zakerhamidi, S. Ahmadi-Kandjani, M. Moghadam, E. Ortyl, S. Kucharski, *Spectrochim. Acta, Part A* 85 (2012) 105–110.
- [15] L. Bilot, A. Kawski, *Z. Naturforsch.* 18A (1963) 961–966.
- [16] N.R. Patil, R.M. Melavanki, B.M. Chougala, L.A. Shastri, F.M. Sanningannavar, *Int. J. Life Sci. Pharma Res.* 2 (2012) 139–149.
- [17] M.M. Husain, R. Sindhu, H.C. Tandon, *Eur. J. Chem.* 3 (2012) 87–93.
- [18] A. Kawski, *Acta Phys. Polon.* 29 (1966) 507–518.
- [19] A. Kawski, L. Bilot, *Acta Phys. Polon.* 26 (1964) 41–45.
- [20] a) M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.F. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, J.A. Montgomery, T. Vreven, K.N. Kudin, J.C. Burant, J.M. Millam, S.S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J.E. Knox, H.P. Hratchian, 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, P.Y. Ayala, K. Morokuma, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, V.G. Zakrzewski, S. Dapprich, A.D. Daniels, M.C. Strain, O. Farkas, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, Q. Cui, A.G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, A. Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, C. Gonzalez, J. A. All Calculation Are Obtained with the Gaussian 09, Revision C.01, Gaussian, Inc., Willingford, CT, 2009; b) R. Dennington, T. Keith, J. Millam, Obtained Results Visualized via GaussView 5.0 Program, Semicem Inc., Shawnee Mission KS, 2009. GaussView, Version 5.
- [21] M. Makhloffi-Chebli, M. Hamdi, A.M.S. Silva, F. Balegrone, *J. Soc. Alger. Chim.* 18 (2008) 91–101.
- [22] P. De March, M. Moréno-Manas, R. Pleixats, J.L. Roca, *J. Heterocycl. Chem.* 21 (1984) 1371–1372.
- [23] L. Billot, A. Kawski, *Z. Naturforsch.* 17A (1962) 621–627.
- [24] A. Kawski, in: J.R. Rabek (Ed.), *Progress in Photochemistry and Photophysics*, CRC, New York, 1992, pp. 1–47.
- [25] A. Kawski, P. Bojarski, *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* 82 (2011) 527–528.
- [26] J.R. Mannekutla, B.G. Mulimani, S.R. Inamdar, *Spectrochim. Acta* 69 (2008) 419–426.
- [27] P. Suppan, *Chem. Phys. Lett.* 94 (1983) 272–275.
- [28] M. Ravi, T. Soujanya, A. Samanta, T.P. Radhakrishnan, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 91 (1995) 2739–2742.
- [29] A.D. Becke, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 5648–5652.
- [30] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, *Phys. Rev. B* 37 (1988) 785–789.
- [31] M. Cossi, N. Rega, G. Scalmani, V. Barone, *J. Comput. Chem.* 24 (2003) 669–681.
- [32] F.A.S. Chipem, A. Mishra, G. Krishnamoorthy, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14 (2012) 8775–8790.
- [33] M. Cigàn, J. Donovalová, V. Szöcs, J. Gaspar, K. Jakusová, A. Gaplovsky, *J. Phys. Chem.* 117 (2013) 4870–4883.
- [34] P. Dahiya, M. Kumbhakar, T. Mukherjee, H. Pal, *Chem. Phys. Lett.* 414 (2005) 148–154.
- [35] A.S. Satpati, M. Kumbhakar, S. Nath, H. Pal, *Photochem. Photobiol.* 85 (2009) 119–129.
- [36] D. Panda, A. Datta, *J. Chem. Phys.* 125 (2006) 1–9.



Proposal for an ecofriendly and economic strategy for efficient radioiodination of coumarin derivatives

Nejla Khatir–Hamdi^{a,b}, Malika Makhloufi-Chebli^{c,d,*}, Artur M.S. Silva^e, Méziane Brahimi^f, Hocine Grib^{b,**}

^a Centre de Recherche Nucléaire de Draria (CRND), BP 43, Sebala, Draria, Algeria

^b Département du Génie de l'Environnement, École Nationale Polytechnique, 10 Avenue des Frères Ouadek, Hassen badi, BP 182, 16200, El Harrach, Algiers, Algeria

^c Laboratoire de Physique et Chimie des Matériaux LPCM, Faculté des Sciences, Université Mouloud Mammeri, 15000, Tizi Ouzou, Algeria

^d Laboratoire de Chimie Organique Appliquée (Groupe Hétérocycles), Faculté de Chimie, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediène, BP32, El-Alia, 16111, Bab-Ezzouar, Algiers, Algeria

^e QOPNA, Department of Chemistry, University of Aveiro, 3810-193, Aveiro, Portugal

^f Laboratoire de Physico chimie Théorique et Chimie Informatique (LPCTCT), Faculté de Chimie, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediène USTHB, BP32, El-Alia, 16111, Bab-Ezzouar, Algiers, Algeria

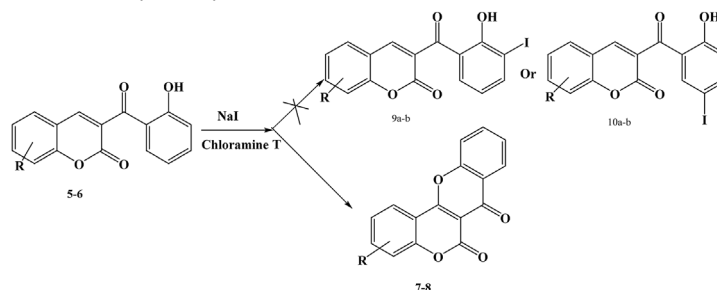


HIGHLIGHTS

- The calculation of global and local nucleophilicity parameters for coumarin derivatives.
- Iodination tests with cold iodine and analysis of the compounds obtained.
- The iodonium cation causes intramolecular heterocyclization without iodination.
- The combination of theoretical calculations - cold iodine is a useful strategy.

GRAPHICAL ABSTRACT

Combination of the calculation of reactivity descriptors and the cold iodine test for some coumarin derivatives in order to optimize the radioiodination reaction. The strongly nucleophilic predicted coumarins were subjected to the action of cold iodine. With two coumarins substituted at 3 by the 2-hydroxybenzoyl group, iodination did not occur but a product of intramolecular heterocyclization was obtained. This strategy is useful for economic and environmentally friendly radioiodination.



ARTICLE INFO

Keywords:

Coumarin
Electrophilic substitution
Theoretical calculation
Cold-iodination
Radioiodination
Ecofriendly strategy

ABSTRACT

Combination of the calculation of reactivity descriptors and the cold iodine test for some coumarin derivatives was used in order to optimize the radioiodination reaction. The strongly nucleophilic predicted coumarins were subjected to the action of cold iodine. With two coumarins substituted at 3 by the 2-hydroxybenzoyl group, iodination did not occur but a product of intramolecular heterocyclization was obtained. This strategy is useful for economic and environmentally friendly radioiodination.

* Corresponding author. Laboratoire de Physique et Chimie des Matériaux LPCM, Faculté des Sciences, Université Mouloud Mammeri, 15000, Tizi Ouzou, Algeria.

** Corresponding author.

E-mail addresses: makhloufi_malika@yahoo.fr (M. Makhloufi-Chebli), gribhocine@yahoo.fr (H. Grib).

1. Introduction

The challenge for scientists interested in the iodine 125 labeling reactions for screening of novel potent iodinated radiotracers or radiopharmaceuticals is to quickly synthesize, a stable labeled compound, at the lowest cost and in respect of the environment. For these labeling reactions several methods are known (Hanson, 2006; Wager and Jones, 2010; Mushtaq et al., 2016). The molecules submitted to radioiodination are of various types and must give, with a good yield, radioiodinated products which meet the requirements for radiotracer imaging and biodistribution studies. (Wang et al., 2008; Sugiura et al., 2014). The iodination method using chloramine-T (CAT) allows to oxidize the iodide to iodonium cation I^+ and in this case, when the substrate is a nucleophilic molecule, the electrophilic substitution reaction (EAS) is the most appropriate. In addition, electrophilic aromatic substitution is one of the most studied reactions in theoretical chemistry. Indeed, Fukui and other authors (Domingo et al., 2002; Arroyo et al., 2005; Perez et al., 2009; Humberto et al., 2011) have used the frontier of molecular orbital theory (FMO) for the study of these reactions. On the other hand, the iodination test with “cold iodonium” is possible and can be used for the optimization of the radioiodination.

Compounds studied in this work are coumarin derivatives: the coumarin moiety is an important structural motif in natural products and highly bioactive compounds. Coumarin-containing compounds exhibit broad biological activity with, for example, antioxidant, anticoagulant, antifungal, anthelmintic, cytotoxic or hypnotic properties (Riveiro et al., 2010; Mahmoud and El-Remaily, 2015). Coumarins are also widely applied as agrochemicals, cosmetics and food. Because of their fluorescent properties, they are also used as colorants, dye laser media, and as nonlinear optical chromospheres.

Two series of coumarin derivatives were subjected to a theoretical study in order to select the compound which is the more suitable to be labeled with iodine 125. Three of them were synthesized and have suffered an iodination reaction. Unexpected results were found for two compounds. The substrates used are called: 2H-chromen-2-one **1**, 4-methyl-2H-chromen-2-one **2**, 7-hydroxy-2H-chromen-2-one **3**, 7-hydroxy-4-methyl-2H-chromen-2-one **4**, 3-(2-hydroxybenzoyl)-2H-chromen-2-one **5** and 3-(2-hydroxybenzoyl)-2H-benzo[h]chromen-2-one **6** (Fig. 1).

In this work we demonstrate the contribution of theoretical

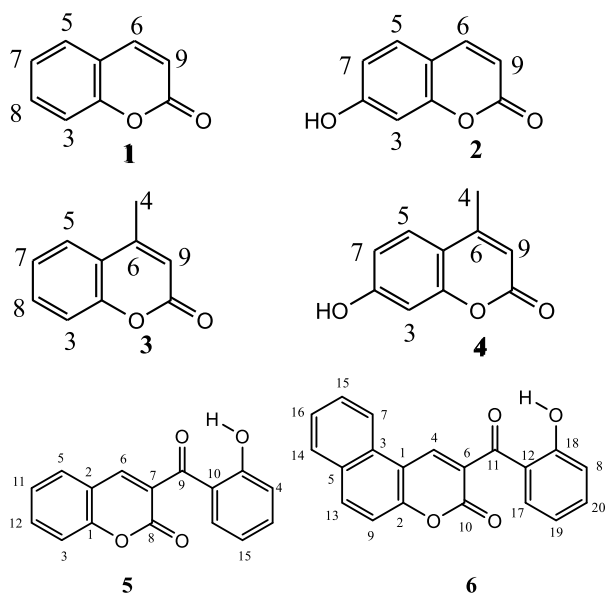


Fig. 1. Structure formula of the studied coumarins 1–6 (Gaussian View numbering).

chemistry and “cold labeling” in the significant reduction of use of chemicals and production of radioactive waste.

2. Experimental

2.1. Materials and Methods

2.1.1. Apparatus

For synthesis, the multimode microwave reactor (a modified microwave oven candy mga20 m) has a single magnetron (2450 MHz) with a maximum delivered power of 800 W. It was directly graduated in W (from 100 to 800 W). Experiments were carried out in a Pyrex reactor fitted with a condenser. During experiments, time, temperature and power were monitored. Temperature was monitored with the aid of an external infra-red IR thermometer (Flashpoint FZ400).

Melting points were determined on a Stuart scientific SPM3 apparatus fitted with a microscope and are uncorrected. IR spectrum was recorded on a BRUKER TENSOR 27 IR spectrometer. 1H and ^{13}C NMR spectra were recorded in DMSO- d_6 solutions on Bruker Avance 300 (300.13 MHz for 1H and 75.47 MHz for ^{13}C) spectrometers. Chemical shifts are reported in parts per million (δ , ppm) using TMS as internal reference. ^{13}C assignments were made using HSQC, and HMBC (delays for one bond and long-range JC/H coupling were optimized for 145 and 7 Hz, respectively). Mass spectra were recorded on a Nermag R10-10C quadrupole mass spectrometer at 70 eV.

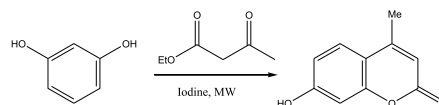
2.1.2. Drugs and chemicals

Iodine 125 was purchased from Institute of Isotopes, Hungary, Chloramine-T (CAT) was purchased from Sigma Chemical Company, USA, 7-hydroxy-4-methyl-2H-chromen-2-one **4**, 3-(2-hydroxybenzoyl)-2H-chromen-2-one **5** and 3-(2-hydroxybenzoyl)-2H-benzo[h]chromen-2-one **6** have been synthesized in our laboratory. Sodium Thiosulfate, resorcinol, salicylaldehyde, 2-hydroxynaphthaldehyde and iodine were purchased from Sigma -Aldrich-USA. All other chemical reagents were of analytical grade (AR) obtained from reputable manufacturers and used without further purification. The structure of the compounds was characterized by IR, 1H NMR, ^{13}C NMR, mass spectroscopy and elemental analysis.

2.2. General procedure for the synthesis of 7-hydroxy-4-methyl-2H-chromen-2-one (**4**)

Among the several known methods for the synthesis of coumarins via the Pechmann reaction (Myano and Dorn, 1972; Khan et al., 2003; Manhas et al., 2006) that which was the most known is carried out in the presence of concentrated sulfuric acid catalyst. However the catalyst result in the formation of by-products, presenting a danger of use and corrosion problems, generating low yields and requiring long reaction time. The synthesis was carried out by a fast, inexpensive and environmentally friendly method (Scheme 1) described by Prajapati and Gohain (2007):

A mixture of resorcinol (1.1 g, 10 mmol), ethyl acetoacetate (1.3 g, 10 mmol) and iodine (0.025 g) was placed in a quartz reaction vessel and allowed to react under microwave irradiations at a temperature of 110 °C for 1.5 min. After completion (monitored by TLC), the reaction mixture was cooled to room temperature and added 6% cold sodium thiosulphate solution and stirred for 10–15 min. The precipitated products were then separated, washed with ice-cold water and recrystallized from hot ethanol to afford 7-hydroxy-4-methyl coumarin **4**



Scheme 1. Synthesis of 7-hydroxy-4-methyl coumarin **4**.

in 95% yield, mp 184–185 °C.

This compound is obtained as pale yellow powder, mp = 184–185 °C, Yield 95%; IR ν (cm⁻¹): 3513 (OH), 3113 (=C–H), 1672 (C=O), 1596 (C=C aromatiques), 1390 (symmetry deformation of CH₃), 1268, 1281 (C–O); ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 2.52 (s, 3H, CH₃), 6.13 (s, 1H, H-3), 6.72 (d, J_{6,8} = 2.4.1H, H -8), 6.81 (dd, J_{6,8} = 2.4, J_{5,6} = 8.4.1H, H-6), 7.59 (d, J_{5,6} = 8.4.1H, H-5), 10.53 (s, 1H, OH). Elemental analysis: Calculated for C₁₀H₈O₃ C 68.18; H 4.58; Found: C 67.92; H 4.62.

2.3. General procedure for friendly oxidative iodination

Radiolabeled compounds were generally synthesized by direct electrophilic substitution with I⁺ (radioiodine) under oxidative conditions in the presence of chloramine-T (CAT). It is known that the high CAT concentration over iodide concentration is necessary to achieve electrophilic substitution. But, this excess of CAT can also give rise to poly-iodination of activated aromatic systems. For the preliminary cold iodination experiments, we studied only the effects of substrate concentrations, iodide, CAT oxidant, and the effect of reaction time. At first we chose the solvents, compatible with the electrophilic substitution reactions and which completely dissolve the substrate and the reagents used. Indeed, each substrate subjected to iodination must be considered as a special case and not to apply without modification the protocols described in the literature for radio-iodination reactions.

This study was conducted by HPLC analyzes; the first tests enabled us to identify the presence of the substrate **4** mono-iodinated and di-iodinated. The optimization of the reaction to obtain a satisfactory yield of mono-iodinated product of **4** was achieved by adopting the protocol described as follows: In a 100 mL flask is introduced 1 mmol of compound **4** at reflux of a solvent mixture (ACN-MeOH v/v) to which NaI (0.15 g, 1 mmol) is added. The mixture is stirred for 5 min at room temperature until complete dissolution, then 5 ml of CAT (0.227 g, 1mmol) were added dropwise over 20 min. A change of colour from yellow to brown appeared. The mixture is heated at 65 °C with magnetic stirring. Progress of the reaction was monitored during 2 h by TLC, and stopped with Na₂S₂O₃ (10%) in order to reduce the unreacted iodine, stirring is maintaining for 10 min; a change of color from dark brown to light brown is observed. After concentration of the reaction mixture, HCl (10%) is added to an acidic pH (1–2) and a solid is formed, then is filtered and washed several times with cold water, dried and purified with diethyl ether. This compound is obtained as orange powder, ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 2.38 (s, 3H, CH₃), 6.18 (s, 1H, H-3), 6.93 (d, J_{5,6} = 8.6.1H, H-6), 7.72 (d, J_{6,5} = 8.6.1H, H-5), 11.37 (s, 1H, OH).

This procedure was identical for compounds **5** and **6** (Both compounds **5** and **6** were recently synthesized in our laboratory [Khatir-Hamdi et al., 2019]) and resulting in compounds **7** and **8**.

2.3.1. 6H,7H-chromeno[4,3-b]chromene-6,7-dione (7)

White-grey powder, Yield 65%; mp 216 °C; I.R ν (cm⁻¹) 1696 (O=C–O), 1500–1600 (C=C aromatic), UV/vis: $\lambda_{\text{abs}1}$ = 292, $\lambda_{\text{abs}2}$ = 318 nm; ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 7.10 (d, 1H, J = 8.31Hz, H-12), 7.40 (m, 3H, H-6, H-8, H-15), 7.81 (m, 2H, H-14, H-7), 8.13 (d, 1H, J = 8.76Hz, H-5), 8.32 (d, 1H, J = 9.33, H-16); ¹³C NMR (DMSO-d₆): δ 104.71 (C-3), 117.38 (C-10), 117.61 (C-13), 122.74 (C-8), 123.72 (C-5), 124.38 (C-15), 125.48 (C-12), 126.47 (C-6), 127.12 (C-16), 135.63(C-7), 138.31 (C-14), 153.99 (C-9), 153.60 (C-2), 155.50(C-11), 164.76 (C-4), 172.46 (C-1), MS (ESI⁺) m/z (%): 265 (65) [M+H]⁺, 287 (100) [M+Na]⁺, 551(26) [2M+Na]⁺, Elemental analysis: Calculated for C₁₆H₈O₄: C 72.73, H 3.05; Found: C 72.77, H 3.02.

2.3.2. 8H,9H-benzo[f]chromeno[3,2-c]chromene-8,9-dione (8)

Light brown powder, Yield 75%; mp 287 °C; I.R ν (cm⁻¹) 1737(O=C–O), 1500–1600 (C=C-aromatic); UV/vis: $\lambda_{\text{abs}1}$ = 363, $\lambda_{\text{abs}2}$ = 374 nm; ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 7.58 (d, 1H, J = 8.88Hz, H-8), 7.62 (d, 1H,

J = 7.65Hz, H-7), 7.65 (t, 1H, H-18), 7.86 (t, 1H, H-12), 7.93 (t, 1H, H-13), 8.11 (m, 3H, H-16, H-17, H-19), 8.38 (d, 1H, J = 9.00Hz, H-14), 9.34 (d,1H, J = 8.76Hz, H-11); ¹³C NMR (DMSO-d₆): δ 104.29 (C-3), 106.29 (C-8), 116.94 (C-18), 116.57 (C-11), 118.57 (C-20), 123.60 (C-13), 125.28 (C-17), 125.59 (C-10), 126.59 (C-21), 126.66 (C-12), 127.98 (C-14),129.72 (C-6), 130.03 (C-7), 134.99 (C-5), 137.80 (C-19), 153.86 (C-9), 155.24(C-2), 155.78 (C-15), 167.59 (C-4), 172.53 (C-1); MS (ESI⁺) m/z (%): 315 (95) [M+H]⁺, 337 (100) [M+Na]⁺, 651 (63) [M+Na]⁺, Elemental analysis: Calculated for: C₂₀H₁₀O₄: C 72.26, H 8.49; Found: C 72.32, H 8.45.

2.4. Cold

The latter protocol was reproduced in a low reaction volume (= 1mL so that it is applicable with ¹²⁵I) and equimolar amounts of **4**, NaI and CAT (2.10⁻⁶ mol), with initial heating at 100 °C for 3min then 20 min at 60 °C, reaction was stopped with Na₂S₂O₃ (10%), HCl (10%) is added to an acidic pH (1–2) and a solid is formed, the sediment is recovered after centrifugation and washed with 100 μ L of dilute hydrochloric acid solution to remove any traces of unreacted iodine.

This synthesis was what we called “a cold iodination” or “a cold labeling” (with non-radioactive iodine) by adopting the traditional protocol of ¹²⁵I (Sallam and Mehany, 2009; Lokhande et al., 2011). Analysis of the separated product reveals that iodinated **4** is obtained in a proportion of about 90%. This result is satisfactory, therefore, and has been adopted for the radioactive labeling with ¹²⁵I.

2.5. Iodine labeling

Direct electrophilic substitution reaction of **4** was done using ¹²⁵I under oxidative conditions in the presence of chloramine-T (CAT) (Al-Momani et al., 2010; Moustapha et al., 2013).

The radioactive labeling protocol must be compatible with the constraints imposed by the handling of radioisotopes: the heating time must be reduced to the maximum, the volume of the reaction mixture must be low, the radio iodination will be more efficient, generally we work with a volume less than 100 μ L and a maximum of 2 mL (Ardissou et al., 2005).It is therefore a labeling reaction which was carried out on a small scale as follows:

In a tightly stoppered glass tube compound **4** (2.10⁻⁶ mol) was dissolved in 20 μ L of a solution of acetonitrile: methanol (v/v) and was added to 6 μ L of Na ¹²⁵I(0.5 mCi). A freshly 100 μ L prepared solution of CAT in distilled water (2.10⁻⁶ mol) was added. After 3 min reaction time at 100 °C and 20 min at 60 °C, the reaction was stopped using 0.2N Na₂S₂O₃ solutions to ensure that the unreacted iodine was reduced. The reaction mixture was acidified with 4–5 μ L of a dilute hydrochloric acid solution and then centrifuged. The sediment was washed with 100 μ L of a dilute hydrochloric acid solution in order to eliminate the unreacted iodine. The sediment was dissolved in 40 μ L of a mixture of dichloromethane: methanol (v/v). Aliquot fraction of both dissolved sediment and supernatant were taken for measurement of radioactivity from which the radiochemical yield percent was determinate using an activimeter. The radiochemical purity was determinate by paper chromatography.

3. Theory and computational details

The computational chemistry method offers a unique ability to generate optimal geometry structures, and this through the structural and electronic properties of the reagents and products, it can predict with more or less accuracy which chemical transformations will occur in reaction.

Chemical reactivity studies based on the Hard and Soft Acid-Base (HSAB) principle have played a leading role in explaining the chemical behavior in many molecular systems. HSAB principle becomes relevant, in conjunction with the Density Functional Theory (DFT) framework, to

quantitatively describe the global and local parameters directly related the chemical reactivity of molecular species. This theory based local reactivity indicators have become very useful in understanding the details of several classes of chemical reactions (Roy et al., 1998; Chandra and Nguyen, 2002; Faver and Merz, 2010). From the theoretical point view, it was demonstrated that the DFT B3LYP is a reliable method for the calculation of geometries and energies of aromatic heterocycles. The main indexes used in this contribution are given with their definition but without any mathematical proof.

The theoretical investigation presented in this work is based on the calculation of global and local nucleophilicity parameters to facilitate elucidating the mechanism of iodination reaction.

3.1. Global reactivity descriptors

The electronic chemical potential μ is associated with the feasibility of a system to exchange electron density with the environment (Domingo et al., 2016) and Domingo et al., 2012 at the ground state has also identified with the negative Mulliken electronegativity ($-X$), it can be expressed as:

$$\mu = -X = E_{\text{Homo}} + E_{\text{Lumo}} / 2 \quad (1)$$

The chemical hardness η can be thought as a resistance of a molecule to exchange electron density with the environment.

$$\eta = E_{\text{Lumo}} - E_{\text{Homo}} \quad (2)$$

On the other hand, the chemical softness S was introduced as the inverse of the chemical hardness η :

$$S = 1/2\eta \quad (3)$$

The electrophilicity ω global index gives of the energy stabilization of a molecule when it acquires an additional amount of electron density from the environment. This index is given by the expression:

$$\omega = \mu^2 / 2\eta \quad (4)$$

The maximum number ΔN_{max} of electrons that an electrophile can acquire is given by the expression:

$$\Delta N_{\text{max}} = -\mu / \eta \quad (5)$$

3.2. Local reactivity descriptors

The Fukui function $f(k)$ represents the changes in electron density at a point k with respect to the variation of the number of electrons N at a fixed external potential. In the literature most studies have been carried out in the finite difference method, in which the local quantities such as Fukui functions $f(k)$ define the reactivity and selectivity of a specific site in a molecule are as approximated.

$$f_k^- = [q_k(N) - q_k(N-1)] \quad (6)$$

$$f_k^+ = [q_k(N+1) - q_k(N)] \quad (7)$$

where q_k is the electronic population atom k in a molecule evaluated

from Mulliken population analysis(MPA), natural population analysis (NPA) and electrostatic charge(ESP) derived atomic population analysis at the k the atomic site in the neutral (N), anionic (N + 1) or cationic(N-1) in a molecule.

$$N = E_{\text{Homo}}(\text{Nucleophilic}) - E_{\text{Homo}}(\text{TCE}) \quad (8)$$

The empirical relative nucleophilicity index N is referred to tetra-cyanoethylene (TCE).This choice allowed convenient handling of a nucleophilicity scale of positive values.

3.3. Local nucleophilicity parameter

The local nucleophilicity parameter based on the nucleophilic Fukui function f_k^- is defined as:

$$N_k = N f_k^- \quad (9)$$

where N is the global nucleophilicity index. This parameter defining the local nucleophilicity is used in this contribution for the prediction of the favored site of the coumarins in electrophilic aromatic substitution reactions.

3.4. Computational details

The quantum chemistry calculations reported in this contribution have been performed at B3LYP/6-311 + g (d,p) level of theory using the Gaussian 09.Revision A 02-SMP (Frisch et al., 2016). Stationary points found were characterized as true minima by frequency calculations. The cationic and anionic systems required in the calculations of local indices were kept at the same geometry of the neutral system. The electronic populations were computed using the MPA, MK and NPA.

4. Results and discussion

4.1. Relative reactivities

The values of global reactivity descriptors μ, η, ω, S and N were calculated employing equations (1)–(4) and (8) respectively (see Table 1). By analyzing the nucleophilicity values N for these compounds, it can be noted:

The nucleophilicity power increases from compound 1 to 4 indicating that coumarin 4 of this series is most nucleophilic molecule $N=2.97$ eV. The same trends are obtained for 5 and 6 coumarins. Indeed compound 6 is predicted to be more nucleophilic $N=2.98$ eV than compound 5 $N=2.86$ eV.

The nucleophilic character of these compounds 1–6 is consistent with calculated electronic potential μ (Table 1) showing that 4 $\mu = -4.26$ eV is characterized by the highest chemical potential followed by 3 $\mu = -4.36$ eV and 2 $\mu = -2.48$ eV respectively. On the other hand, it can be noted the substitution of heteroatomic compound by an electro-donating group (i.e. Me, OH ...) yields to an increase of the nucleophilicity as remarked in compounds 1–4.

Consequently the first series 1–4 is predicted to be reactive in electrophilic aromatic substitution reactions (EASs). Note that, compound 6 with a benzo fused coumarin skeleton (extended electron

Table 1

HOMO and LUMO energies, and global reactivity indices, μ , η , ω , S and N for compounds 1–6 calculated at the B3LYP/6-311 + g(d, p).

Compound	HOMO (eV)	LUMO (eV)	μ (eV)	η (eV)	ω (eV)	S (eV)	N^a (eV)
1	-6.8895	-2.3073	-4.5984	4.5822	2.3073	0.1091	2.5984
2	-6.7902	-2.1658	-4.4780	4.6244	2.1681	0.1081	2.6978
3	-6.5654	-2.1448	-4.3551	4.4206	2.1453	0.1131	2.9226
4	-6.5137	-2.0167	-4.2652	4.4971	2.0227	0.1111	2.9743
5	-6.6253	-2.6208	-4.6230	4.0045	2.6686	0.1249	2.8627
6	-6.5031	-2.8875	-4.6953	3.6157	3.0486	0.1383	2.9849

^aThe HOMO energy -9.4880 eV of the reference system (TCE) had been calculated at the same computational level.

Table 2
Nucleophilic Fukui functions f_k^- and local nucleophilicity values N_k calculated by using different population analysis.

Compound	Mulliken population (MPA)		Electrostatic population (MK)		Natural population (NPA)		
	f_k^-	N_k	f_k^-	N_k	f_k^-	N_k	
1	C3	0.017	0.044	0.028	0.073	0.008	0.021
	C5	0.070	0.182	-0.037	-0.096	-0.018	-0.047
	C6	0.040	0.104	0.005	0.013	0.001	0.003
	C7	0.068	0.177	0.187	0.486	0.149	0.387
	C8	0.059	0.153	0.034	0.088	0.077	0.200
2	C9	0.094	0.244	0.130	0.338	0.120	0.312
	C3	0.001	0.003	0.026	0.070	0.006	0.016
	C5	0.093	0.251	-0.036	-0.097	-0.015	-0.040
	C7	0.084	0.227	0.188	0.507	0.137	0.369
	C8	0.071	0.192	0.00	0.024	0.080	0.216
3	C9	0.099	0.267	0.174	0.469	0.130	0.353
	C3	0.047	0.137	0.004	0.012	0.019	0.055
	C5	0.022	0.064	-0.079	-0.231	-0.006	-0.017
	C6	0.023	0.067	0.004	0.012	-0.009	-0.026
	C7	0.076	0.222	0.150	0.438	0.109	0.319
4	C9	0.120	0.351	0.194	0.567	0.165	0.482
	C3	0.018	0.054	0.044	0.131	0.019	0.057
	C5	0.012	0.036	-0.021	-0.062	0.004	0.012
	C7	0.087	0.259	0.147	0.437	0.103	0.306
C9	0.081	0.241	0.229	0.681	0.168	0.500	

cloud) is predicted to be most nucleophilic ($\mu = -4.6953$ eV) than 5 ($\mu = -4.6230$ eV). It is clear that the values of the global reactivity parameters depend on the level of theory used.

Local quantities such as Fukui f_k^- (Eq: 6–7) defined the reactivity and selectivity of a specific site in a molecule. The local nucleophilicity N_k (Eq: 9) is used for the prediction of the favored site in electrophilic attack.

The analysis of the local nucleophilicity N_k of the first series 1–4 (Table 2) show that N_7 and N_9 would be locations where an electrophilic attack is more probable than a nucleophilic attack. Indeed, this parameter calculated using MK and NPA for compounds 1–4 has the largest values (in bold in Table 3). In this same series we have indicated that compound 4 is predicted to be more nucleophilic $N = 2.97$ eV. This

Table 3
Nucleophilic Fukui functions f_k^- and local nucleophilicity values N_k at the different sites of two systems 5 and 6 calculated using different population analyses. The values of local nucleophilicity indexes of benzoyl group are given in bold.

Compound	Mulliken population (MPA)		Electrostatic population (MK)		Natural population (NPA)		
	f_k^-	N_k	f_k^-	N_k	f_k^-	N_k	
5	C3	0.018	0.052	-0.009	-0.026	0.003	0.009
	C4	0.047	0.135	0.097	0.278	0.030	0.086
	C5	0.031	0.089	-0.005	-0.014	0.013	0.037
	C6	0.033	0.094	0.041	0.117	0.276	0.790
	C11	0.048	0.137	0.078	0.223	0.026	0.079
	C12	0.036	0.103	0.054	0.155	0.047	0.135
	C13	0.027	0.077	0.010	0.046	-0.064	-0.183
	C15	0.068	0.195	0.162	0.464	0.173	0.495
	C16	0.020	0.057	-0.051	-0.146	0.046	0.132
	6	C4	0.014	0.042	-0.009	-0.027	0.155
C7		0.036	0.107	0.054	0.161	0.063	0.188
C8		0.013	0.039	0.061	0.182	0.047	0.140
C9		0.004	0.012	0.025	0.075	0.020	0.060
C13		0.04	0.120	0.088	0.263	0.061	0.182
C14		0.055	0.164	0.087	0.260	0.058	0.173
C15		0.01	0.042	0.035	0.104	0.024	0.071
C16		0.028	0.084	0.030	0.089	0.045	0.134
C17		-0.004	-0.012	-0.043	-0.128	-0.002	-0.006
C19		0.069	0.206	0.128	0.382	0.092	0.275
C20		0.005	0.015	-0.007	-0.021	0.010	0.030

result agrees completely with experience since its mono, di and tri-iodo derivatives have been synthesized (Lele and Sethna, 1956).

For both compounds hybrids 5 and 6, for the sake of clarity, we compare the sites of the groups of functions of each of the two molecules. Thus for the 2-hydroxybenzoyl function the values of N_k (calculated by NPA) are distributed as follows (in bold in Table 3):

The analysis of nucleophilicity indices given N_k in tableau 3 above show that $N_8(6) < N_{19}(6)$ in position ortho and para/OH, in the same positions $N_4(5) < N_{15}(5)$. It is interesting to note that in 2-hydroxybenzoyl function the OH (electron-releasing ER) is strongly activating but the carbonyl group (electron-withdrawing WG) is moderately deactivating. On the other hand, it is known, when several substituents exist on a cycle: the strongest activating is the one that directs the position of the electrophile on the cycle. Strongly activating groups exert a stronger influence than deactivating or weakly activating groups. Consequently, the N_8, N_{19} of 6 and N_4, N_{15} of 5 values obtained are the highest in Table 3 and predicted to be reactive in EASs.

For both functions coumarin of 5 and benzocoumarin of 6 the N_k values calculated by (NPA) are listed in Table 3. The analysis of these values shows that:

The $N_6(5)$ and $N_4(6)$, with the highest value of the local nucleophilicity index would be locations where an electrophilic attack is more probable. The extended electronic cloud in 6 gives the expected result $N_{13}(6) > N_{12}(5)$. On the other hand, Table 3 shows that $N_{15}(6)$ and $N_9(6)$ with the lowest value of the nucleophilicity and it is the same for $N_3(5)$ and $N_5(5)$.

The relative reactivities of compounds 1–6 in EAS reactions have been studied by means of the global nucleophilicity index. It turns out from the present study that the compounds 4, 5 and 6 are good candidates for electrophilic substitution with iodonium ion. In order to optimize the radio-iodination reaction and to invalidate or confirm the results of the theory we have, therefore, performed the iodination reaction of 4, 5 and 6 under the conditions involving the “cold iodonium ion”.

4.2. HPLC analysis

The chromatogram of compound 4 and iodinated 4 are mentioned in Fig. 2 and Fig. 3.

Fig. 2 shows the presence of a single peak corresponding to compound 4 with an area of 97.99% and a retention time R_t of 3.71 min. The peak corresponding to the iodinated compound 4 (Fig. 3) is eluted after 5.15 min; the area of the peak is estimated at 94.44%.

An increase in the retention time is therefore observed for compound 4 mono-iodinated. The peak corresponding to the unreacted compound 4 is present in low concentration on the chromatogram (5.56%). HPLC analysis has made it possible to demonstrate the lipophilic character of the mono-iodinated compound 4: indeed, an iodinated compound has its retention time increased. No second peak was observed on the chromatogram of the iodinated compound 4 which can correspond to the diiodinated compound 4; this analysis therefore confirms the production of the mono-iodinated compound 4 as the majority product according to the adopted protocol.

The HPLC analysis was performed to analyse non-radioactive 4 iodinated by injection of 10 μ L of purified solution into the column (RP-18.150x4.6mm) and the UV spectrophotometer detector. The column was eluted with mobile phase a mixture of acetonitrile: water (70% acetonitrile, 30% water), and the flow rate was adjusted to 1.0 mL/min.

The ^1H NMR spectrum of the iodinated compound 4 confirms mono-iodination at position 3, in fact the peak at 6.72 ppm observed in the spectrum of compound 4 is absent in this spectrum. The protocol adopted made it possible to obtain 4 mono-iodine as the majority product and the di-iodinated in a very small proportion.

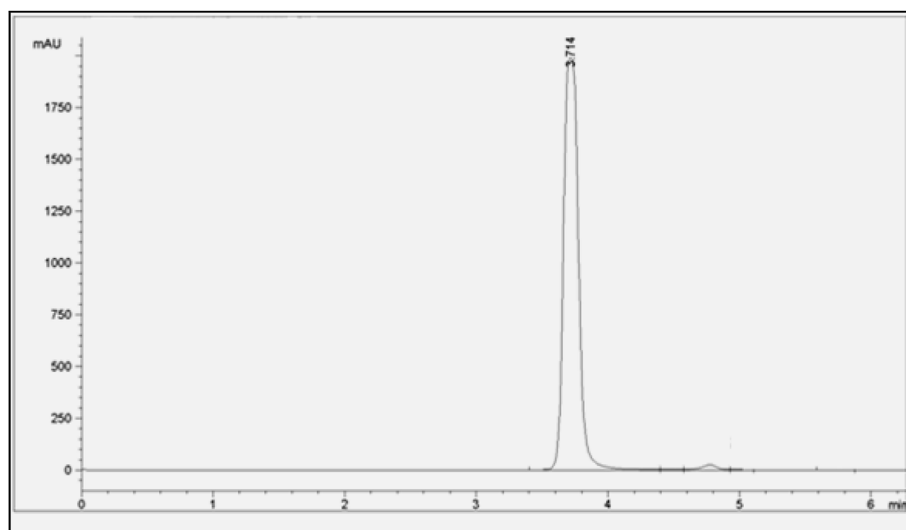


Fig. 2. HPLC analysis of compound 4.

4.3. Radiolabeling of compound 4

4.3.1. Radiochemical purity

Fig. 4 shows that the radiochemical purity percent of the radioiodinated 4 was 99.98%.

For the paper chromatography, the free radioiodide (I^-) remained near the origin, while the radioiodinated 4 moved with the solvent front.

Paper chromatography were used to determine the radiochemical purity obtained: strips of precoated (0.75 mm) silica gel 60 F₂₅₄ plates were used, 1–2 μ L of the reaction mixture (sediment dissolved in dichloromethane/MeOH) was placed 2 cm above the lower edge of a paper strip (1 cm width and 13 cm length), and allowed to evaporate spontaneously. Fresh mixture of Dichloromethane/MeOH (5:1) was used as a mobile phase. After complete development, the paper strips were removed, dried, and coated with cello-bands and were cut into 0.5 cm sections, they were counted by an NaI(Tl) γ -ray scintillation counter. ITLC chromatogram was obtained from these counts. The radiochemical yield percent of labeling of compound 4 was calculated from counts of the fractions of supernatant and the fractions of sediment which gives 64.5% (Table 4). Iodination and radiolabeling of 4 were easy and expected results were observed.

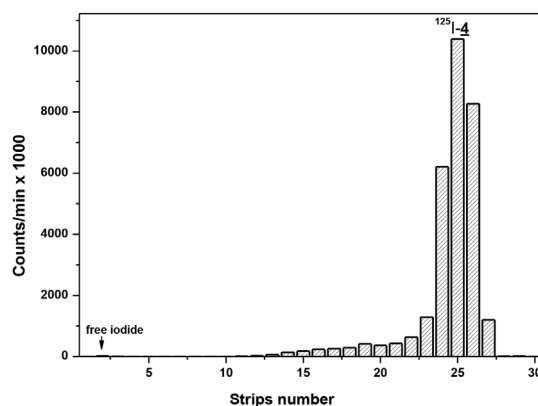


Fig. 4. Radiochemical purity of radioiodinated 4 tracer using paper chromatography.

4.4. Iodination of compounds 5 and 6

We have shown following the results of the theoretical study that compounds 5 and 6 are, like compound 4, predicted to be reactive in

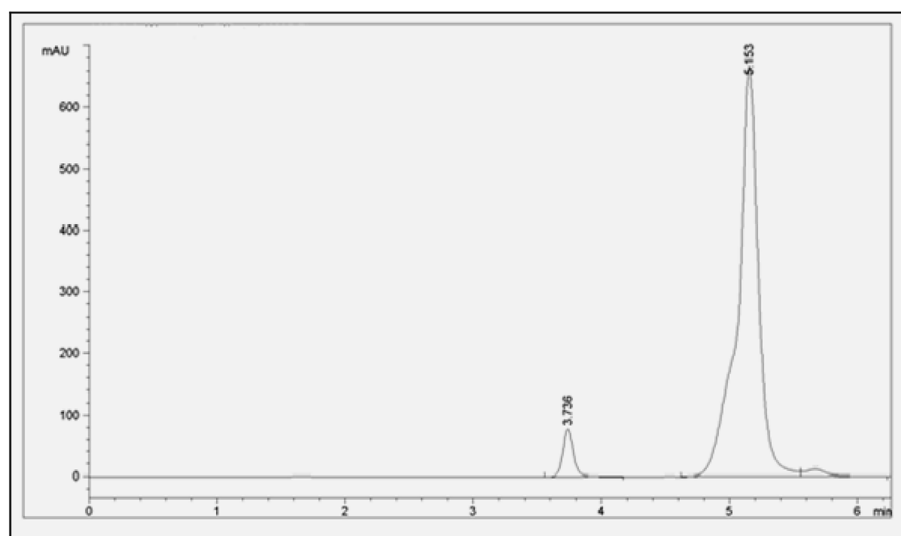


Fig. 3. HPLC analysis of iodinated compound 4.

Table 4
Radiochemical yield percent of the obtained¹²⁵I-4.

Total activity (μCi)	Counts of supernatant fractions (μCi)	Counts of precipitating fractions (μCi)	Radiochemical yield%
517.8	133.47	333.88	64.5

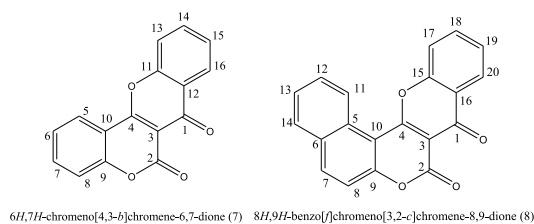


Fig. 5. Chemical structure of compounds 7 and 8.

the electrophilic substitution reaction. We then tried, at first, the iodination reaction of “cold” iodine according to the same protocol described for 4. The result of the reaction would therefore be an iodinated product. The structure of obtained compound 7 was confirmed by masse spectra and ¹H and ¹³C NMR data. To our surprise the compound 7 obtained is not iodinated.

The mass spectrometry confirms that 7 is obtained from 5 by loss of a dihydrogen molecule. Indeed, the presence of the peaks at *m/z* 265 (65%), 287 (100%) and 551 (26%) correspond to ions (M + H)⁺, (M + Na)⁺ and (2M + Na)⁺. The new product 7 (C₁₆H₈O₄, M = 264) is obtained with yield of 65%. The iodination reaction did not take place and the loss of a dihydrogen molecule suggests the cyclization of 5 (Scheme 3) to give a new product 6*H*,7*H*-chromeno[4,3-*b*]chromene-6,7-dione 7 (Fig. 5).

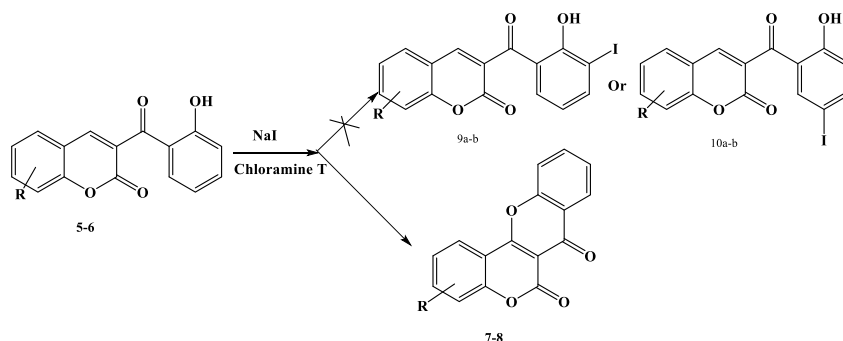
The ¹H NMR spectrum of this compound indicates that the resonance of –OH group and H-4 was not observed and confirms the disappearance of the proton signal.

The same phenomenon was observed on compound 6, the structure of obtained compound 8 was confirmed by masse spectra, ¹H and ¹³C NMR data. The compound 8 obtained is not iodinated and its mass shows a loss of a dihydrogen molecule relative to the mass of the product 6. The new product (C₂₀H₁₀O₄, M = 314) was obtained with good yield 75%, it is not iodinated and suggests the cyclization of 6 (Scheme 2) afforded 8*H*,9*H*-benzo[*f*]chromeno[3,2-*c*]chromene-8,9-dione 8 (Fig. 5).

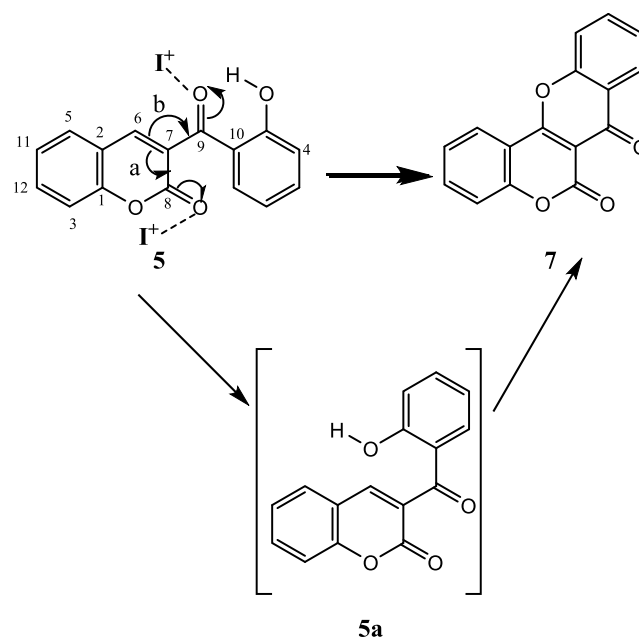
4.5. Mechanism reaction

The mechanism of the reaction can be explained by the approach of the ions I⁺ formed by oxidation of anions I⁻ ions by chloramine T to the carbonyl electron-withdrawing pole of coumarin followed by an intramolecular cyclization to form the compounds 7 and 8 (Scheme 2).

In order to confirm this mechanism, the reaction was repeated with



Scheme 2. Synthesis of compounds 7 and 8 catalysed by NaI in the presence of chloramine T.



Scheme 3. Mechanism proposal for the formation 6*H*,7*H*-chromeno[4,3-*b*]chromene-6,7-dione 7.

compound 5 in the presence of I₂ and concentrated H₂SO₄ in DMSO with reflux heating. The isolated product of this reaction is identical to compound 7.

The theoretical calculations (Khatir-Hamdi et al., 2019) have shown that the optimized structure of 5 shows that the coumarin ring and the benzoyl group are not in the same plane. Indeed, the dihedral angle C₈C₇C₉C₁₀ is 51.88°. The cyclization imposes a molecular rearrangement which involves a rotation around the bond C₇-C₉ to give a rotamer 5a (Scheme 3). The latter would not be obtained by the pathway b which involves the formation of the double bond C₇ = C₉.

The pathway b does not allow this rearrangement, all the more as the high electron density is concentrated between the two oxygen atoms of the coumarin cycle. The local nucleophilicity calculations for 5 gave N₆(5) = 0.790 and for 6 N₄(6) = 0.463 these sites are, therefore, predicted to be favorable for electrophilic attack, but the experience shows that it is the cyclization that takes place and the iodination

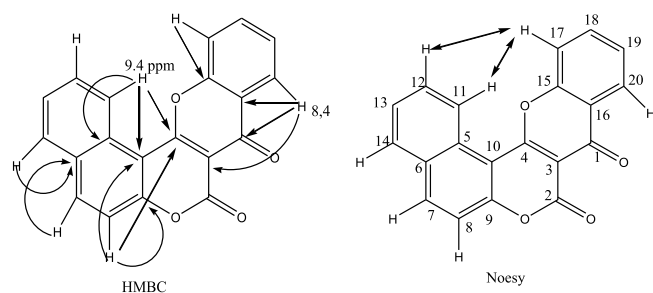


Fig. 6. Main HMBC and NOESY correlations of **8**.

reaction did not happen.

4.5.1. Main HMBC and NOESY correlations of 8*H*,9*H*-benzo[*f*]chromeno[3,2-*c*]chromene-8,9-dione (**8**)

The structures and purities of the products obtained were deduced from their NMR spectra (extended 2D NMR analyses: HSQC, HMBC and NOESY), and mass spectrometry data. As a representative example, the ^1H NMR spectrum of **8** exhibited the absence of singlet at 8–9 ppm and broad peak at 11–12 ppm corresponding to H-4 of coumarin and phenolic OH respectively. The aromatic and benzopyran-2-one protons are conserved and appear with a slight shift towards the weak fields at 7.58–9.34 ppm. The NOESY spectrum of **8** did not allow us to conclude that the compound obtained underwent intramolecular cyclization, since NOE effects were observed between (H-17, H-11) and (H-18, H-11) (Fig. 6).

The HMBC connectivities of **8** were the key to proof the structure of the compound obtained; namely that between H-8 and C-4 carbon, which is also correlated with H-11 (Fig. 6). These correlations are compatible with structure **8**. The HMBC connectivities of **8** have unequivocally assigned all of their carbon resonances (Fig. 6). All the data described for compound **8** are similar to the other of compound **7** which allowed us to conclude that we obtained only the cyclized compounds and not the iodine compounds. All these data supports the structure of 8*H*,9*H*-benzo[*f*]chromeno[3,2-*c*]chromene-8,9-dione (**8**)

5. Conclusion

The results obtained permit the following conclusions:

The use of a theoretical study of the electrophilic aromatic substitution reaction allows classifying the target molecules according to their nucleophilicity and gives the most reactive sites with iodonium I⁺ cation. However, it must be admitted that the presence of iodine in a reaction medium can induce unpredictable reactions. For this last reason the non-radioactive iodine labeling reaction is recommended.

Compound **4**, which have been predicted to be the most nucleophilic and its predicted sites most likely to bind the iodonium ion, have been suitably labeled with cold and radioactive iodine. The tests were conducted under the conditions of volume, temperature and time most favorable to radiolabeling. The theoretical study of the two hybrid compounds **5** and **6** predicted the target sites of iodination but the cold iodine labeling experiment revealed their particular behavior and two new non-iodized products were characterized.

The combination of theoretical study and cold iodine labeling technique can be usefully applied in radiolabeling reactions. The nucleophilic character and target sites of iodonium are predicted by a calculation that is often fast and inexpensive. Non-radioactive iodine tests can confirm or rule out the iodination reaction. Thus, this proposed method predicts the behavior of molecules in electrophilic aromatic substitution (EAS) reactions and at the same time it allows the economical and environmentally friendly use of radioactive iodine.

References

- Mahmoud, A.A., El –Remaily, A., 2015. Bismuth triflate highly efficient catalyst for the synthesis of bio-active coumarin compounds via one-pot multi-component Reaction Chinese. *J. Catal.* 36, 1124–1130. [https://doi.org/10.1016/S1872-2067\(14\)60308-9](https://doi.org/10.1016/S1872-2067(14)60308-9).
- Al-Momani, E., Zlatopolskiy Solbach, B.D., Resk, S.N., Machulla, H.J., 2010. Synthesis of 15-(4-[^{131}I]iodophenyl)pentadecanoic acid (*p*-IPPA) via tin-precursor using Chloramine-T as an oxidant. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 286 (1), 231–234. <https://doi.org/10.1007/s10967-010-0643-0>.
- Ardissou, V., Mathieu, J.P., Ghezzi, Fagret, D., 2005. TEMP: les possibilités de marquage à l'iode 123 ou au technétium. *Med. Nucl.* 29, 168–180.
- Arroyo, P., Picher, M.T., Domingo, L.R., Terrier, F.T., 2005. A DFT study of the polar Dicks-Alder reactions a between 4-*a*2-*a*-6-nitrobenzofuran and cyclopentadine. *Tetrahedron* 61, 7359–7365. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.05.080>.
- Chandra, A.K., Nguyen, M.T., 2002. Use of local softness for the interpretation of reaction mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* 3, 310–323. <https://doi.org/10.3390/13040310>.
- Domingo, L.R., Aurell, M.J., Perez, P., Contreras, R., 2002. Quantitative characterization of the global electrophilicity power of common diene/dienophile pairs in Diels–Alder reactions. *Tetrahedron* 58 (22), 4417–4423. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(02\)00410-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(02)00410-6).
- Domingo, L.R., Zaragoza, R.J., Saez, J.A., Arno, M., 2012. Understanding the mechanism of the intramolecular stetter reaction. A DFT study. *Molecules* 17 (2), 1335–1353. <https://doi.org/10.3390/molecules17021335>.
- Domingo, L.R., Ríos-Gutiérrez, M., Patricia, P., 2016. Applications of the conceptual density functional theory indices to organic chemistry reactivity. *Molecules* 21 (6), 748–770. <https://doi.org/10.3390/molecules21060748>.
- Faver, J., Merz Jr., K.M., 2010. The utility of the HSAB principle via the Fukui function in biological systems. *J. Chem. Theory Comput.* 6 (2), 548–559. <https://doi.org/10.1021/ct9005085>.
- Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Scalmani, G., Barone, V., Petersson, G.A., Nakatsuji, H., Li, X., Caricato, M., Marenich, A.V., Bloino, J., Janesko, B.G., Gomperts, R., Mennucci, B., Hratchian, H.P., Ortiz, J.V., Izmaylov, A.F., Sonnenberg, J.L., Williams-Young, D., Ding, F., Lipparini, F., Egidi, F., Goings, J., Peng, B., Petrone, A., Henderson, T., Ranasinghe, D., Zakrzewski, V.G., Gao, J., Rega, N., Zheng, G., Liang, W., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Throssell, K., Montgomery Jr., J.A., Peralta, J.E., Ogliaro, F., Bearpark, M.J., Heyd, J.J., Brothers, E.N., Kudin, K.N., Staroverov, V.N., Keith, T.A., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A.P., Burant, J.C., Iyengar, S.S., Tomasi, J., Cossi, M., Millam, J.M., Klene, M., Adamo, C., Cammi, R., Ochterski, J.W., Martin, R.L., Morokuma, K., Farkas, O., Foresman, J.B., Fox, D.J., 2016. Gaussian, Inc., Wallingford CT.
- Hanson, J.R., 2006. Advances in the direct iodination of aromatic compounds. *J. Chem. Res.* 5 (4), 277–280. <https://doi.org/10.3184/03082340677410981>.
- Humberto, L., Huizar, M., Rios-Reyes, C.H., 2011. Chemical reactivity of atrazine employing the Fukui function. *J. Mex. Chem. Soc.* 55 (3), 142–147.
- Khan, K.M., Saifi, Z.S., Begum, S., Noor, F., Khan, M.Z., Hayat, S., Choudhary, M.I., Perveen, S., Zia-Ullah, Atta-Ur-Rahman, 2003. Synthesis and biological screening of 7-hydroxy-4-methyl-2*H*-Chromen-2-One, 7-hydroxy-4,5-dimethyl-2*H*-Chromen-2-One and their some derivatives. *Nat. Prod. Lett.* 17 (2), 115–125. <https://doi.org/10.1080/1478641031000103704>.
- Khatir-Hamdi, N., Makhoulfi-Chebli, M., Grib, H., Brahimi, M., Silva, A.M.S., 2019. Synthesis DFT/TD-DFT theoretical studies and experimental solvatochromic shift methods on determination of ground and excited state dipole moments of 3-(2-hydroxybenzoyl)coumarins. *J. Mol. Struct.* 1175, 811–820. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.08.039>.
- Lele, S.S., Sethna, S., 1956. Iodination of 7-hydroxy-, and 5-Hydroxy-4-methylcoumarin and their methyl ethers. *J. Org.* 23 (11), 1731–1734. <https://doi.org/10.1021/jo01105a041>.
- Lokhande, P., Hasanzadeh, K., Konda, S.G., 2011. A novel and efficient approach for the synthesis of new halo substituted 2-arylpyrazolo[4,3-*c*] coumarin derivatives. *European Journal of Chemistry. Eur J Chem* 2 (2), 223–228. <https://doi.org/10.5155/eurjchem.2.2.223-228.336>.
- Manhas, M.S., Ganguly, S.N., Mukherjee, S., Jain, A.K., Bose, A.K., 2006. Microwave initiated reactions: Pechmann coumarin synthesis, Biginelli reaction, and acylation. *Tetrahedron Lett.* 47 (14), 2423–2425. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.01.147>.
- Moustapha, M.E., Motaleb, M.A., Ibrahim, I.T., Moustafa, M.E., 2013. Oxidative radio-iodination of aripiprazole by chloramine-T as a route to a potential brain imaging agent: a mechanistic approach. *Radiochemistry* 55, 116–122.
- Mushtaq, S., Jeon, J., Shaheen, A., Jang, B.S., park, S.H., 2016. Critical analysis of radioiodination techniques for micro and macro organic molecules. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 309 (2), 859–889. <https://doi.org/10.1007/s10967-015-4679-z>.
- Myano, M., Dorn, C.R., 1972. Mirestrol. I. preparation of the tricyclic intermediate. *J. Org. Chem.* 37 (2), 259–268. <https://doi.org/10.1021/jo00967a017>.
- Perez, P., Domingo, L.R., Duque-Noreña, M., Chamorro, E., 2009. A condensed-to-atom nucleophilicity index. An application to the director effects on the electrophilic aromatic substitutions. *J. Mol. Struct. Theochem.* 859 (1–3), 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.theochem.2008.10.014>.
- Prajapati, D., Gohain, M., 2007. Iodine a simple, effective and inexpensive catalyst for the synthesis of substituted coumarins. *Catal. Lett.* 119, 59–63. <https://doi.org/10.1007/s10562-007-9186-6>.
- Riveiro, M.E., De Kimpe, N., Moglioni, A., Vasquez, R., Monczor, F., Shayo, C., Davio, C., 2010. Coumarins: old compounds with novel promising therapeutic perspectives. *Curr. Med. Chem.* 17 (13), 1325–1338. <https://doi.org/10.2174/>

- 092986710790936284.
- Roy, R.K., Krishnamurti, S., Geerlings, P., Pal, S., 1998. Local softness and hardness based reactivity descriptors for predicting intra- and intermolecular reactivity sequences: carbonyl compounds. *J. Phys. Chem. A* 102 (21), 3746–3755. <https://doi.org/10.1021/jp973450v>.
- Sallam, Kh M., Mehany, N.L., 2009. Comparison study between direct and indirect labeling of estradiol for ra-dioimmunoassay purpose. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 281 (3), 329–337. <https://doi.org/10.1007/s10967-009-0013-y>.
- Sugiura, G., Kühn, H., Sauter, M., Haberkorn, U., Mier, W., 2014. Radiolabeling strategies for tumor-targeting proteinaceous drugs. *Molecules* 19, 2135–2165. <https://doi.org/10.3390/molecules19022135>.
- Wager, K.M., Jones, G.B., 2010. Radio-iodination methods for the production of SPECT imaging agents. *Curr. Radiopharm.* 3 (1), 37–45. <https://doi.org/10.2174/1874471011003010037>.
- Wang, K., Adelstein, S.J., Kassis, A.I., 2008. DMSO increases radioiodination yield of radiopharmaceuticals. *Appl. Radiat. Isot.* 66 (1), 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2007.07.026>.