

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DE MOULOUZ MAMMERI DE TIZI-OUZOU



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

Thèse de Doctorat LMD

Filière : CHIMIE

Spécialité : Chimie des Matériaux et de l'Environnement

Option : Chimie Pharmaceutique

Présentée par

M^{me} BENZAOUZ-TOUAMI Amina.

Synthèse de nouvelles séries hétérocycliques d'intérêts thérapeutiques, valorisation en UV-visible et fluorescence

Soutenue publiquement, devant le jury d'examen composé de:

Mr ELIAS Abdelhamid	Professeur	UMMTO	Président
Mme Makhloufi-Chebli Malika	MCA	UMMTO	Rapporteur
Mme Boutemeur-Kheddis Baya	Professeur	USTHB	Co-Rapporteur
Mr Benosmane Nadjib	MCA	UMBB	Examineur
Melle Dermeche Leila	MCA	UMMTO	Examinatrice
Mr Amrouche Tahar	MCA	UMMTO	Examineur
Mme Hamzaoui -Dahmani Nacéra	MCA	UMMTO	Invité

Remerciements

On tient à remercier, Dieu le tout puissant pour nous avoir donné de la force et de la patience afin de mener ce travail à sa fin .

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Chimie Organique Appliquée (L.C.O.A) de la Faculté de Chimie de l' U.S.T.H.B et au Laboratoire de Physique et Chimie des Matériaux (LPCM) de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, sous la direction de Madame **MAKHLOUFI-CHEBLI Malika** maître de Conférences Classe A à la Faculté des Sciences de l'UMMTO, que je remercie chaleureusement de m'avoir encadré, avec beaucoup de compétence, d'enthousiasme et de disponibilité, son aide précieuse et surtout pour tous ses conseils et ses remarques, pour la confiance qu'elle m'a accordé pour réaliser ce travail de recherche.

Je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance au Professeur **HAMDI Maamar** de m'avoir accueillie au sein de son équipe de chercheurs et de m'avoir offert ainsi l'opportunité de pénétrer le monde passionnant et merveilleux de la chimie organique.

Je remercie très sincèrement Madame **BOUTEMEUR Baya**, Professeur à la Faculté de Chimie de l'U.S.T.H.B et également Directrice du laboratoire de Chimie Organique Appliquée de m'avoir Co-encadré, pour sa disponibilité, sa gentillesse, ses conseils précieux, et son apport scientifique.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Monsieur **Artur SILVA**, Professeur au Département de chimie de l'université d'Aveiro, Portugal, qui nous a permis de faire les caractérisations des produits et pour sa contribution dans ce travail.

Je remercie également Mademoiselle **DERMECHE Samia** maître assistante à la Faculté de Biologie à l'UMMTO, qui m'a permis de réaliser les tests biologiques.

Je remercie Monsieur **ELIAS Abdelhamide** Professeur à l'UMMTO, pour l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail en me faisant l'honneur de présider ce jury.

A Madame **HAMZAOUI-DAHMANI Nacéra** et Melle **DERMECHE Leila** maîtres de conférences classe A à la Faculté des Sciences de l'UMMTO qui ont accepté de juger ce travail.

Mes remerciements vont également à Monsieur **BENOSMANE Nadjib** maître de conférence classe A à l'Université de Boumerdès, qui me fait un grand honneur en assistant à ma soutenance et en jugeant mon travail.

Je veux adresser tous mes remerciements à Monsieur **AMROUCHE Tahar** maître de conférence classe A à la Faculté de Biologie de l'UMMTO, pour sa participation à cette commission d'examen.

Que tous les membres du laboratoire de chimie des hétérocycles et toutes mes amies trouvent ici mes plus amicaux remerciements.

Dédicace :

Je Dédie ce modeste travail à :

*A mes très chers parents, sources constantes d'encouragement,
de soutien et d'affection .*

A mon mari Omar

A mes enfants : Anes et Aymen

A ma très chère sœur Imane

A mon cher frère Ahmed Amine

A ma belle famille

A tous mes proches

A toutes mes amies et tous ceux qui me sont chères

Abstract

In the design of new drug prototypes, the concept of molecular hybridization is a useful tool and is based on the combination of pharmacophore moieties of different bioactive substances to produce a new dyad compound with improved affinity and efficacy [16]. This strategy has resulted in compounds with modified selectivity profile, different and / or dual mode of action and reduced undesired side effects. By using this approach, several groups of researchers designed and synthesized many hybrid molecules.

In our work, we describe a simple strategy for the synthesis of a new series of 4-aryl-6-methyl-5-(2-oxo-2Hchromene-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones/thiones in the moderated conditions by using the 3-acétoacétyl coumarin and its derivatives as principal reagents.

Three composed of the synthesized series were subjected to a UV/Vis study and fluorescence of the search for new fluorescent probes in the field of biology.

The study of the antioxydant power of three composed was realized by the method of reduction of the radical DPPH showed the existence of an antioxydant activity, the estimation of the antibactérien effect was determined by the technique of direct confrontation in box of Molded. The obtained results vary from on origin to the other one.

Résumé

La conception et le développement de nouveaux agents bioactifs en se basant sur la stratégie d'hybridation moléculaire, impliquant l'intégration de deux ou plusieurs motifs pharmacophores ayant différents mécanismes d'action dans la même molécule, est une approche rationnelle attrayante. Ces pharmacophores combinés offrent probablement des avantages tels que surmonter la résistance aux médicaments, ainsi que l'amélioration de leur activité biologique. En utilisant cette approche, plusieurs groupes de chercheurs ont conçu et synthétisé de nombreuses molécules hybrides.

Dans notre travail, nous décrivons une stratégie simple pour la synthèse d'une nouvelle série de composés 4-aryl-6-méthyl-5-(2-oxo-2Hchromene-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones/thiones dans des conditions modérées en utilisant la 3-acétoacétyl coumarine et ses dérivés en tant que réactifs principaux.

Trois composés de la série synthétisée ont été soumis à une étude UV/Vis et fluorescence dans le cadre de la recherche de nouvelles sondes fluorescentes dans le domaine de la biologie.

L'étude du pouvoir antioxydant de trois composés a été réalisé par la méthode de réduction du radical DPPH a montré l'existence d'une activité antioxydante, l'estimation de l'effet antibactérien a été déterminé par la technique de confrontation directe en boîte de pétri, sur milieu solide. Les résultats obtenus varient d'une souche à l'autre.

Sommaire

Introduction générale	1
------------------------------------	----------

PARTIE I

Chapitre I : Réactions multi composantes

I-Réactions multi composantes	3
II- Historique	4
III- Réaction de Biginelli	6
IV- Mécanisme de synthèse de Biginelli	7
V- Intérêts biologiques des DHPMs	14
VI- Les β -dicarboxylés	16
VII- Les coumarines	19
VIII- Les molécules hybrides dans la recherche de nouveaux médicaments	21

Chapitre II : Synthèse de molécules hybrides coumarin-3,4-dihydropyrimidin-2(H)-ones/thiones

I- Introduction	25
II- Synthèse des dérivés 3-acétoacétylcoumarines	26
II-1- Synthèse du 3-acétoacétylcoumarine (1a).....	26
II- 2- Synthèse du 3-acétoacétyl-7-hydroxycoumarine (1b)	32
II-3- Synthèse de la 3-acétoacétylbenzo[f]coumarine (1c)	36
II-4- Synthèse de la 3-acétoacétyl-8-hydroxycoumarine (1d).....	40
II-5 Synthèse de la 6-hydroxy-3-acétoacétylcoumarine (1e)	45
III- Mécanisme de la réaction de Knoevenagel.....	47
IV- Synthèse de molécules hybrides coumarin-3,4- dihydropyrimidin-2(H)-ones/thiones	48
IV-1- Synthèse des composés 4-aryl-6-méthyl-5-(2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (4a-e)	51
IV-1-1- Composé 6-méthyl-5-(2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-4- phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (4a)	51

IV-1-2- Composé 6-méthyl-4-(4-nitrophényl)-5-(2-oxo-2 <i>H</i> -chromène-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1 <i>H</i>)-one (4b)	54
IV-1-3- Composé 4-(4-chlorophényl)-6-méthyl-5-(2-oxo-2 <i>H</i> -chromène-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1 <i>H</i>)-one (4c)	56
IV-1-4- Composé 6-méthyl-5-(2-oxo-2 <i>H</i> -chromène-3-carbonyl)-4-phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(1 <i>H</i>)-thione (4d)	58
IV-1-5 Composé 4-(4-chlorophényl)-6-méthyl-5-(2-oxo-2 <i>H</i> -chromène-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1 <i>H</i>)-thione (4e).....	60
IV-2 Composés 4-aryl-5-(7-hydroxy-2-oxo-2 <i>H</i> -chromène-3-carbonyl)-6-méthyl-3,4-dihydropyrimidin-2(1 <i>H</i>)-one (5a-d)	62
IV-2-1 Composés 5-(7-hydroxy-2-oxo-2 <i>H</i> -chromène-3-carbonyl)-6-méthyl -4-phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(1 <i>H</i>)-one (5a)	62
IV-2-2 Composé 5-(7-hydroxy-2-oxo-2 <i>H</i> -chromène-3-carbonyl)-6-méthyl-4-(4-nitrophényl)-3,4-dihydropyrimidin-2(<i>H</i>)-one (5b)	64
IV-2-3 Composé 4-(4-chlorophényl)-5-(7-hydroxy-2-oxo-2 <i>H</i> -chromène-3-carbonyl)-6-méthyl-3,4-dihydropyrimidin-2(1 <i>H</i>)-one (5c)	72
IV-2-4 Composé 5-(7-hydroxy-2-oxo-2 <i>H</i> -chromène-3-carbonyl)-6-méthyl-4-phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(<i>H</i>)-thione (5d)	74
IV-3- Composés 4-aryl-6-méthyl-5-(3-oxo-3 <i>H</i> -benzo[f]chromène-2-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1 <i>H</i>)-one (6a-d)	76
IV-3-1- Composé 6-méthyl-5-(3-oxo-3 <i>H</i> -benzo[f]chromène-2-carbonyl)-4-phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(1 <i>H</i>)-one (6a)	76
IV-3-2- Composé 6-méthyl-4-(4-nitrophényl)-5-(3-oxo-3 <i>H</i> -benzo[f] chromène-2-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1 <i>H</i>)-one (6b)	78
IV-3-3-Composé 4-(4-chlorophényl)-6-méthyl-5-(3-oxo-benzo[f] chromène-2-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1 <i>H</i>)-one (6c).....	80
IV-3-4- Composé 4-(4-chlorophényl) -6-méthyl- 5-(3-oxo-3 <i>H</i> -benzo[f] chromène-2-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1 <i>H</i>)-thione (6d)	83
IV-4- Composé 5-(6-hydroxy-2-oxo-2 <i>H</i> -chromène-3-carbonyl)-6-méthyl-4-phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(1 <i>H</i>)-one (7)	85
IV-5- Composé 5-(8-hydroxy-2-oxo-2 <i>H</i> -chromène-3-carbonyl)-6-méthyl-4- phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(1 <i>H</i>)-one (8).....	87
V- Conclusion	89
Partie expérimentale	90

Références bibliographiques	105
-----------------------------------	-----

PARTIE II

Chapitre I : Synthèse bibliographique sur la fluorescence

I- Définition de la fluorescence	109
II- Fluorimètre	110
III- Spectroscopie de fluorescence	110
IV- Principe de la fluorescence	111
V- Chronologie d'une émission de fluorescence	112
VI- Caractéristiques des fluorophores	114
VII- Facteurs influençant sur la fluorescence	119
VIII- Applications de la fluorescence	128
IX- Structures des Chromophores (fluorophores) organiques.....	129
X- Chromophores organométalliques	135

Chapitre II : Etude par UV/visible et fluorescence des nouvelles molécules coumarin-DHPMs hydrides: propriétés optiques, estimation des moments dipolaires par solvatochromie

I -Introduction	136
II- Expérimentale.....	137
II-1 Appareillage	137
II-2 Matériels	138
III- Effet du solvant sur les spectres électroniques d'absorption et d'émission de fluorescence	139
❖ Spectres d'absorption en U.V/Visible	139
❖ Spectres d'émission de fluorescences	142
❖ Variation de la longueur d'onde d'absorption et d'émission en fonction du coefficient diélectrique des solvants	144
❖ Rendements quantiques de la fluorescence	146
❖ Brilliance	147
IV- Estimation des moments dipolaires de l'état excité et de l'état fondamental.....	148
V- Calculs semi empiriques de charges	157
VI-Conclusion	158
Références bibliographiques	160

PARTIE III

Evaluation de l'activité biologique des molécules hybrides coumarin-3,4-dihydropyrimidinones

A. Activité antioxydante	164
I- Introduction	164
II- Composés phénoliques	164
III- Stress oxydatif	165
IV- Les radicaux libres	165
V- Les antioxydants	166
VI- Mécanisme d'action d'un anti-oxydant	169
VII- Mesure de l'activité antioxydante	169
B. Activité antibactérienne	171
I- Introduction	171
II- Technique d'étude in-vitro du pouvoir antimicrobien	172
III- Activité de la coumarine et quelques molécules hybrides	173
Partie expérimentale	
I- Evaluation de l'activité antioxydante	176
II- Evaluation de l'activité antibactérienne	180
III- Conclusion	189
Références bibliographiques	190
Conclusion générale	193
Annexe 1	194
Annexe 2	217

Liste des abréviations :

ADN	Acide Désoxyribose Nucléique
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
d	doublet
dd	doublet de doublet
DHPMs	dihydropyrimidinones
DHPMTs	dihydropyrimidine-thiones
E _T	Energie totale
EN	Electronégativité
E. coli	Escherichia coli
EthOH	Ethanol
GFP	La protéine fluorescente verte (green fluorescent protéine)
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation
HMBC	Heteronuclear Multiple - Bond Correlation
IR	Infra Rouge
m	Multiplet
MeCN	Acétonitril
n _{J_{H-H}}	Constantes de couplage
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide déshydrogénase.
NOESY	Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy
RMN	Résonance magnétique nucléaire
r	Coefficients de corrélation
R _d	Rendement
s	Singulet
δ	Déplacement chimique
ΔH _f	Enthalpies de formation
λ _{ex}	Longueur d'onde d'excitation
λ _{em}	Longueur d'onde d'émission
λ _{max}	Longueur d'onde maximale
UV	Ultra Violet
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

Introduction générale

Introduction générale

Les hétérocycles oxygénés, soufrés et azotés occupent une place importante dans la chimie organique et constituent un champ intéressant pour la recherche de nouveaux médicaments. Un très grand nombre de substances naturelles et de médicaments sont des hétérocycles. Approximativement deux tiers des publications en chimie concernent de près ou de loin les hétérocycles. Ces molécules réunissent en effet dans une même structure les caractères remarquables des composés cycliques saturés, partiellement saturés ou aromatiques, ainsi que les groupements fonctionnels construits autour des hétéroatomes. Peu d'industries fines peuvent se passer des hétérocycles, celle des colorants leur doit beaucoup, et la photographie en couleur n'existerait pas sans eux.

Les dérivés coumarines et pyrimidinones sont largement distribués dans la nature et présentent diverses propriétés biologiques. Par conséquent, leurs dérivés correspondants ont présenté des propriétés thérapeutiques et pharmacologiques importantes. Le fusionnement des deux noyaux constitue une voie vers de nouveaux médicaments. Il est évident que deux pharmacophores (les parties pharmacologiquement actives d'une molécule) sont toujours plus efficaces qu'un seul face à un agent pathogène. De très nombreuses maladies sont en effet traitées maintenant par des polytraitements : les polychimiothérapies, qui associent plusieurs molécules actives. La trithérapie anti-VIH en est un exemple récent, mais n'oublions pas la lutte efficace dans les années 1950 contre le bacille de la tuberculose avec l'association rimifon-streptomycine. De plus, pour les traitements contre les bactéries ou contre les parasites responsables du paludisme, les monothérapies conduisent à l'apparition de souches pathogènes résistantes à la molécule utilisée (souche de *Plasmodium falciparum*, résistantes à la chloroquine).

Au cours de la prochaine décennie, les sociétés pharmaceutiques vont devoir augmenter leur productivité d'un facteur de dix afin de répondre à une demande croissante en nouveaux médicaments. Dans ce contexte, la chimie combinatoire s'est imposée comme une source fondamentale de molécules originales pour la découverte de nouveaux médicaments. De ce fait, elle a été rapidement adoptée par les industries pharmaceutiques avec la volonté de mettre au point des procédés systématiques, dans l'optique d'obtenir un grand nombre de molécules apparentées en un temps relativement court. La découverte de nouvelles réactions, capables de former plusieurs liaisons, en une seule étape, avec de bons rendements globaux, tout en

respectant l'environnement, est donc devenue un défi important pour le chimiste organicien. Ainsi, les réactions multi-composantes, qui répondent à l'ensemble de ces critères, jouent un rôle innovateur et font l'objet d'une attention toute particulière. La préparation efficace et rapide d'importantes collections de molécules présentant un maximum de diversité structurale est un challenge important pour la chimie académique et industrielle d'aujourd'hui. C'est ainsi que s'est développée la recherche en synthèse combinatoire, qui permet d'accéder à un grand nombre de molécules avec un minimum d'étapes. Les réactions multi-composantes, visant à synthétiser des produits hautement fonctionnalisés en une seule étape, s'inscrivent précisément dans ce contexte.

La méthode la plus commune pour la synthèse des dihydropyrimidinones (DHPMs) et des dihydropyrimidine-thiones (DHPMTs) implique la réaction à plusieurs composants de Biginelli. Jusqu'en 1990, les chimistes n'étaient peu ou pas entrés dans la stratégie des molécules hybrides, qui constitue donc un champ de travail important avec de larges perspectives d'évolution. Plusieurs travaux ont été rapportés dans la littérature sur la synthèse et l'évaluation biologique des hétérocycles pyrimido-fusionner tels que pyrimido [4,5-d] pyridazin- 8(7*H*)-ones , pyrano[2,3-d] pyrimidines, pyrido[2,3-d]pyrimidines et 2,4-diaminopyrido [2,3-d] pyrimidines.

Ainsi, notre travail est axé sur la synthèse d'hétérocycles hybrides oxygénés-azotés (coumarines-dihydropyrimidinones), en se basant sur le principe de la réaction de Biginelli.

Les résultats de nos recherches sont exposés en trois parties:

- Dans la première partie, nous décrivons une stratégie simple pour la synthèse d'une nouvelle série de 4-aryl-6-méthyl-5-(2-oxo-2*H*-chromène-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones/thiones **4a-e**, **5a-d**, **6a-e**, **7** et **8** dans des conditions modérées en utilisant la 3-acétoacétylcoumarine et ses dérivés **1a-e** en tant que réactifs principaux. Les structures de tous les composés synthétisés, ont été vérifiées par les différentes méthodes d'analyses (spectrométrie de masse, RMN (¹H, ¹³C) et la RMN à 2D (HMBC, HSQC et Noesy).
- La deuxième partie de ce travail est consacré à l'étude par UV-Visible et fluorescence des nouvelles molécules hybrides : étude des propriétés optiques et estimation des moments dipolaires par solvatochromie des composés synthétisés dans la première partie.
- Et dans la troisième partie une étude de l'activité antioxydante et antibactérienne est réalisée pour les produits synthétisés.

Partie i
Chapitre i

Les Réactions Multi composantes

I-Réactions multi composantes

Les réactions multi composantes (notées RMCs, “multicomponent reactions”) sont devenues des réactions clés de la recherche industrielle et académique [1–6]. En effet, elles constituent une solution très efficace pour réaliser des synthèses complexes à partir de mélanges de réactifs en formant plusieurs liaisons covalente. Le principe d’une RMC est représenté dans la Figure I.1: plusieurs réactifs (trois ou plus) mis ensemble dans le milieu réactionnel aboutissent à un produit. Elles font partie de la famille des réactions monotopes, dans lesquelles on trouve:

- Les réactions tandem : on fait réagir A et B pour donner C (qui est potentiellement isolable), puis on ajoute D pour obtenir E.
- Les réactions cascade (ou domino) : on fait réagir A et B pour donner C (qui n’est pas isolable), qui évolue en E.
- Les réactions multi composantes: on introduit A, B, C dans le milieu qui donnent E, aucun intermédiaire n’étant isolable.

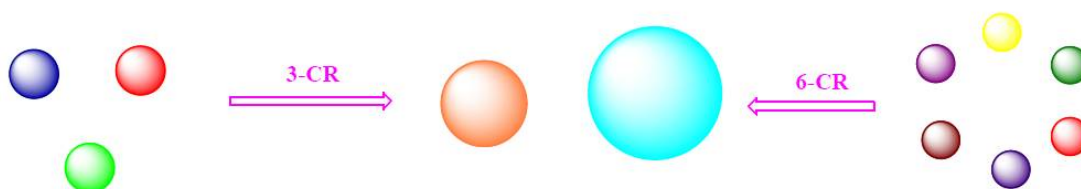


Figure I.1 : Principe des réactions multi composantes

Ruijter *et coll.* définissent une RMC comme une réaction vérifiant trois conditions [7] :

- ✓ une vraie procédure monotope, sans étape intermédiaire de purification ou de changement de solvant ;
- ✓ une grande économie d’atomes, à l’exception éventuelle de quelques sous-produits de condensation ;
- ✓ l’utilisation de réactifs qui peuvent être changés indépendamment, assurant une grande diversité.

L'intérêt des RMCs est la synthèse des molécules complexes à partir de réactifs commerciaux simples en un minimum de phases expérimentales. Elles permettent l'obtention monotope de molécules cibles à partir de 3 composés ou plus [8] (figure 1); certaines allant jusqu'à mettre 7 à 8 réactifs (figure I.2) [9]. Elles intéressent tout particulièrement l'industrie pharmaceutique pour la création de chimiothèques destinées au criblage à haut débit, ce qui explique le fort développement qu'elles ont connu ces dernières années.

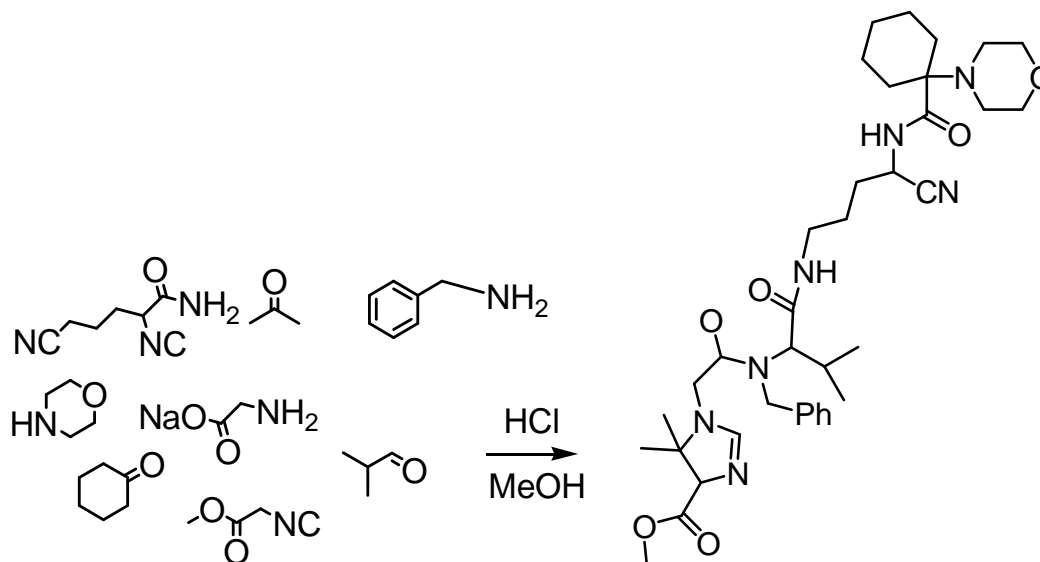


Figure I.2 : Réaction multi composantes à 8 composants

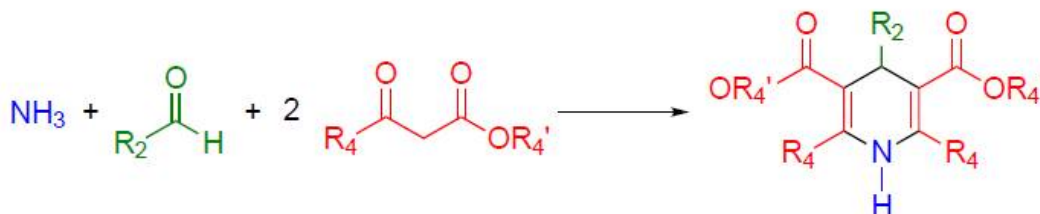
II- Historique

Les MCRs sont connues depuis longtemps puisque la première de ces réactions fut la synthèse d' α -aminoacide, étudiée par Strecker en 1850 [10, 11] (Figure 3). Plusieurs MCRs historiques sont présentées dans la Figure I.3.

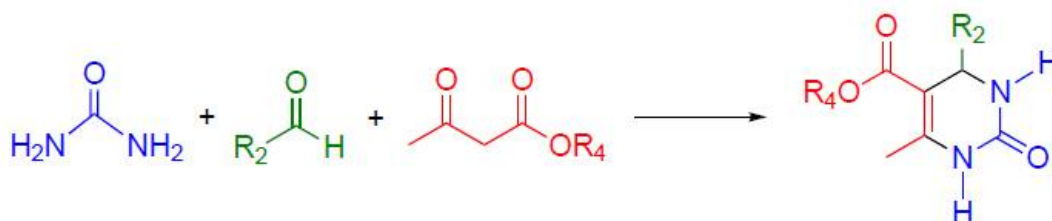
- Celle de Hantzsch, découverte en 1882, fut la première MCR aboutissant à un hétérocycle [12].
- Suivie de peu par la réaction de Biginelli en 1891 [13,14].
- La réaction de Mannich [15] a été l'une des premières MCRs à avoir une application en synthèse totale : elle a permis la synthèse de produits naturels comme la tropinone par Robinson dès 1917 [16] (Figure I.4), et est impliquée dans la synthèse de médicaments comme le Prozac®(anti-dépresseur) aussi connu sous le nom de Fluoxetine .



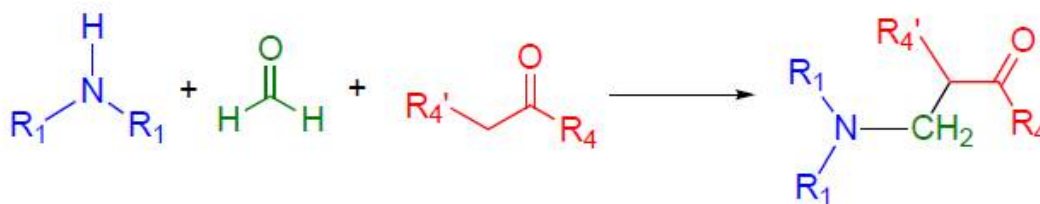
(a) Réaction de Strecker[10,11].



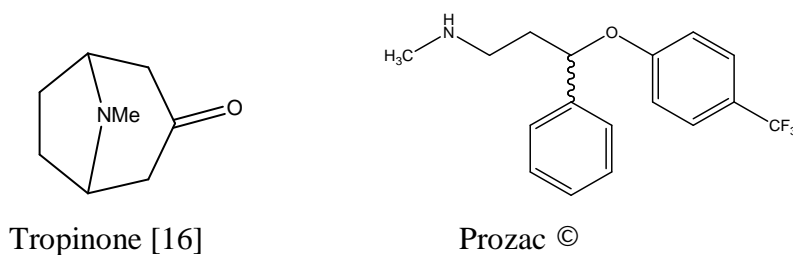
(b) Réaction de Hantzsch[12].



(c) Réaction de Biginelli[13,14]



(d) Réaction de Mannich[15]

Figure I.3 : Réactions multicomposants historiques**Figure I.4** : Structure de la Tropinone et le Prozac ©

Depuis cette époque l'intérêt des RMCs n'a cessé d'augmenter. Suite à ces premiers travaux, nous avons voulu montrer l'importance de cette famille des réactions, qui se traduit par l'efficacité et la simplicité avec laquelle des molécules très complexes comme les

alcaloïdes, les antibiotiques, les vitamines... [9] sont préparées. Ces raisons nous ont guidés sur le choix de la réaction de Biginelli.

III- Réaction de Biginelli

Le chimiste italien Pietro Biginelli a rapporté, pour la première fois, la préparation d'une nouvelle molécule, la 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one, notée DHPM, à partir d'une réaction de cyclocondensation à composants multiples en faisant réagir à la fois trois réactifs en une seule étape: l'acétoacétate d'éthyle **1**, le benzaldéhyde **2**, et l'urée **3**, au reflux de l'éthanol comme solvant et en présence d'acide chlorhydrique comme catalyseur [13,14].

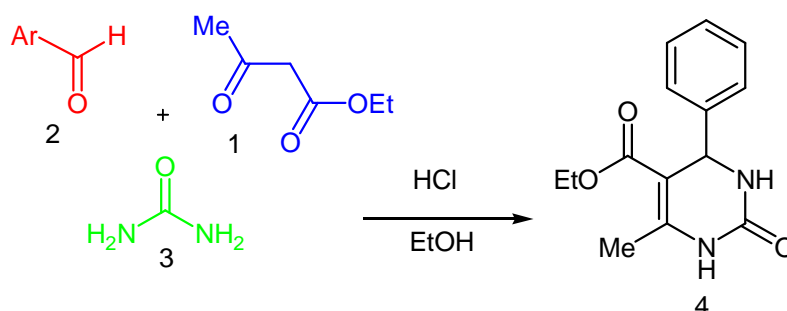


Figure I.5: Réaction de Biginelli[13,14]

Après cette réaction plusieurs protocoles ont été mis au point pour améliorer les conditions et les rendements. Le développement des méthodes de synthèse catalytiques efficaces et rapides est devenu une nécessité pour la synthèse de ces composés multifonctionnalisés, qui présente un axe de recherche innovant pour les chimistes.

L'emploi des catalyseurs dans la condensation de Biginelli a pris un rythme accéléré, nous citons quelques catalyseurs utilisés :

- ✚ **les acides de Lewis** tels que LiClO_4 , SiCl_4 , ZrCl_4 [17]
- ✚ **les triflates** tels que $\text{In}(\text{OTf})_3$, $\text{Ni}(\text{OTf})_2$, $\text{Sr}(\text{OTf})_2$ [18,19]
- ✚ **les acides protoniques** tels que H_2SO_4 , HCl , acide acétique ou ces dérivés [20] tels que l'acide chloroacétique, l'acide trichloroacétique, l'acide bromoacétique ...etc.

La réaction de Biginelli est effectuée dans un solvant polaire protique tel que l'éthanol et le méthanol utilisé dans les conditions classiques de la réaction. Les solvants polaires aprotiques ont été également utilisés tels que : le tétrahydrofurane, le dioxane et l'acétonitrile. La réaction de Biginelli a aussi été menée sans solvants et donne de très bons résultats [21].

Dans le concept du développement de la chimie verte la réaction de Biginelli a été réalisée dans l'eau à température ambiante (Rdt 59-88%), l'addition de l'acide de Bronsted (HCl, CH₃CO₂H) conduit à l'augmentation considérable des rendements (Rdt>95%) [22].

L'intérêt des RMCs est la synthèse des molécules complexes à partir de réactifs simples en un minimum de phases expérimentales ainsi que l'utilisation de réactifs qui peuvent être changés indépendamment, assurant une grande diversité de composés. La cyclocondensation de Biginelli qui implique un aldéhyde, une β-cétoester et l'urée et la variation de l'un de ces substituants permet l'accès à une large gamme de dérivés de la dihydropyrimidinone.

On peut faire varier les aldéhydes aromatiques; ceux-ci peuvent être substitués en position ortho, méta ou para avec des groupements électro-donneurs ou électro-attracteurs. Comme on peut remplacer aussi la β-cétoester par les β-dicétoe linéaires, les 1,3-dicarbonylés cycliques, les β-diester cycliques, les β-diamides et les cétones benzocycliques. Plusieurs travaux ont été réalisés dans ce concept, nous citons le travail suivant qui est la condensation de Biginelli qui consiste à faire réagir l'acétoacétate d'éthyle (1) un aldéhyde (2) (2-chloro-3-formylquinoléique) et l'urée (3) en présence d'une quantité catalytique de la triphénylamine (Ph₃N) comme base de Lewis (Figure I.6). [21]

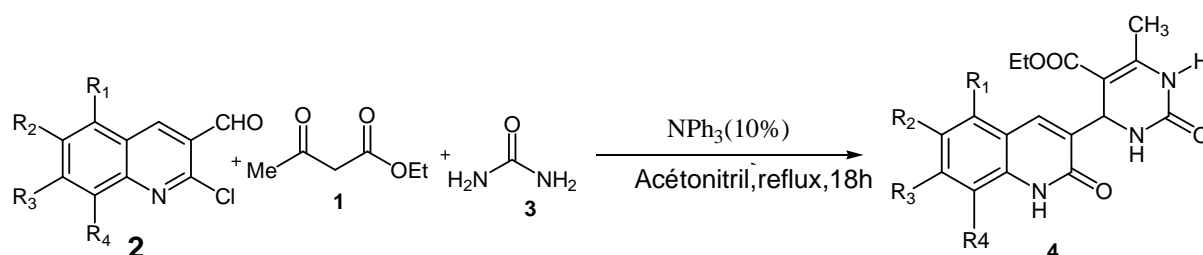


Figure I.6 : 2-chloro-3-formylquinoléique dans la synthèse des DHPMs

IV- Mécanisme de synthèse de Biginelli

La Réaction de Biginelli implique la condensation de trois composants: 1,3-dicarbonylé 1, aldéhydes 2 et urée ou la thio-urée 3. Le maintien de la réactivité de ces réactifs pourrait procéder selon plusieurs voies.

1. La condensation de l'aldéhyde **2** avec le composé 1,3-dicarbonylé **1** par condensation d'aldol suivie d'une attaque nucléophile de la molécule d'urée **3**.
2. La condensation de l'aldéhyde **2** avec le composé 1,3-dicarbonylé **1** par réaction de Knoevenagel ensuite addition nucléophile de l'urée **3** sur l'intermédiaire formé.
3. La condensation de l'aldéhyde **2** avec la molécule d'urée **3** (via N-benzylidène-urée) puis addition nucléophile du composé 1,3-dicarbonylé **1**.
4. La condensation de l'aldéhyde **2** avec deux molécules d'urée **3** (par l'intermédiaire de N, N-benzylidènebisurée) et puis l'addition nucléophile du composé 1,3-dicarbonylé **1**.
5. Condensation nucléophile de l'urée **3** sur le composé 1,3-dicarbonylé **1** (via 3-uréido-crotonates) suivi d'une autre attaque nucléophile de ce condensat à l'aldéhyde **2**.

➤ **Mécanisme proposé par Folkers et Johnson (1933)**

Le premier mécanisme a été formulé par Folker et Johnson [23] en 1933, ils suggèrent que le N,N'-benzylidène-bisurée (**A**) (provenant de la condensation de l'aldéhyde (**2**) et de l'urée (**3**)), est le seul intermédiaire qui pourrait évoluer vers le produit de Biginelli (**4**), les deux autres intermédiaires (**B**), (**C**) ne peuvent pas donner le produit, car le premier ne réagit pas avec l'urée dû à sa grande stabilité dans les conditions de la réaction et le second s'hydrolyse facilement en produit de départ (Schéma I.1).

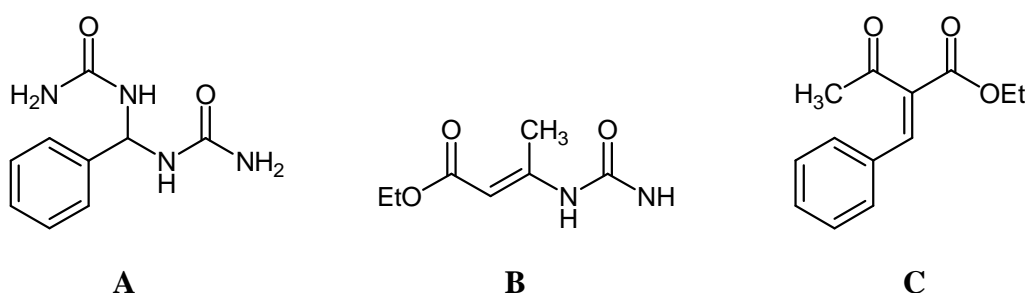


Schéma I.1: Intermédiaire proposé par Folkers et Johnson

➤ **Mécanisme proposé par Sweet et Fissekis (1973)**

40 ans plus tard, Sweet et Fissekis [24] proposèrent un autre mécanisme où l'étape déterminante de la réaction de Biginelli fut la réaction d'aldolisation en milieu acide de l'aldéhyde avec l'acétoacétate d'éthyle pour donner un ion carbanium (**D**) qui réagit avec l'urée pour former l'uréide (**E**) intermédiaire immédiat des DHPMs. (Schéma I.2)

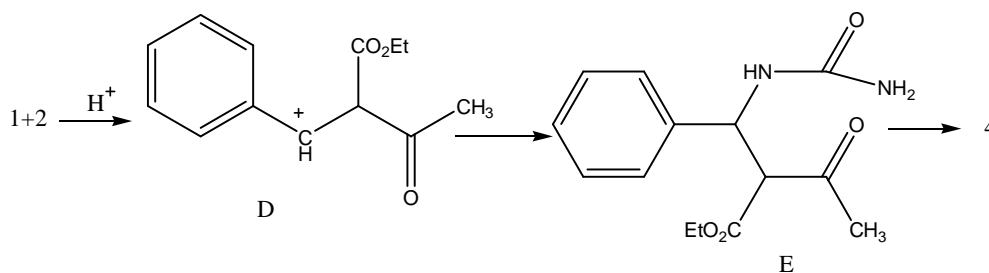


Schéma I.2: Formation de 3,4-dihydropyrimidinone par condensation aldolique

➤ **Mécanisme proposé par Atwal et O'Reilly (un processus en deux étapes) (1987)**

Atwal et ses associés [25-27] ont donné une proposition visant à surmonter les problèmes liés aux faibles rendements des composés type Biginelli, dans le cas des aldéhydes et principalement les aldéhydes aliphatiques et les aldéhydes ayant une fonction carbonyle légèrement entravée par les substituants en position ortho. Cette nouvelle approche impliquant deux étapes, la première étape est concernée par la synthèse de composé carbonylés insaturé **9** obtenus via la condensation de Knoevenagel et la deuxième étape implique l'addition d'urée substituée par catalyse basique comme indiqué dans le Schéma I.3.

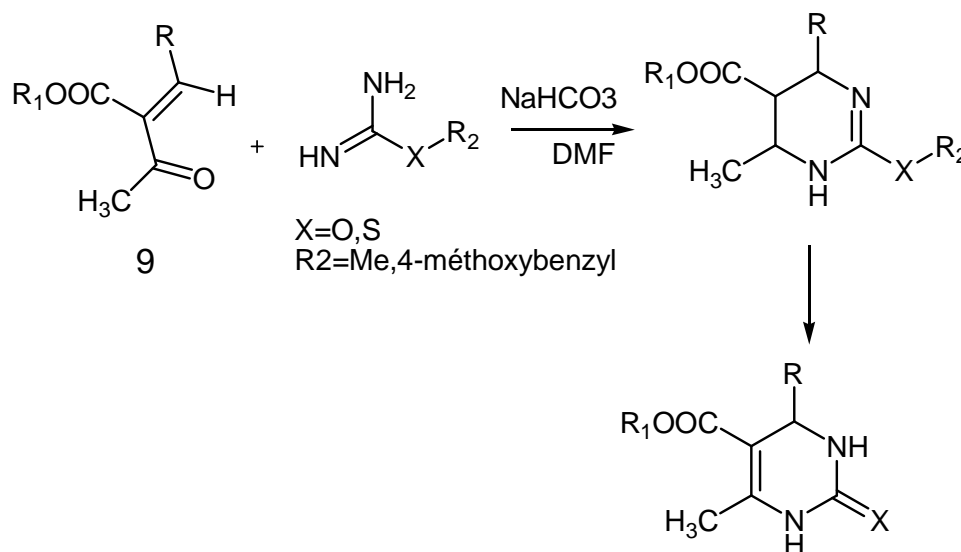


Schéma I.3 : Formation de 3,4-dihydropyrimidinone par condensation de Knoevenagel

Il est pertinent de mentionner ici que cette modification de la réaction de Biginelli a rarement été utilisée ces dernières années, car elle implique deux étapes.

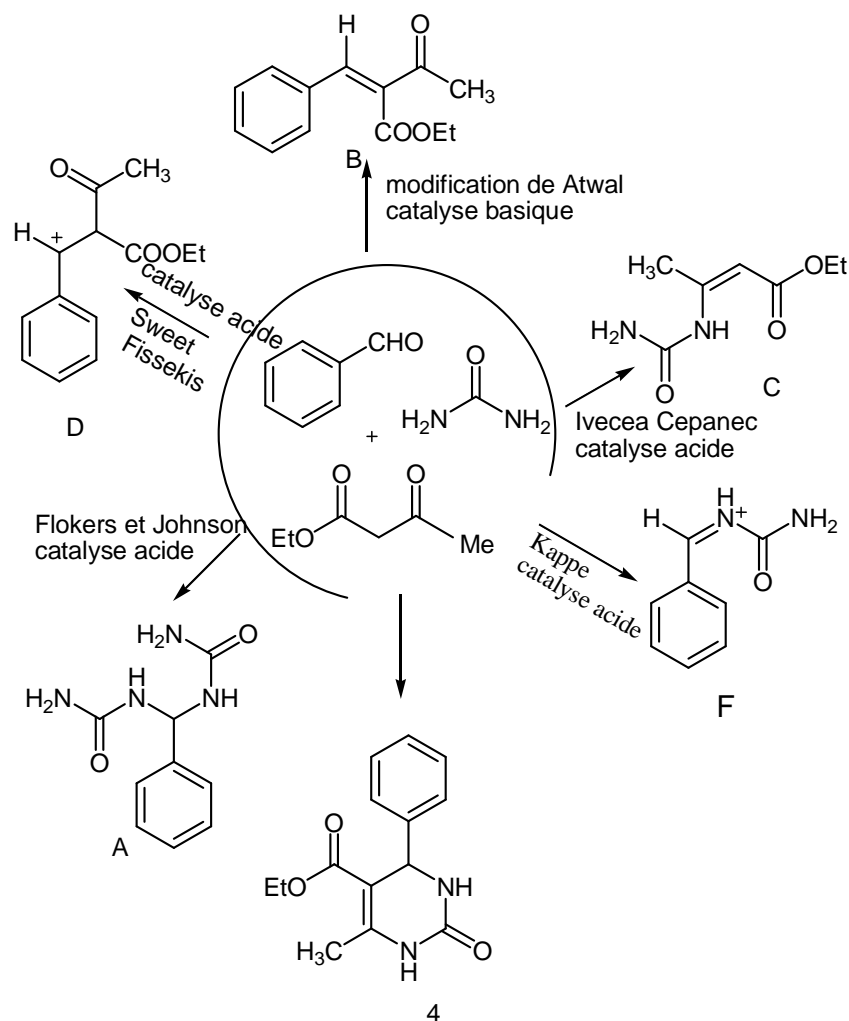


Schéma I.4 : Recherche d'intermédiaires par divers chercheurs

➤ Mécanisme proposé par Kappe O. (1997)

En utilisant la spectroscopie RMN du proton et du carbone, Kappe [28] en 1997, a présenté une nouvelle étude où il a montré que dans le milieu acide le carbanium donne les carbonyles α,β -insaturés (B), qui en présence de l'urée ne donne pas les produits de Biginelli désirés. Il a donc écarté le mécanisme passant par le carbanium proposé par Sweet et Fissekis. Il a opté alors pour le mécanisme proposé par Folker dont l'étude montre que l'intermédiaire (N-acyliminium) (F) réagit plus rapidement avec l'acétoacétate d'éthyle (1) pour donner l'intermédiaire immédiat (E) des DHPMs qui donne avec l'urée le benzylidènebisurée (A) comme rapporté par Folker et Johnson. Donc l'étape déterminante selon Kappe est la formation de N-acyliminium (F).

Ainsi est né le nouveau mécanisme de Kappe, Folker et Johnson adopté par plusieurs auteurs dans des études postérieures de la réaction de Biginelli (Schéma I.5).

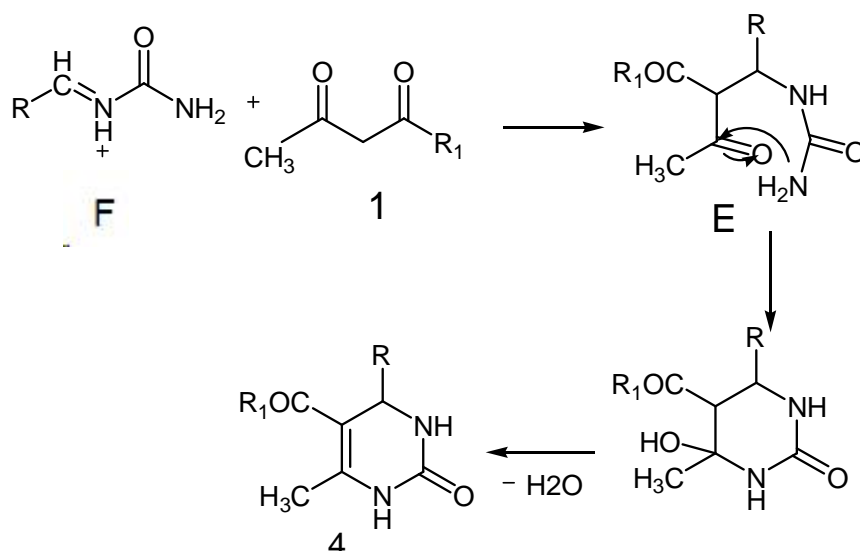


Schéma I.5 : Formation de 3,4-dihydropyrimidinone via N-acyliminium ions

➤ **Mécanisme proposé par Ivica Cepanec (2007)**

En utilisant SbCl₃ comme catalyseurs, Ivica et coll [29] ont montré que la réaction de Biginelli passe par l'intermédiaire uréidocrotonate (C) qui réagit ensuite sur le benzaldéhyde pour former la DHPM correspondante. (Schéma I.6)

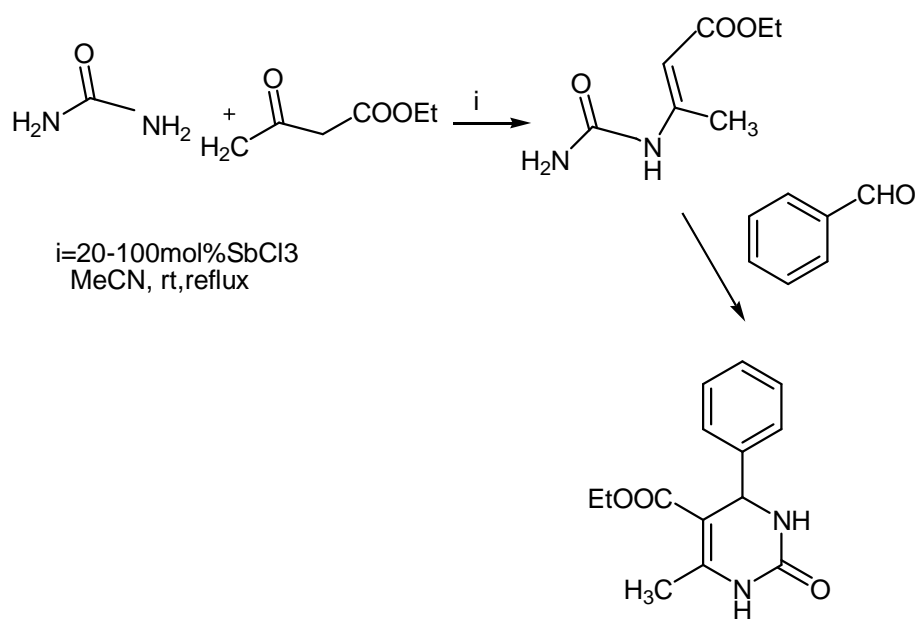


Schéma I.6: Formation de 3,4-dihydropyrimidinone via 3-uréido-crotonates

➤ **Mécanisme proposé par Jian-Hua Zhou (Etude DFT) 2008**

Une étude par les calculs théoriques de la densité fonctionnelle (DFT) est rapportée par Jian-Hua Zhou [30] sur la condensation du benzaldéhyde, de l'urée, et de l'acétoacétate d'éthyle dans des conditions réactionnelles classiques. Ces auteurs ont également confirmé la proposition de Kappe.

➤ **Mécanisme proposé par De Souza 2009**

Dernièrement De Souza et al. [31] ont mené des études mécanistiques sur la réaction de Biginelli et ont confirmé la proposition de Folkers et Johnson. Leurs conclusions ont été fondées sur des calculs théoriques de la densité fonctionnelle (DFT). Ces auteurs ont utilisé un spectromètre de masse en mode ionisation chimique dans leur étude.

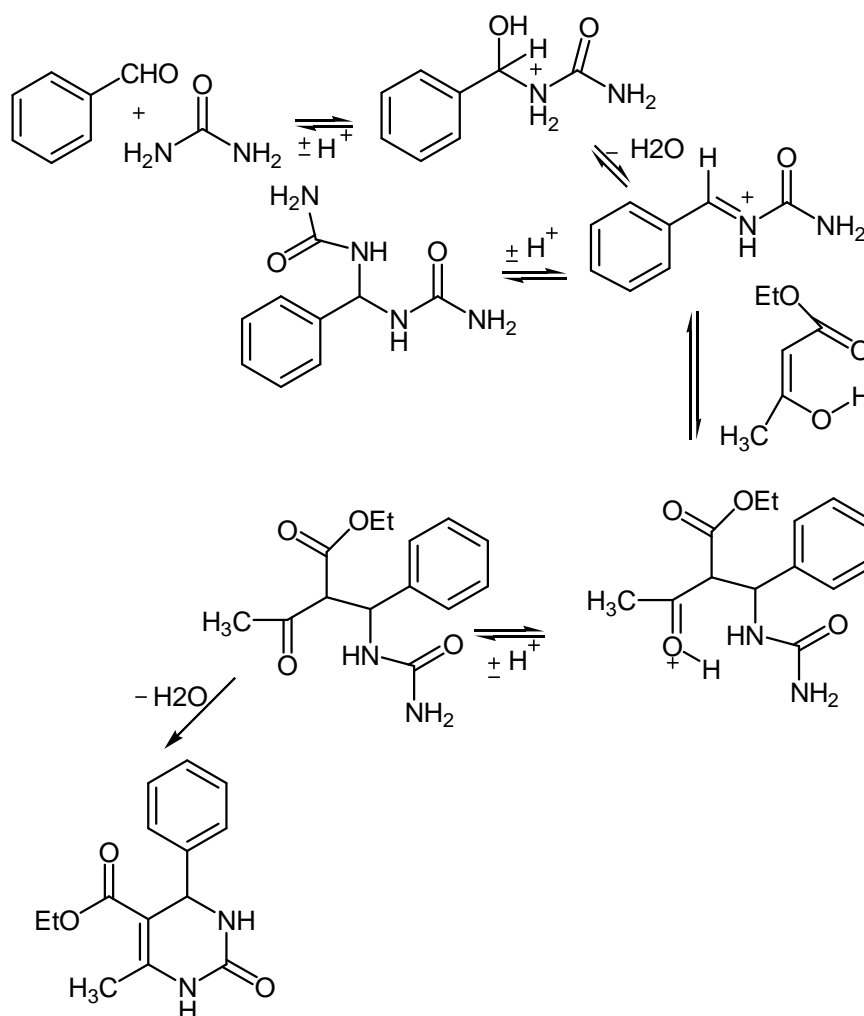


Schéma I.7 : Formation de 3,4-dihydropyrimidinone via le mécanisme d'iminium F

➤ **Mécanisme proposé par Shun-Jun Ji 2010 (catalysée par une base)**

Un grand nombre d'études a été réalisé sur l'utilisation d'acide de Lewis comme catalyseurs, et seulement très peu de documents décrivent l'utilisation de catalyseurs basiques. Très récemment, les chercheurs chinois, [32] ont décrit l'utilisation des bases fortes et proposent deux voies différentes, comme indiqué ci-dessous.

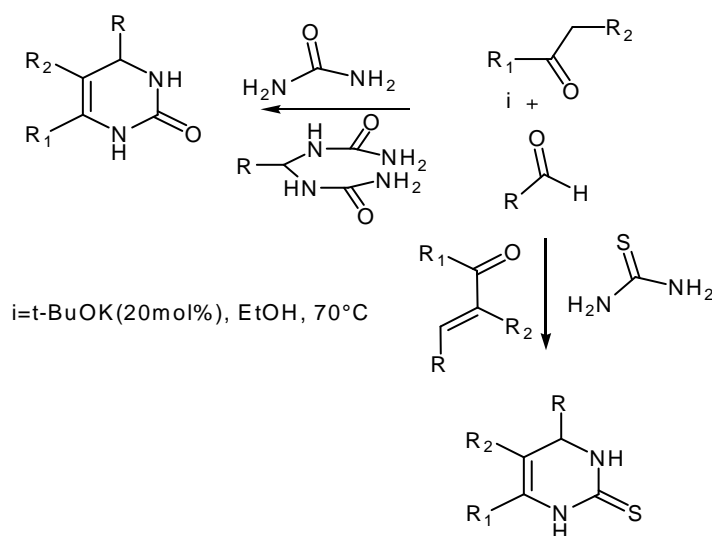


Schéma I.8 : Catalyse basique pour la synthèse de la 3,4-dihydropyrimidinone/thione

➤ **Mécanisme proposé par Litvic 2010 (acide de Brönsted)**

Le mécanisme rapporté dans cette réaction passe par la formation de l'intermédiaire 'uréido-crotonate' **C** tel que rapporté par Capanec contrairement à l'intermédiaire acyliminium **F** (suggestion de Kappe) [33].

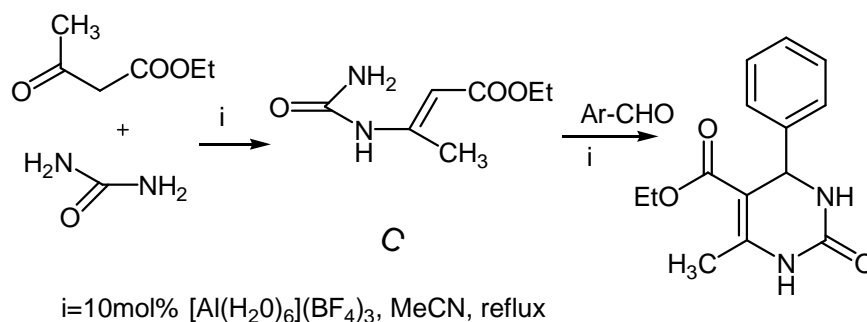
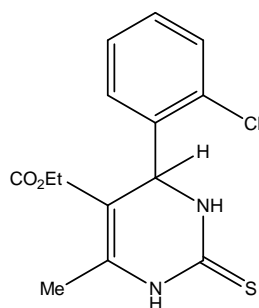
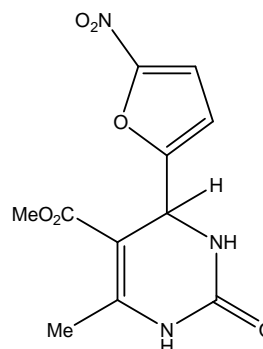


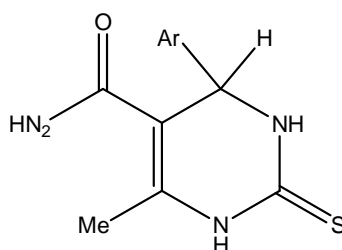
Schéma I.9 : Mécanisme de Litvic 2010 (acide de Brönsted)

V- Intérêts biologiques des DHPMs

Les composés de Biginelli montrent depuis longtemps une diverse gamme d'activités biologiques. Dès 1930, quelques dérivés ont été utilisés pour protéger la laine contre les mites **4-A** [34]. Plus tard, un intérêt particulier a été porté sur l'activité antivirale des composés de Biginelli menant, par la suite au développement du Nittractin **4-B** qui possède une excellente activité antivirale [35,36]. Le même composé exhibe également une activité antibactérienne modeste.

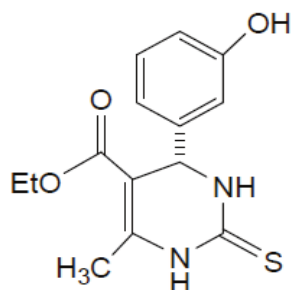
**4-A****4-B**

La 3,4-dihydropyrimidinone et certains de ses analogues telles les 5-carboxamid-pyrimidin-thiones **4-C** ont été utilisés comme agents anti tumoraux, anti inflammatoires [37] et analgésiques [38]. Ils ont montré également une activité inhibitrice d'agrégation des plaquettes de sang [39].

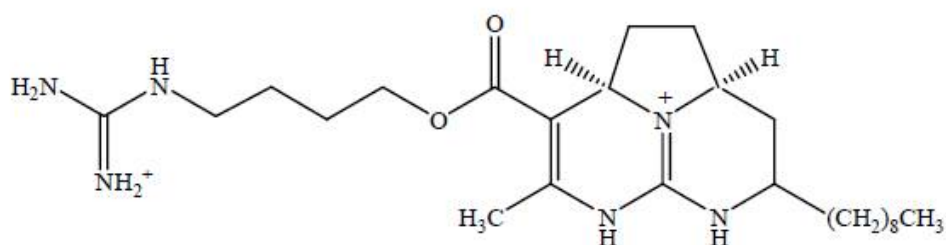
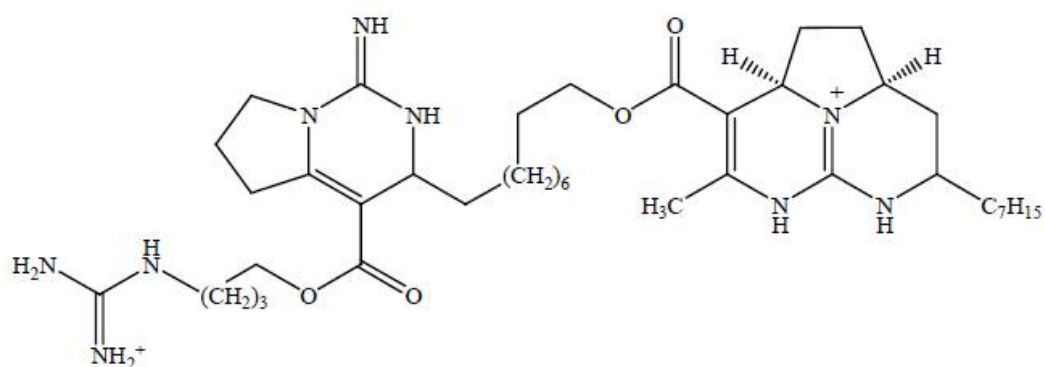
**4-C**

5-carboxamid-pyrimidin-thiones

La 5-(éthoxycarbonyl)-6-méthyl-4(3-hydroxyphényl)-3,4dihydropyrimidin-thione nommé le Monastrol **4-D** est une nouvelle molécule perméable qui a conduit au développement de nouveaux médicaments anticancéreux, le monastrol est connu comme inhibiteur spécifique de kinesis mitotique, et est considéré comme promoteur pour le développement de nouvelles drogues anticancéreuses [40].

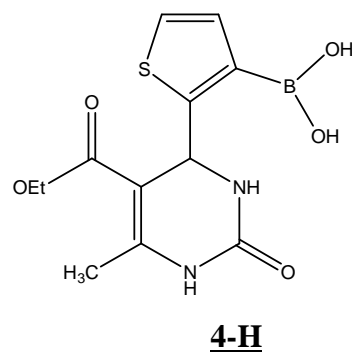
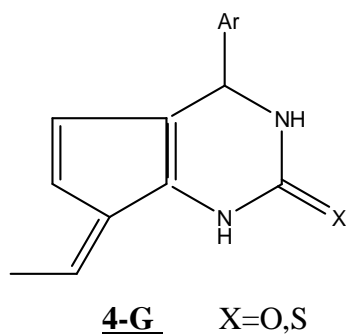
**4-D**

En plus de ces dérivés DHPMs synthétiques, plusieurs produits marins avec des activités biologiques intéressantes les dihydropyrimidine-5-carboxylates de base ont été isolés tels que le Batzelladine A et B **4-E** et **4-F** [41] et la crambine [42].

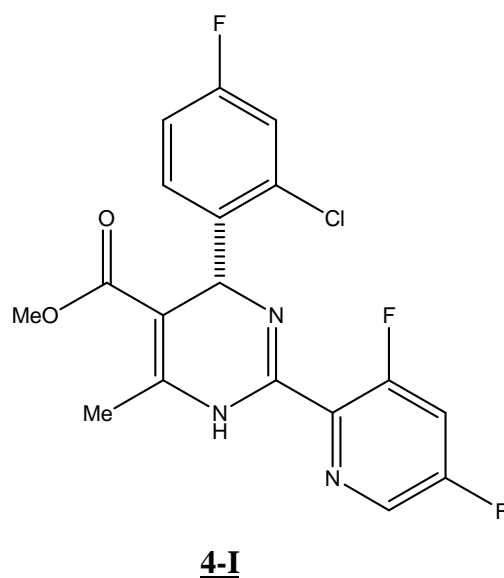
**4-E****Batzelladine A****4-F****Batzelladine B**

Ces composés ont été isolés de l'éponge rouge des caraïbes de l'espèce de Barzella, et permet d'inhiber la liaison de la protéine de l'enveloppe gp-120 du virus du sida avec les cellules humaines CD4 et CD8 donc de nouvelles pistes thérapeutiques pour cette maladie [43].

Il a été montré récemment que certaines dihydropyrimidinones fusionnées comportant un motif arylidène **4-G** sont des agents anti-tumoraux puissants [44]. Des études initiales ont montrés que le dérivé **4-H** a un potentiel thérapeutique comme agent puissant contre les cellules malignes du cancer du sein de la souche MCF₇ [44].



D'autre part une bonne activité inhibitrice de l'hépatite B a été réalisée par l'emploi du composé **4-I** de synthèse [45], ce dernier présente des propriétés inhibitrices de la réplication du virus de l'hépatite B. Il a été démontré également que cette activité est liée exclusivement à l'énantiomère (S) de ce composé.



VI- β -dicarboxylés

Les composés 1,3 dicarboxylés ou β -dicarboxylés sont des outils synthétiques exceptionnels grâce à la présence de quatre sites réactives avec un caractère à la fois électrophile et nucléophile.

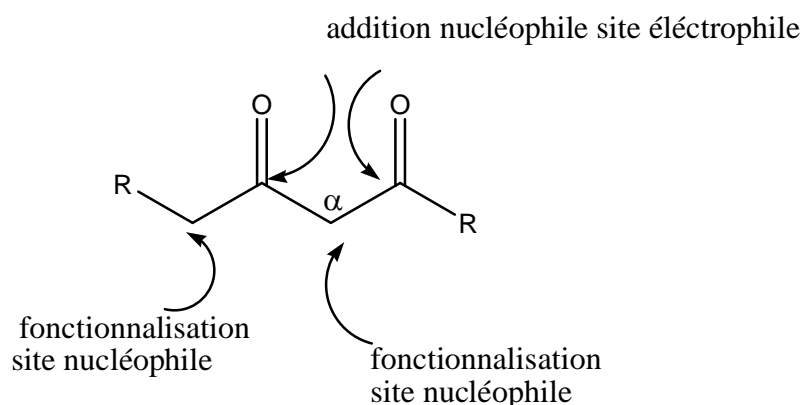


Figure I.7 : Sites réactifs des β -dicarbonylés

Parmi les dérivés 1,3-dicarbonylés commerciaux, les β -cétocesters ont trouvé de multiples applications du à leur réactivité en position α . La condensation directe des dérivés 1,3-dicarbonylés avec les aldéhydes suivie d'une déshydratation connue sous le nom de la réaction de Knoevenagel en présence d'une base faible telle qu'une amine par exemple a fait l'objet de nombreux travaux [46]. Cette séquence est utilisée dans de nombreux cas comme réactif initial dans les réactions multicomposantes (Figure I.7).

VI-1- Réactivité des β -dicétones

a) Réaction d'alkylation

Les énolates issus de ces dérivés β -dicarbonylés sont reconnus pour être des outils synthétiques importants et flexibles en synthèse organique. Leur alkylation peut être effectuée soit sur l'atome de carbone α , soit sur l'atome d'oxygène. Ils peuvent ainsi former une liaison carbone-carbone ou carbone-oxygène.

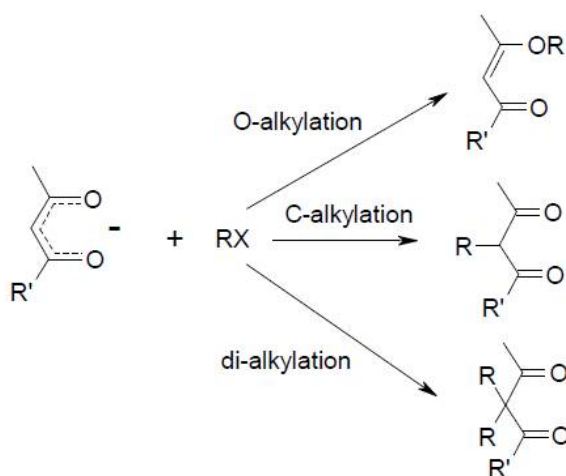


Figure I.8 : Alkylation des β -dicétones

En 1976, le groupe de Mac Murry [47] a développé une méthode de synthèse des composés carbonylés α,β -insaturés en trois étapes avec de bons rendements à partir d'un cétoester. L'aldol formé après action du dérivé dicarbonylé sur l'aldéhyde évolue vers une lactone qui après ouverture décarboxylante donne accès à la cétone conjuguée.

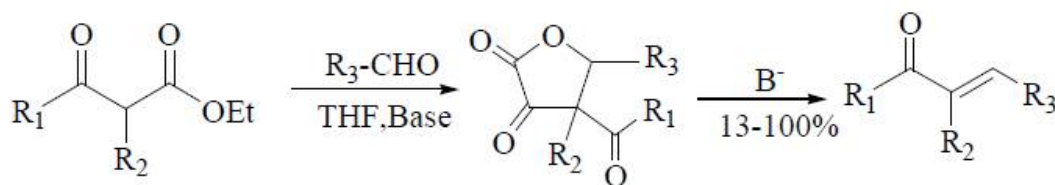


Figure I.9 : Réaction de Mac Murry

La fonctionnalisation sélective en position γ de ces systèmes, est un sujet de recherche attractif. L'alkylation de Weiber qui est la plus souvent citée [48]. Le dianion d'une β -cétoester est généré par deux déprotonations successives à l'aide de NaH et d'un équivalent de n-butyllithium dans le THF. Il réagit ensuite sélectivement avec, divers agents alkylants pour former des produits d' γ -alkylation avec de bon rendement.

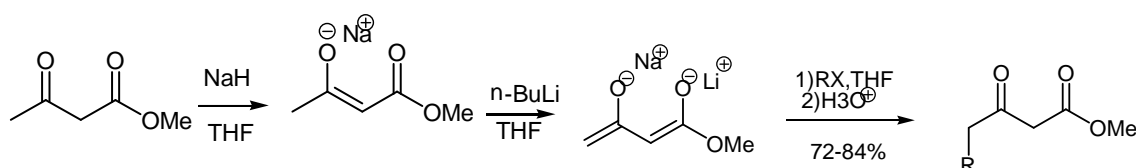


Figure I.10 : Alkylation des β -dicétones

b) Réactivité Vis-à-vis des amines

Les β -dicétones ou les aldéhydes β -cétoniques se condensent avec les arylamines, à 100 °C, pour former des β -aminoènones. En présence d'acide fort, elles sont O-protonées ce qui permet une substitution électrophile du cycle aromatique avec formation de quinoléines.

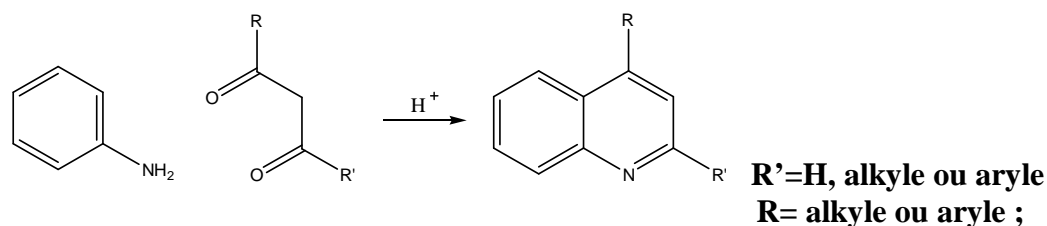


Figure I.11 : Synthèse des Quinoléines

VI-2- Les β -dicétones et les réactions multi composantes

Les premiers dérivés 1,3-dicarbonylés ont été introduits dans les réactions multi composantes par Hantzsch en 1882[12]. Ces dérivés sont des outils synthétiques intéressants, puisqu'ils présentent à la fois deux fonctions carbonyles électrophiles et deux atomes de carbone nucléophiles qui peuvent être fonctionnalisés suivant les conditions réactionnelles utilisées[49]. En 1893, Biginelli modifie les conditions réactionnelles mise au point par Hantzsch en remplaçant l'ammoniac par l'urée, donnant facilement accès à des 3,4-dihydropyrimidonone (DHPMs) substitués [50].

VII- Les coumarines

Les Coumarines sont des lactones d'acide hydroxycinnamique (2*H*-1-benzopyran-2-one) qui existent dans les plantes et également dans les champignons et les bactéries.

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 (CH_3COONa) [51]. 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... [51].

Les coumarines appartiennent à la classe des composés phénoliques, elles constituent, avec les flavonoïdes, les chromones et les isocoumarines, un très vaste ensemble de substances, L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'un noyau benzopyrane.[52]

Environ 1300 coumarines ont été isolées à partir de ces sources naturelles comme un seul noyau ou en combinaison avec des sucres ou des acides. On distingue les coumarines simples et les coumarines complexes.

VII-1- Les coumarines simples

Les coumarines les plus répandues dans le règne végétal possèdent des substitutions (OH ou OCH_3) en position 6 et 7.

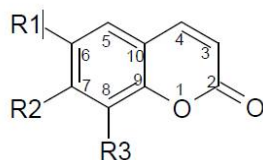


Figure I.12 : Structure générale des coumarines

Les génines

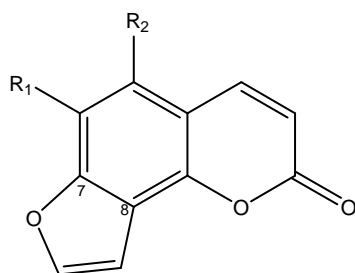
Coumarines	R1	R2	R3
Ombelliférone	H	OH	H
Esculétol	OH	OH	H
Scopolétol	OCH ₃	OH	H
Herniarine	H	OCH ₃	H
Fraxétol	OCH ₃	OH	OH

Les hétérosides

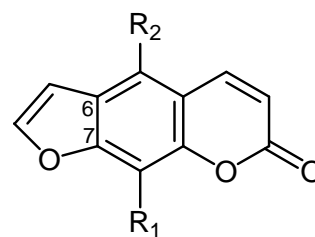
Coumarines	R1	R2	R3
Esculoside	O-Glu	OH	H
Cichorioside	OH	O-Glu	H
Scopuloside	OCH ₃	O-Glu	H
Fraxoside	OCH ₃	O-Glu	OH

VII-2- Les coumarines complexes

Parmi ces coumarines nous citons :

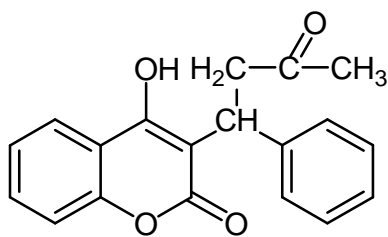


7,8-furocoumarine (angulaire)

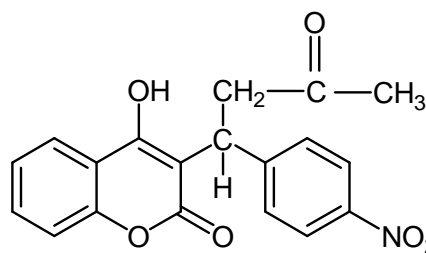


6,7-furocoumarines (linéaire)

Figure I.13 : Quelques coumarines complexes



La Warfarine



Acénocoumarol SINTROM®

Figure I.14 : Antivitamine K

VII-3- Intérêts des coumarines

Ces composés présentent de nombreuses applications pharmacologiques[53] : tels que anti-inflammatoire, antispasmodique, anti-oxydant et anti-tumorale, antibactérien, antiviral, antifongique, antihypertenseur, antituberculeux, anticonvulsivant, elles sont dotées de propriétés neuroprotectrices , et anti HIV.

Les coumarines sont aussi utilisées en cosmétique, les produits naturels tels que les huiles essentielles sont des photodynamisants dans les produits solaires. Les coumarines présentent environ 60% de la composition des cosmétiques, et cela est du à leur capacité de s'associer avec d'autres produits.

En plus de leurs activités, les coumarines sont utilisées comme sondes fluorescentes utilisées dans l'imagerie médical [54], dans :

- ✚ la localisation subcellulaire des lipides et des protéines (in vivo) ;
- ✚ l'étude dynamique du trafic intracellulaire ;
- ✚ l'étude des interactions moléculaires ;
- ✚ l'étude du repliement d'une protéine ;
- ✚ l'étude du séquençage de l'ADN.[54]

VIII- Molécules hybrides dans la recherche de nouveaux médicaments

Au cours de ces dernières années, la stratégie d'hybridation moléculaire a émergé comme une nouvelle approche qui implique un conglomérat de deux ou plusieurs pharmacophores dans un échafaudage moléculaire pour développer des molécules hybrides multifonctionnelles.

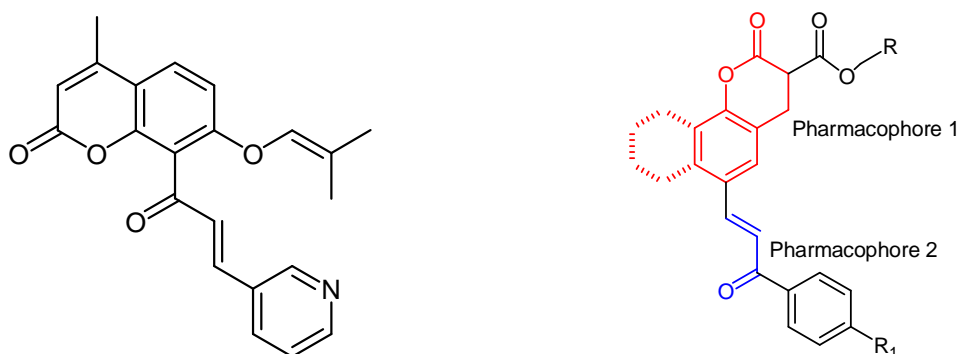


Figure I. 15 : Coumarin –chalcone [58]

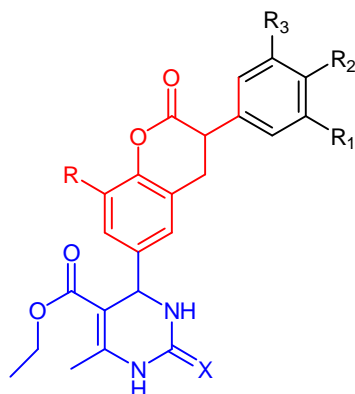


Figure I.16 : Hybride coumarin-Monastrol

Ces dernières ont :

- de multiples activités biologiques,
- le profil de sélectivité modifié,
- différents modes d'action, et / ou la réduction des effets secondaires indésirables
- surmonter la résistance aux médicaments, dus à ce mélange de pharmacophores dans une molécule [55 ,56].

En utilisant cette approche, plusieurs groupes de recherche ont conçu et synthétisé de nombreuses molécules hybrides. Des exemples de telles molécules comprennent la Ziprasidone, la Duloxétine et Ladostigil pour les maladies multifactorielles du Système nerveux central, et Sunitinib et Lapatinib pour le traitement des cancers. Beaucoup d'autres molécules hybrides ont été décrites pour le traitement d'autres maladies multifactorielles (qui sont très variables et hétérogènes impliquant de multiples systèmes organiques et cibles) comme les troubles métaboliques, le paludisme, l'inflammation [57,58].

Le Couplage des dérivés de la coumarine avec des molécules bioactives variées telles que les sulfonamides , pyrazoline, chalcone, des triazoles a donné de nouvelles molécules

hybrides, qui sont dotés de propriétés vasorelaxant, anti-agrégation plaquettaire, anticancéreux, antimicrobien, antioxydant et anti-inflammatoire [55-58].

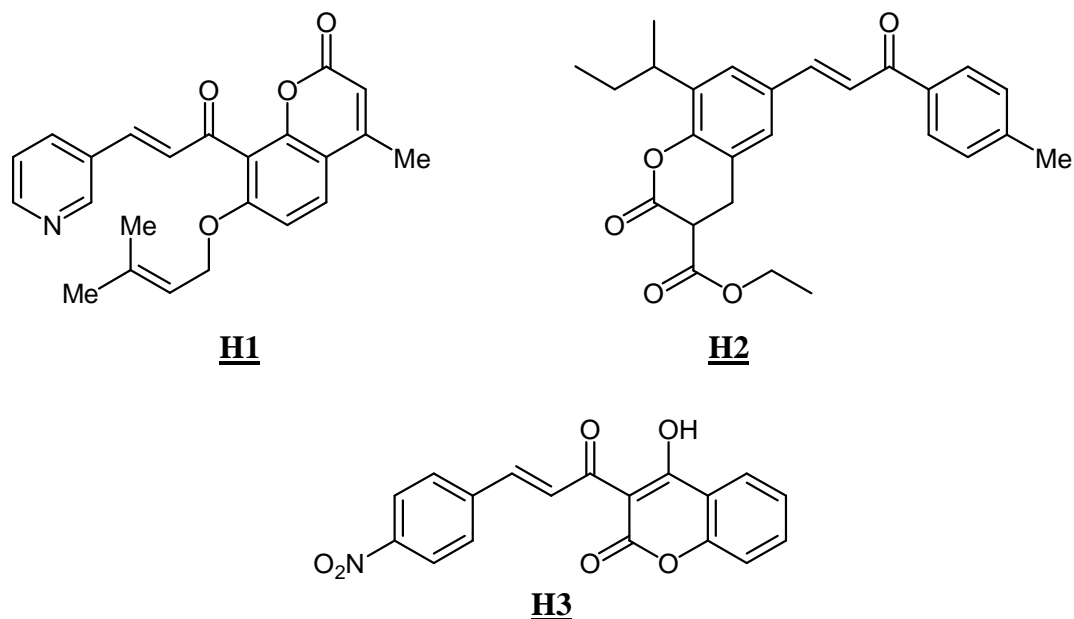


Figure I.17 : Exemple de molécules hybrides à activités biologiques.

On citera par exemple :

- ✚ l'hybride **H1** a montré une activité cytotoxique significative contre le cancer résistant au paclitaxel [59].
- ✚ le dérivé **H2** a montré une activité cytotoxique contre les cellules du carcinome cervical avec des $IC_{50} = 3,59 \mu M$ sans affecter les cellules fibroblastes normale [60].
- ✚ et le conjugué **H3** expose une activité antimalarial [61].

De même on citera l'hybride chalcone-coumarine-triazole **H4** qui présente une activité anticancéreuse et antimalarial [58].

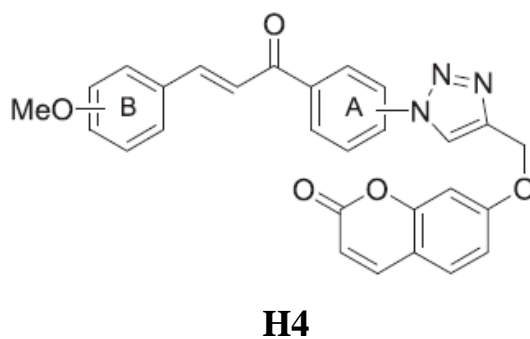


Figure I.18 : Molécule hybride coumarin-chalcon attaché par un triazole.

Nous reportons ci dessous les principales activités des molécules hybrides de la coumarine avec différents substituants[62].

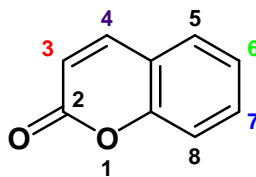


Figure I.19 : Structure de la coumarine

Groupes explorés	Préposition
Activité anticancéreuse	
	En position 3 : Benzimidazole, sulfonamides, dihydropyrazole.
	En position 4 : Trans –vinyl benzène
	En position 6 : chalcone et cinnamoyle
	En position 7 :groupes électrodonneurs.
	En position 8 : Chalcone
Activité antioxydante et anti-inflammatoire	
	En position 3 : acide α -lipoic, pyrazoline et pyrazole
	En position 4 : Benzofuran,chromone et 4-hydroxycoumarine
	En position 6 : chalcone
Activité antivirale	
	En position 3 : Imidazopyridine,benzoxazoles,benzothiazoles ,benzimidazole et purine
	En position 4 : thiazine

ParTIE I
CHAPITRE II

Synthèse de molécules hybrides coumarin-3,4-dihydropyrimidin-2(H)-ones/thiones

I. Introduction

L'époque actuelle est difficile pour l'innovation dans le domaine du médicament, dans un environnement de plus en plus contraignant chaque année. Précaution, anxiété, tout devient dangereux.... Les médicaments sont, comme beaucoup d'autres produits, victimes de ce changement de mentalité. Cela a un impact sur l'aspect économique de l'industrie pharmaceutique : le développement de médicaments est de plus en plus onéreux.

La synthèse de molécules hybrides est une voie vers de nouveaux médicaments, en particulier celle d'un anticancéreux, la Bléomycine. Ce principe actif est un exemple très remarquable de molécule hybride, produite par une bactérie, *Streptomyces verticillus*, elle se compose de trois parties. Une première partie de la molécule est utile à l'interaction avec sa cible thérapeutique qui est l'ADN; une seconde, faite de sucres, est responsable de la pénétration dans les organismes, et une troisième est impliquée dans la création de complexes avec des ions métalliques avec un pouvoir Rédox comme le fer. Son activité dépend donc de trois facteurs : son interaction avec l'ADN, sa distribution, et sa capacité à chélater des ions métalliques. Ces trois activités vont provoquer une double coupure sur l'ADN de cellules tumorales, origine de l'action anticancéreuse de ce médicament.

Jusqu'en 1990, les chimistes n'étaient peu ou pas entrés dans la stratégie des molécules hybrides, qui constitue donc un champ de travail important avec de larges perspectives d'évolution.

Plusieurs travaux ont été rapportés dans la littérature sur la synthèse et l'évaluation biologique des hétérocycles pyrimido-fusionnés tels que pyrimido[4,5-d]pyridazin-8(7H)-ones [63], pyrano[2,3-d]pyrimidines, pyrido[2,3-d]pyrimidines [64], et 2,4-diaminopyrido[2,3-d]pyrimidines[65] .

Dans la suite de notre intérêt sur la synthèse des hétérocycles fusionnés, et compte tenu de l'importance des molécules hybrides, et de leur synthèse qui palie plusieurs inconvénients nous décrivons dans ce travail une stratégie simple pour la synthèse d'une nouvelle série de 4-aryl-6-méthyl-5-(2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones/thiones **4a-e**, **5a-d**, **6a-e**, **7** et **8** dans des conditions modérées en utilisant la 3-acétoacétylcoumarine et ses dérivés **1a-e** en tant que réactifs principaux.

II- Synthèse des dérivés 3-acétoacétylcoumarines

Les dérivés 3-acétoacétylcoumarines (**1a-e**) ont été récemment synthétisés dans notre laboratoire [66], à partir des aldéhydes aromatiques 2-hydroxylés et de la 4-hydroxy-6-méthyl-2*H*-pyran-2-one (acide triacétique lactone notée TAL) via la condensation de Knoevenagel. La réaction est réalisée sous micro-ondes et par voie conventionnelle (schéma I.10) [67, 68]. Ces composés sont des éléments clés, car ils contiennent un noyau coumarinique ainsi que le groupe méthylène actif du groupement acétoacétyle, qui est sujette à subir des transformations chimiques plus utiles.

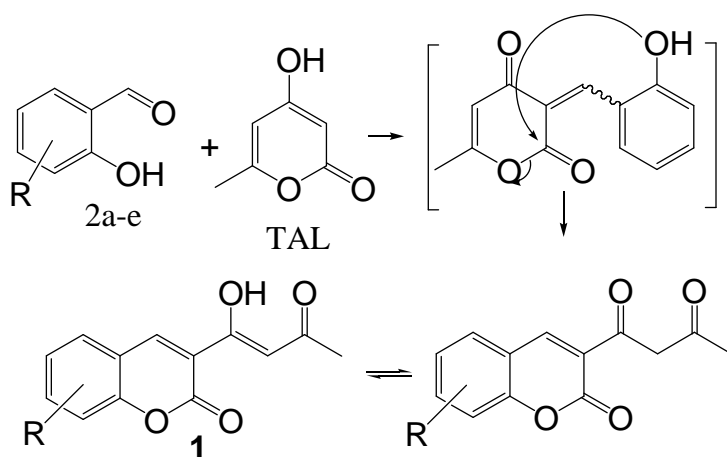


Schéma I.10. Synthèse des 3-acétoacétylcoumarines **1a-e**.

Nous nous sommes alors proposé de reprendre la synthèse de ces composés dans le but de les utiliser comme matières premières dans nos travaux de recherche

II-1- Synthèse du 3-acétoacétylcoumarine (**1a**)

La réaction de condensation de la TAL vis-à-vis du salicyaldéhyde au reflux conventionnel du toluène ou sous irradiation des M.O et en présence d'un catalyseur basique en proportion équimolaire pendant une heure et 30 mn au reflux et 10mn sous M.O, conduit à la formation du composé 1-(2-oxo-2*H*-chromèn-3-yl) butane-1,3-dione (ou 3-acétoacétylcoumarine) **1a**.

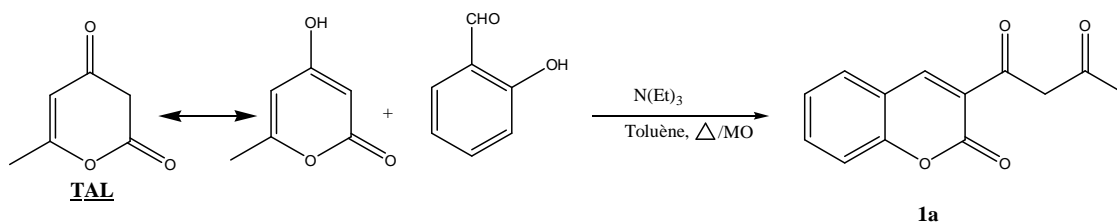


Schéma I. 11 : Synthèse de la 3-acétoacétylcoumarine **1a**

La structure de ce composé a été confirmée par une étude spectroscopique détaillée.

II-1-1- Etude par chromatographie sur couche mince

L'étude par chromatographie sur couche mince (CCM) a été réalisée dans un éluant constitué d'un mélange de solvants chloroforme/méthanol (2ml/7 gouttes). Nous avons obtenu une seule tache différente de celle du produit départ. **Rf= 0,66**

II-1-2- Etude par spectroscopie de masse électrospray LC-MS (ESI(+))

L'électrospray est un processus d'ionisation qui se produit en phase liquide et à pression atmosphérique. Son principe est le suivant:

Les substances sont dissoutes dans une solution hydroalcoolique ou eau-acétonitrile dans laquelle sont habituellement ajoutés des composés qui augmentent la conductivité (par exemple: 0,1 % en acide acétique ou trifluoracétique ou de 2 à 50 mM d'acétate d'ammonium). Cette solution est introduite dans un capillaire d'acier inoxydable (50µm de diamètre) porté à un potentiel élevé (entre 3 et 5 KV). Sous l'action conjuguée du champ électrique et d'un courant gazeux coaxial (azote ou anhydride carbonique), la solution forme un cône dynamique à l'extrémité du capillaire, appelé « cône de Taylor ». Lorsque la charge de la solution qui forme le cône de Taylor s'approche de la limite de Rayleigh*, celui-ci s'allonge formant alors un filament liquide. Il finit par se détacher et se disperse sous forme de gouttelettes d'un diamètre nominal de 1-2 µm. La solution est donc transformée en un nuage de fines gouttelettes (nébulisât) chargées. L'évaporation du solvant contenu dans ces gouttelettes va provoquer leurs rétrécissements jusqu'au moment où les forces coulombiennes répulsives vont approcher le niveau des forces de cohésion de celles-ci et provoquer leurs explosion.

La MS-ESI existe sous deux modes :

- le mode positif ESI(+) est également applicable à des molécules ne possédant aucun site ionisable grâce à la formation d'adduits de sodium, potassium, ammonium ou autres. Les spectres correspondent généralement à une distribution statistique de pics consécutifs caractérisant des ions moléculaires multiplement chargés par protonation $(M+zH)^{z+}$, par des cations $(M+zN)^{z+}$ ou par $(M+yH+zN)^{(y+z)+}$ avec N= Na, K, Ca....,
- le mode négatif ESI- est applicable à toutes les molécules qui possèdent des sites ionisables qui sont aptes à céder un proton H^+ ou un cation.

Le spectre de masse réalisé par la LC-MS en mode ESI(+), montre un ion moléculaire, à $m/z = 253$ (100%) correspondant à $(M+Na)^+$, confirmant ainsi la formule brute $C_{13}H_{10}O_4$ du composé **1a**.

II-1-3- Etude par spectroscopie RMN du proton 1H

Le spectre RMN du 1H est réalisé dans un appareil spectromètre Bruker Avance 300, proton à 300.13 MHz, en utilisant le $CDCl_3$ comme solvant et le TMS comme référence interne. Les valeurs des déplacements chimiques sont exprimées en ppm par rapport au signal du TMS.

Le spectre RMN du proton de **1a** se caractérise par les déplacements chimiques significatifs de la forme céto-énolique du groupement acétoacétyle [66,67].

En effet la présence d'un tel groupe donne en RMN du proton deux signaux singulets:

À $\delta = 4,22$ ppm (CH_2 , dione) et à $\delta = 7,01$ ppm (CH, éno).l).

-Le signal qui apparaît à $\delta = 8,63$ ppm correspond au proton du carbone C_4 du noyau chromène, et ceux à $\delta = 7,31$ ppm (CH (8)), à $\delta = 7,34$ ppm (CH (6)), à $\delta = 7,60$ ppm (CH (7)) et à $\delta = 7,65$ ppm (CH (5)) sont les pics qui correspondent aux protons du noyau aromatique.

-L'apparition du pic à $\delta = 15,85$ ppm correspondant au groupement OH confirme la présence de la forme cétoénolique **1a(I)/1a(II)** (schéma I. 12). Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau I-1.

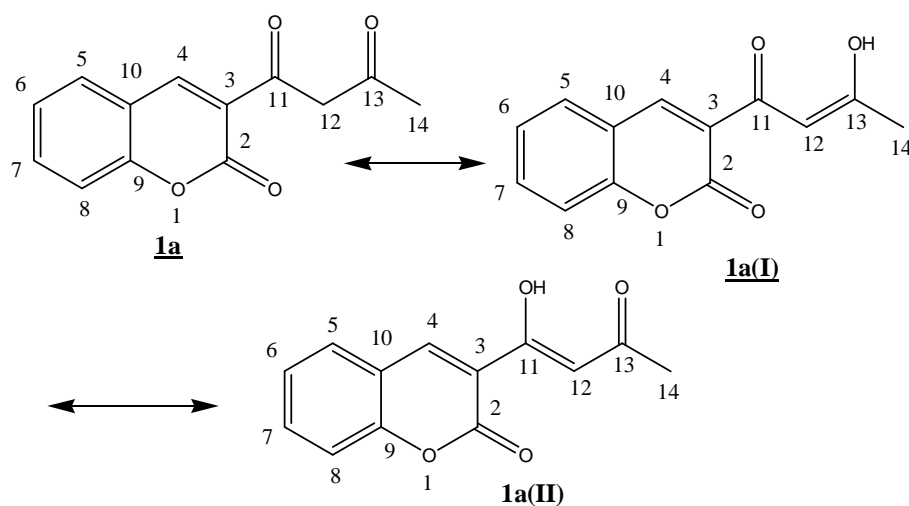
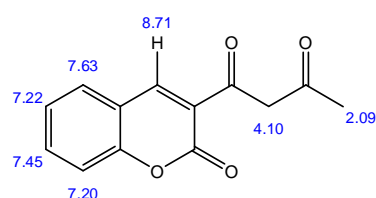
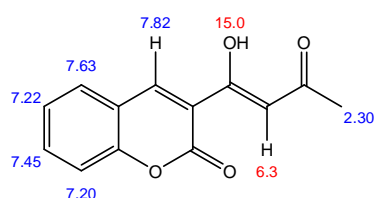
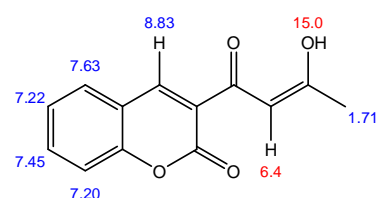


Schéma 1.12: Formes tautomères du composé **1a**

**1a****1a(II)****1a(I)**

Estimation théorique RMN ¹H [69]

Tableau I-1: Résultats du spectre RMN ¹H du composé **1a**

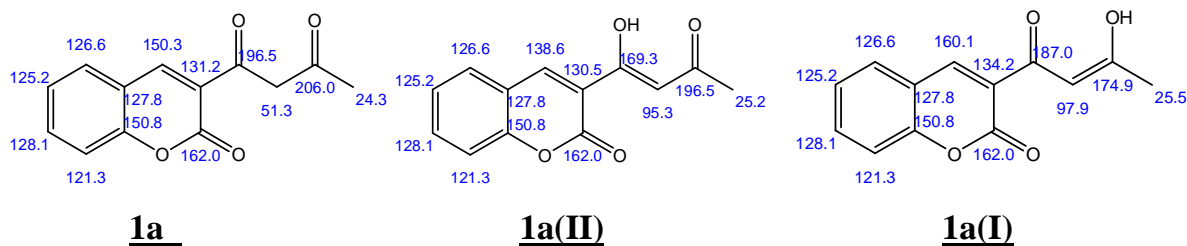
δ théorique (ppm)	δ expérimental (ppm)	Multiplicité	Attribution
2,09	2,26	S	CH ₃ (14) (dicétones)
2,30	2,35	s (3H)	CH ₃ (14)(céto-énolique)
4,10	4,22	s (2H)	CH ₂ (12, dione)
6,30	7,01	s (1H)	CH (12, énol)
7,20	7,31	d (1H)	CH(8)
7,22	7,34	t (1H)	CH(6)
7,45	7,60	t (1H)	CH (7)
7,63	7,65	d (1H)	CH (5)
8,71	8,63	s (1H)	CH(4)
15,00	15,85	Large	OH (énol)

II-1-4- Etude par spectroscopie RMN ¹³C

Les spectres RMN ¹³C sont réalisés dans un appareil spectromètre Bruker Avance 300, carbone : 75,47 MHz, en utilisant le CDCl₃ comme solvant et le TMS comme référence interne. Les valeurs des déplacements chimiques sont exprimées en ppm par rapport au signal de TMS.

-Dans ce spectre, nous remarquons que tous les pics qui apparaissent sont compatibles avec les carbones du composé **1a**.

-Dans le domaine des carbones sp³, nous observons un pic qui ne peut être attribué qu'au groupement méthyle CH₃ (14) et dans le domaine des carbones sp², apparaissent 6 pics qui correspondent à C (4), C (5), C (6), C (7), C (8) et C (12) sous la forme énolique. Nous observons aussi un pic dans les champs forts à $\delta = 56,34$ ppm correspondant à C (12) sous la forme diones (CH₂). Dans les champs faibles apparaissent sept signaux attribuables aux carbones C (9), C(11), C (13, énol), C (13, diones), C (2) et C (3).



Estimation théorique RMN ^{13}C [69]

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau I-2 suivant :

Tableau I-2 : Résultats du spectre RMN ^{13}C du composé **1a**

δ théorique (ppm)	δ experimental (ppm)	Attribution
24,30	27,45	CH ₃ (14)
51,30	56,34	CH ₂ (12,diones)
95,30-97,90	101,49	CH (12, énoI)
121,30	116,44	C(8)
125,20	118,40	C (6)
126,60	120,46	C (5)
127,80	124,84	C (10)
128,10	129,46	C (7)
134,20	133,87	C (3)
150,80	145,33	C (9)
160,10	154,27	C(4)
150,80	157,90	C(9)
162,00	171,83	C (2)
174,90	191,40	C (13, énoI)
187,00	199,61	C (11)
206,00	202,94	C (13, cétone)

II-1-5- Etude par spectroscopie UV / visible

Le spectre d'absorption U.V/Visible de **1a** est réalisé dans l'acétate d'éthyle à une concentration de 10^{-4}M . Ce dernier montre deux bandes distinctes $\lambda_{\text{abs1}} = 290 \text{ nm}$ (C=O, transition n- π^*) et $\lambda_{\text{abs2}} = 350 \text{ nm}$ (OH énoI, transition π - π^*) (Fig. I.20).

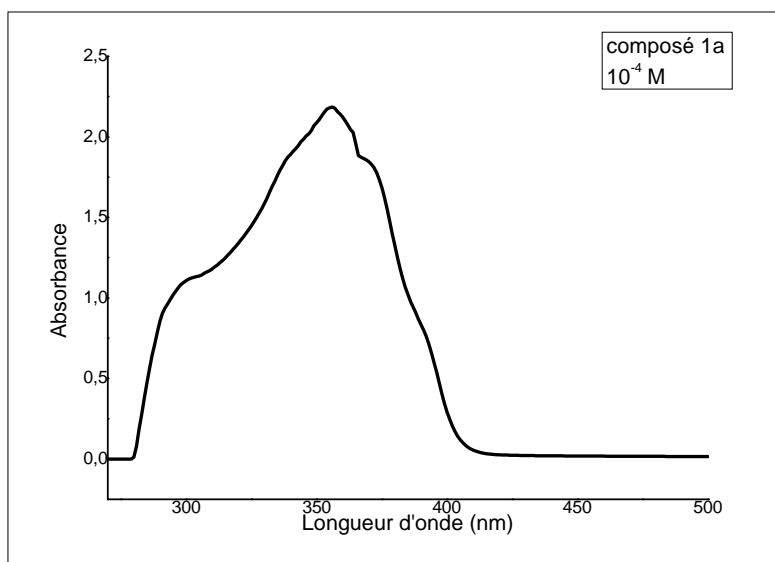
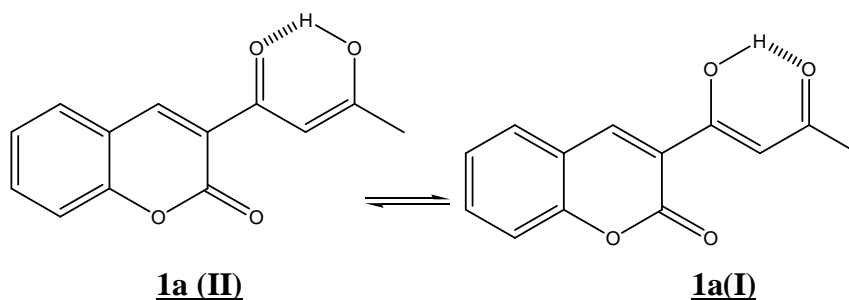


Figure I.20 : Spectre d'absorption UV/vis du composé **1a** dans l'acétate d'éthyle à 10^{-4} M

II-1-6- Etude par spectroscopie Infra Rouge

Les principales bandes obtenues dans du KBr en pastilles se répartissent comme suit :
 ν (cm^{-1}): 3479 - 2250- 1617 - 1381 -1048 -754.

La bande fine distincte 1617 cm^{-1} suggère la présence de la liaison C=O (2) de la coumarine. Et la bande à 2250 cm^{-1} confirme la présence d'un carbonyle extra cyclique (C=O du groupement acétoacétyle). Quand à la bande large 3479 cm^{-1} , elle correspond à la liaison C-OH (énol) associée par une liaison à hydrogène :



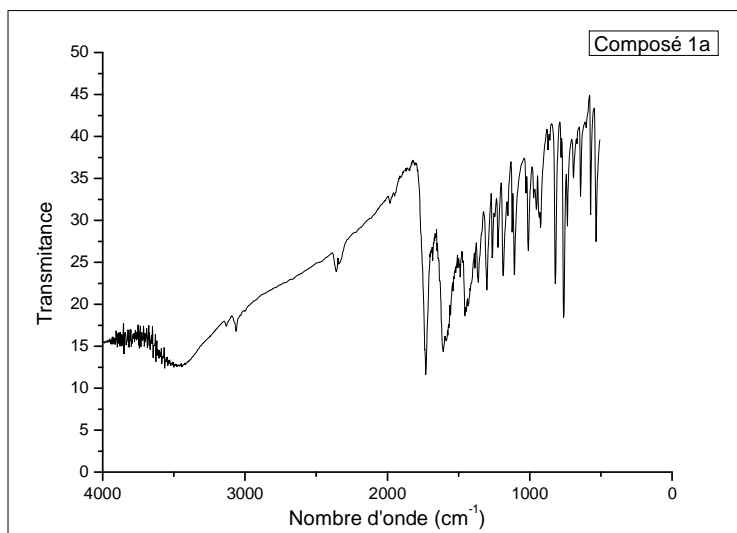


Figure I.21 : Spectre IR du composé **1a** dans le KBr

II- 2- Synthèse de la 3-acétoacétyl-7-hydroxycoumarine (**1b**)

En travaillant dans les mêmes conditions opératoires que celles décrites précédemment et en utilisant le 2,4-dihydroxybenzaldéhyde, le composé 1-(7-hydroxy-2-oxo-2*H*-chromèn-3-yl) butane-1,3-dione (ou la 3-acétoacétyl-7-hydroxycoumarine) **1b** s'est formé.

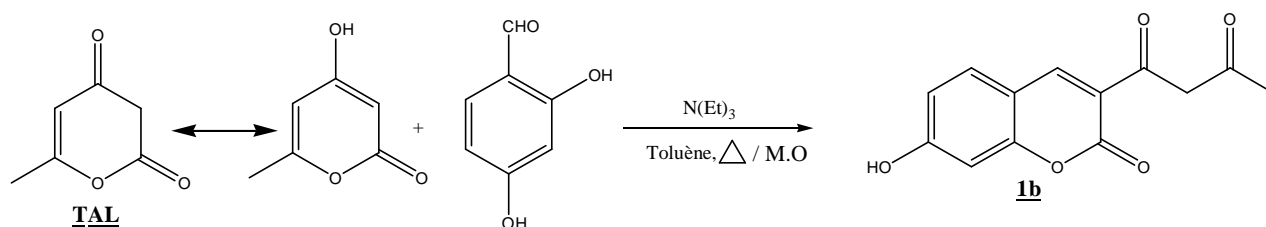


Schéma I.13 : Synthèse de la 3-acétoacétyl-7-hydroxycoumarine **1b**

II-2- 1-Etude par chromatographie sur couche mince

La CCM a été réalisée dans un éluant constitué d'un mélange de solvants chloroforme-méthanol (2ml/ 15 gouttes). Nous avons obtenus une seule tache différente de celle du produit de départ. **R_f=0,55**

II-2-2- Etude par spectrométrie de masse ESI(+)

Le spectre de masse réalisé par la LC-MS en mode ESI(+), montre deux ions moléculaires, un pic à $m/z = 269$ (100%) correspondant à $(M+Na)^+$ et un autre pic à $m/z = 247$ (10%) correspond à $(M+H)^+$, confirmant ainsi la formule brute $C_{13}H_{10}O_5$ du composé **1b**.

II-2-3- Etude par spectroscopie RMN du proton 1H

Les pics caractéristiques du groupement acétoacétyl apparaissent à $\delta = 2,20$ ppm (s, CH_3 (14)), à $\delta = 4,10$ ppm (s, CH_2 , dione), à $\delta = 6,74$ ppm (s, CH éno) et un pic large à $\delta = 16,26$ ppm (OH, éno). Ils apparaissent aussi d'autres signaux à $\delta = 6,83$ ppm (s, 1H), à $\delta = 6,85$ ppm (d, 1H) à $\delta = 7,77$ ppm (d, 1H) ce sont les protons du noyau aromatique avec la présence d'un pic large à $\delta = 11,16$ ppm correspondant au groupement OH (7) du noyau aromatique. Nous observons aussi un singulet à $\delta = 8,72$ ppm qui est attribuable au proton H (4) du noyau chromène.

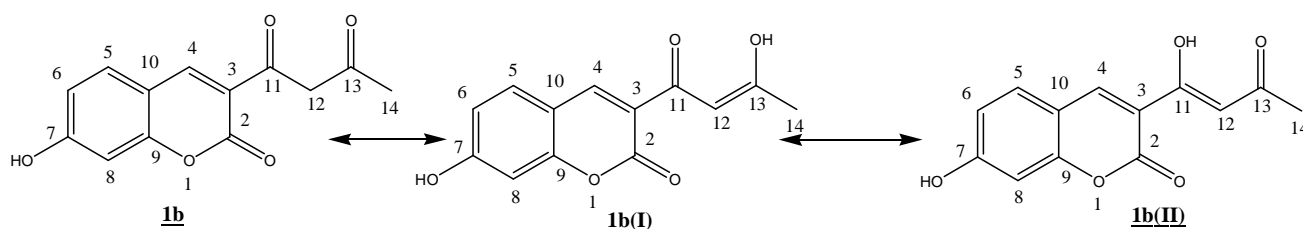
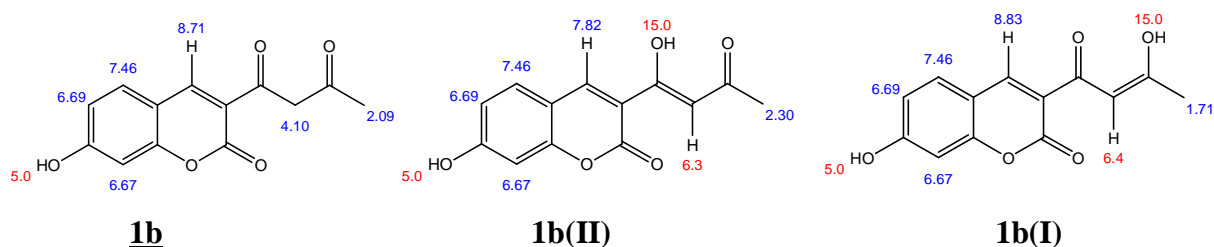


Schéma I.14 : Formes tautomères du composé **1b**



Estimation théorique RMN 1H [69]

Dans le tableau I-3 ci-dessous sont reportés les résultats du spectre RMN du proton.

Tableau I-3: Résultats du spectre RMN ^1H à 300 MHz du composé **1b**.

δ théorique (ppm)	δ expérimental (ppm)	Multiplicité	Attribution
2,30	2,20	s (3H)	CH ₃ (14)
4,10	4,10	s (2H)	CH ₂ (12, diones)
6,40	6,74	s (1H)	CH (12, énoI)
6,67	6,83	s (1H)	CH(8)
6,69	6,85	s (1H)	CH(6)
7,46	7,77	d (1H)	CH (5)
8,83	8,72	s (1H)	H (4)
5,00	11,16	Large	OH (7)
15,00	16,26	Large	OH (céto-énoIique)

II-2-4- Etude par spectroscopie RMN ^{13}C

Le spectre RMN ^{13}C révèle tous les pics correspondants aux carbones du composé **1b**. Dans le tableau I-4, sont reportés les résultats du spectre RMN ^{13}C du composé **1b** comparés aux résultats de l'estimation théorique.

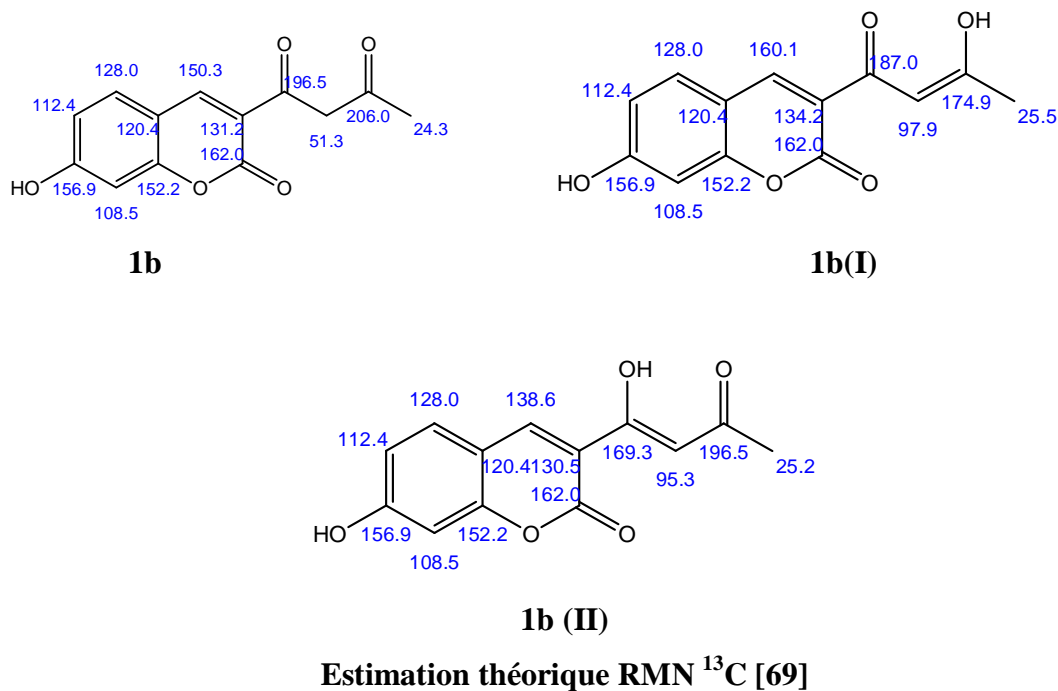


Tableau I-4: Résultats du spectre RMN ^{13}C à 75 MHz du composé **1b**.

δ Théorique (ppm)	δ expérimentale (ppm)	Attribution
25,5	26,59	CH ₃ (14)
51,30	56,51	CH ₂ (12.dione)
95,30-97,90	100,04	CH (12, énoI)
108,50	101,71	C(8)
112,40	110,85	C (6)
120,40	114,28	C (10)
128,00	132,26	C (5)
134,20	146,65	CH (3)
152,20	156,55	C (9)
156,90	157,83	C (7)
160,10	164,22	C(4)
162,20	174,80	C(2)
174,90	191,41	C (13, énoI)
187,00	197,56	C (11)
206,00	203,36	C(13 ,diones)

II-2-5- Etude par spectroscopie UV/visible

Le spectre d'absorption UV/Visible de **1b** réalisé juste après dissolution dans l'acétate d'éthyle à 10^{-5}M montre deux bandes distinctes $\lambda_{\text{abs1}} = 280 \text{ nm}$ (C=O, transition n- π^*) et $\lambda_{\text{abs2}} = 383 \text{ nm}$ (OH énoI, transition π - π^*) (Fig. I.22)

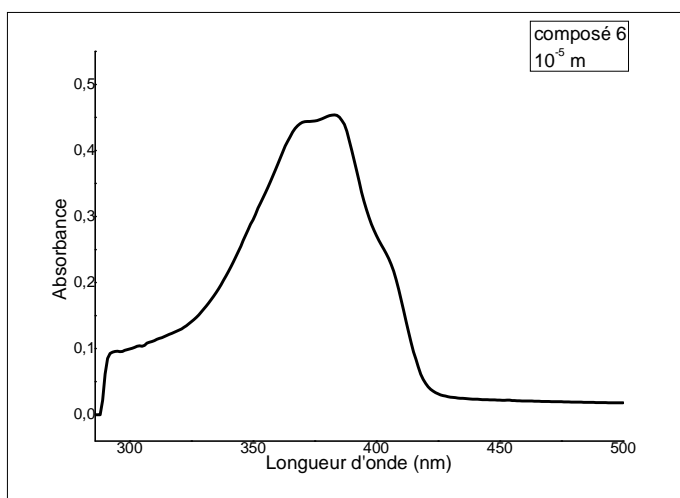


Figure I.22 : Spectre d'absorption UV/vis du composé **1b** dans l'acétate d'éthyle à 10^{-5}M

II-2-6- Etude par spectroscopie Infra Rouge

Les principales bandes obtenues dans du KBr en pastilles se répartissent comme suit :
 ν (cm^{-1}) : 3474 (OH, éno) ; 3242– 2250 (C=O acétoacétyle) ; 1650 (C=O position 2).

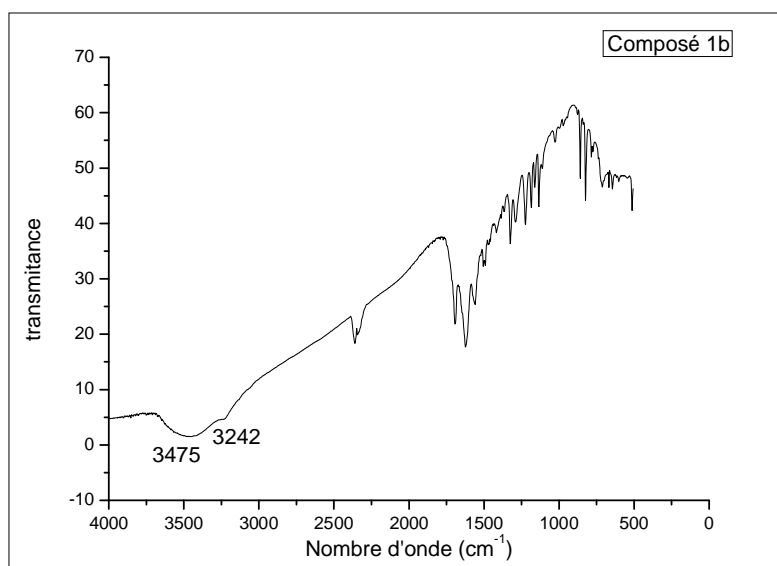


Figure I.23 : Spectre I.R du composé **1b** dans le KBr

II-3- Synthèse de la 3-acétoacétylbenzo[f]coumarine (**1c**)

La condensation du 2-hydroxy naphthaldéhyde sur la TAL donne le composé 1-(3-oxo-3*H*-benzo[f]chromen-2-yl) butane-1,3-dione (ou la 3-acétoacétylbenzo[f]coumarine) **1c**.

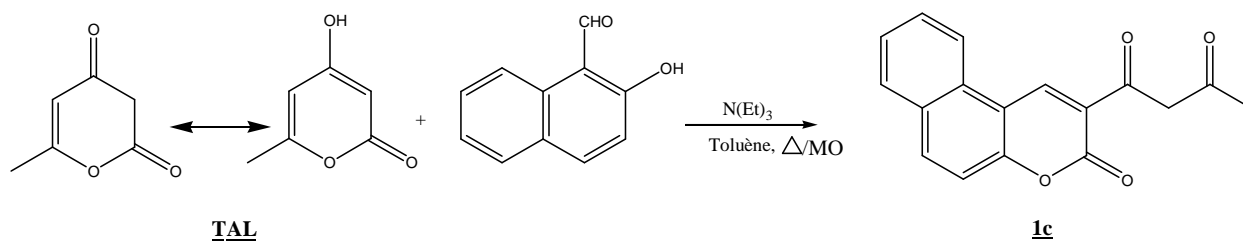


Schéma I.15 : Synthèse de la 1-(3-oxo-3*H*-benzo[f]chromèn-2-yl) butane-1,3-dione **1c**

II-3-1- Etude par chromatographie sur couche mince

La CCM a été réalisée dans un éluant constitué d'un mélange de solvants chloroforme-méthanol (2ml/15 gouttes). Nous avons obtenus une seule tache différente de celle du produit de départ. **R_f=0,55**

II-3-2- Etude par spectrométrie de masse ESI(+)

Le spectre de masse réalisé par la LC-MS en mode ESI(+), montre deux ions moléculaires, un pic à $m/z = 303$ (100%) correspondant à $(M+Na)^+$ et un autre pic à $m/z=281$ (10%) correspond à $(M+H)^+$, confirmant ainsi la formule brute $C_{17}H_{12}O_4$ du composé **1c**.

II-3-3- Etude par spectroscopie RMN du proton 1H

Comme pour les composés précédents, ils apparaissent les pics significatifs du groupement acétoacétyle à $\delta = 2,27$ ppm (CH_3 (14)), à $\delta = 4,26$ ppm (CH_2 , dione) et à $\delta = 7,06$ ppm (CH , éno).l).

-Le pic à $\delta = 9,31$ ppm correspond à CH (4) et l'autre à $\delta = 16,00$ ppm (large, OH) confirme la présence de la forme céto-éno.lique. Nous relevons aussi des pics significatifs des deux noyaux aromatiques, qui sont reportés dans le tableau I-5.

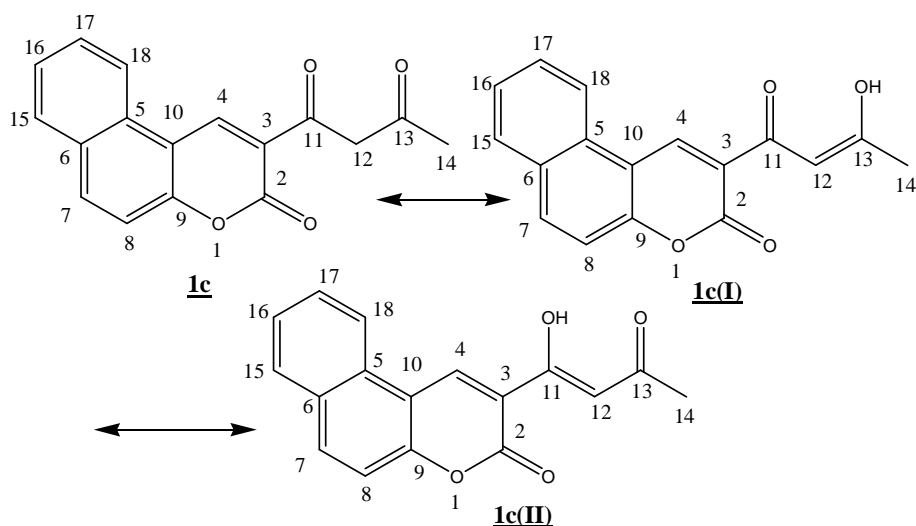
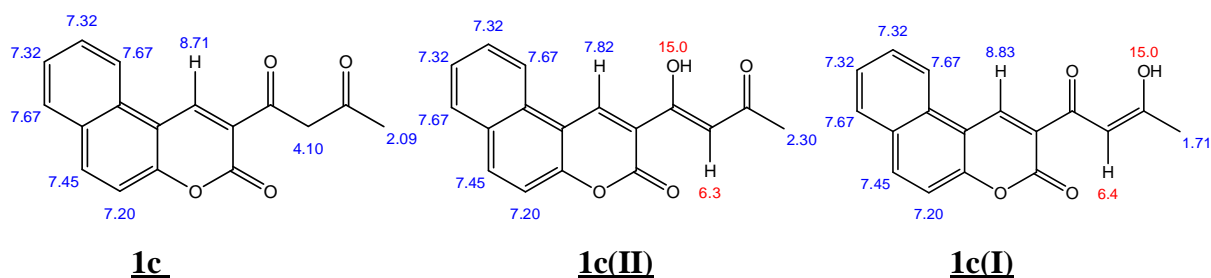


Schéma I.16 : Formes tautomères du composé **1c**



Estimation théorique RMN 1H [69]

Tableau I-5 : Déplacements chimiques en spectroscopie RMN ^1H du composé **1c**

δ théorique (ppm)	δ expérimental (ppm)	Multiplicité	Attribution
2,30	2,27	s (3H)	CH_3 (14, énoI)
4,10	4,26	s (2H)	CH_2 (12, dione)
6,40	7,06	s (1H)	CH (12, énoI)
7,20	7,39	d (1H)	CH(8)
7,32	7,55	t (1H)	CH(16)
7,32	7,68	t (1H)	CH(17)
7,45	7,87	d (1H)	CH (7)
7,67	8,02	d (1H)	CH (15)
7,67	8,29	d (1H)	CH (18)
7,82	9,31	s (1H)	CH(4)
15,00	16,00	Large	OH (énoI)

II-3-4- Etude par spectroscopie RMN ^{13}C

Le spectre RMN du ^{13}C enregistré, montre que le nombre de signaux qui apparaissent est compatible avec le nombre de carbone du composé **1c**.

Dans le domaine des carbones sp^3 , nous observons deux signaux qui ne peuvent être attribués qu'aux groupements méthyle en position (14) et CH_2 en position (12, forme diones).

Dans le domaine des carbones sp^2 , apparaissent les pics qui correspondent aux carbones CH(4), C (9), C (10), C(3), C(13), et C(11).

Dans le tableau I-6, nous reportons les résultats du spectre RMN du ^{13}C comparés aux résultats de l'estimation théorique.

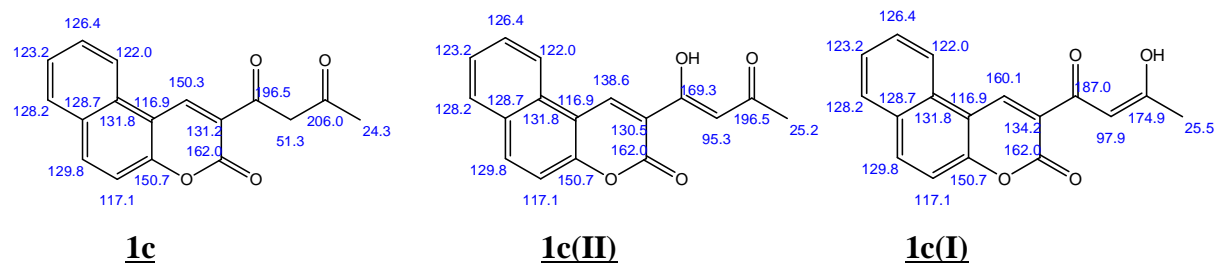
**Estimation théorique RMN ^{13}C [69]**

Tableau I-6: Résultats du spectre RMN ^{13}C à 75 MHz du composé **1c**.

δ Théorique (ppm)	δ expérimentale (ppm)	Attribution
25,2	27,37	CH ₃ (14)
51,30	57,00	CH ₂ (12, diones)
95,30-97,90	101,38	CH (12, énoI)
116,90	112,90	CH(10)
117,10	116,36	CH (8)
122,00	118,82	CH (18)
123,20	121,61	C (16)
126,40	126,51	C (17)
128,20	128,98	C (15)
128,70	129,08	C (6)
129,80	129,30	C(7)
130,50	130,14	C (3)
131,80	135,66	C (5)
138,60	140,77	C (4)
150,70	154,79	C (9)
162,00	158,02	C (2)
169,30	172,50	C (11)
196,50	199,31	C (13, énoI)
206,00	199,80	C (13, diones)

II-3-5- Etude par spectroscopie UV/visible

Le spectre d'absorption U.V/Visible mesuré dans l'acétoacétate d'éthyle 4×10^{-5} M montre deux bandes distinctes : 268 nm (C=O, transition n- π^*) et 401 nm (OH de l'énoI, transition π - π^*).

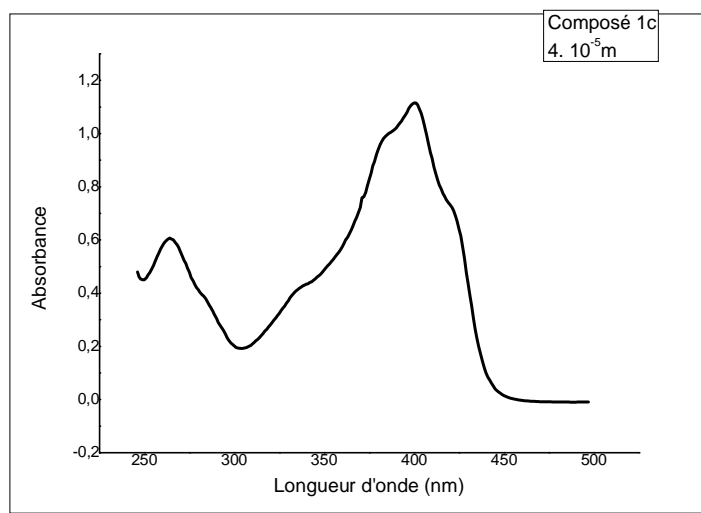


Figure I.24 : Spectre d'absorption UV/vis du composé **1c** dans l'acétate d'éthyle à 4×10^{-5} M

II-3-6- Etude par spectroscopie Infra Rouge

Les principales bandes obtenues dans du KBr en pastilles se répartissent comme suit :
 ν (cm^{-1}) : 3470 (OH, éno) – 2250 (C=O acétoacétyle)-1750 (C=O position 2).

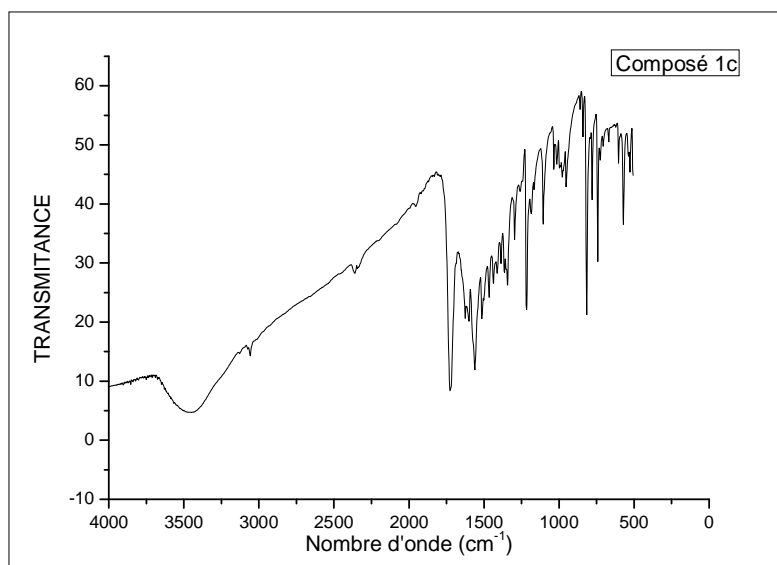


Figure I.25: Spectre I.R. du composé **1c** dans le KBr

II-4- Synthèse de la 3-acétoacétyl-8-hydroxycoumarine (1d)

L'action du 2,3- dihydroxybenzaldéhyde sur la 4-hydroxy-6-méthyl-2-pyrone (ou triacétique lactone TAL) au reflux du toluène et en présence de la triéthylamine, conduit à la

formation du 1-(8-hydroxy-2-oxo-2*H*-chromèn-3-yl) butane-1,3-dione (ou 3-acétoacétyl-8-hydroxycoumarine) **1d**.

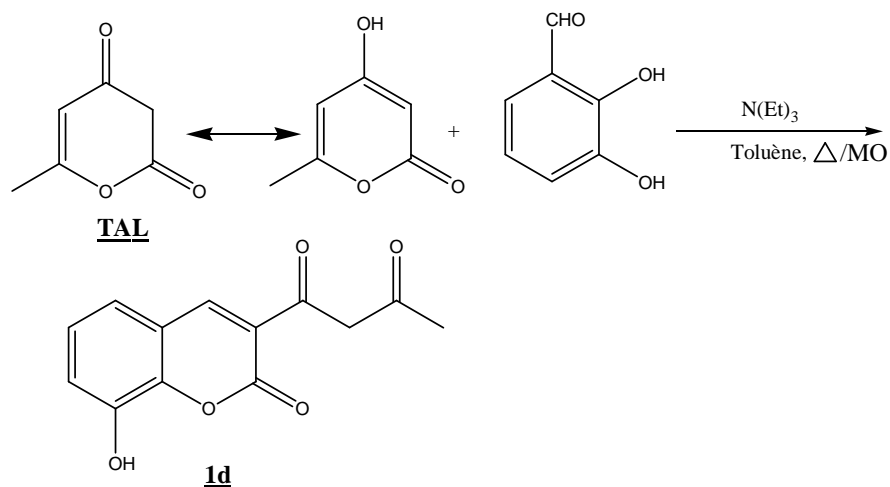


Schéma I.17: Synthèse de 1-(8-hydroxy-2-oxo-2*H*-chromèn-3-yl) butane-1,3-dione **1d**

La structure a été confirmée par les différentes techniques d'analyses suivantes.

II-4-1- Etude par chromatographie sur couche mince

L'étude en chromatographie sur couche mince (CCM) a été réalisée dans un éluant constitué d'un mélange de solvants chloroforme-méthanol (2ml/7 gouttes). Nous avons obtenus une seule tache différente de celle du produit de départ. **Rf=0,58**

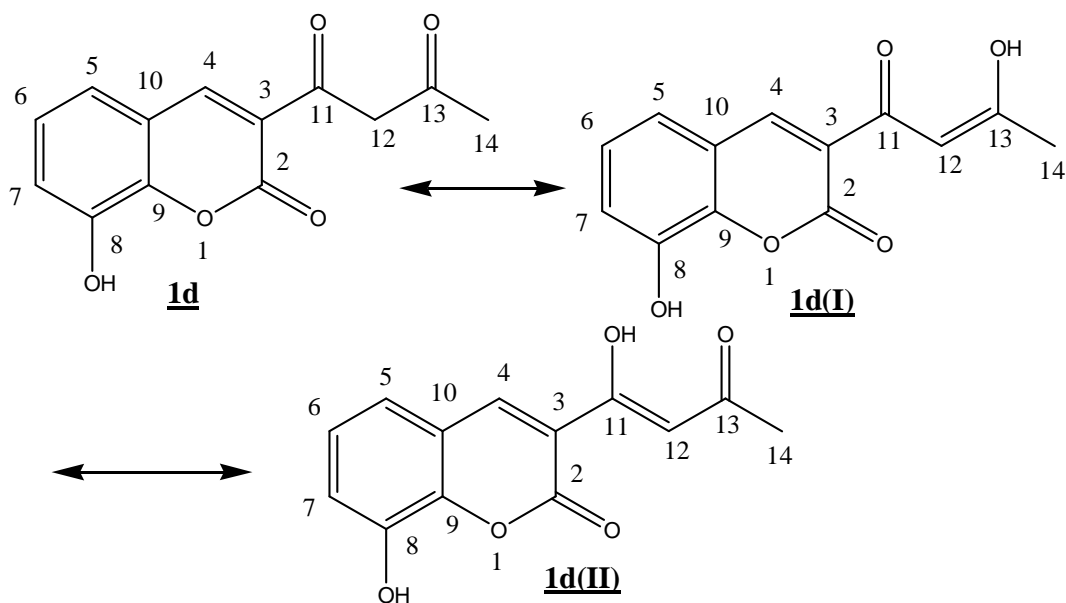
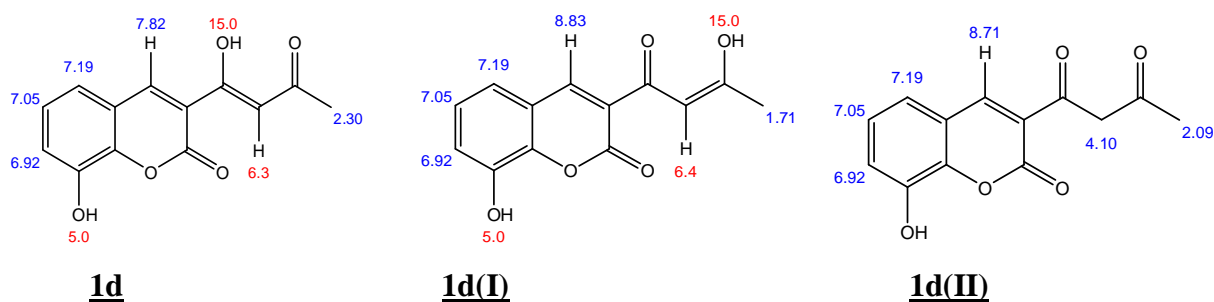
II-4-2- Etude par spectrométrie de masse ESI(+)

Le spectre de masse réalisé par la LC-MS en mode ESI(+), montre deux ions moléculaires, un pic à $m/z = 269$ (100%) correspondant à $(M+Na)^+$ et un autre pic à $m/z=247$ (10%) correspond à $(M+H)^+$, confirmant la formule brute $C_{13}H_{10}O_5$ du composé **1d**.

II-4-3- Etude en spectroscopie RMN du proton 1H

Dans les spectres RMN du 1H réalisés, on observe les pics caractéristiques du groupement acétoacétyle à $\delta = 2,22$ ppm (s, CH_3 (14)), à $\delta = 4,16$ ppm (s, CH_2 , dione), à $\delta = 6,89$ ppm (s, CH éno) et un pic large à $\delta = 16,02$ ppm (OH, éno).

Ils apparaissent aussi d'autres signaux à $\delta = 7,18$ ppm (d, 1H), à $\delta = 7,20$ ppm (t, 1H) et à $\delta = 7,34$ ppm (d, 1H) ce sont les protons du noyau aromatique avec la présence d'un pic large à $\delta = 10,40$ ppm correspondant au groupement OH du noyau aromatique. Nous observons aussi un singulet à $\delta = 8,72$ ppm qui est attribuable au proton H (4) du noyau chromène.

Schéma I.17 : Formes tautomères du composé **1d**Estimation théorique RMN ^1H [69]

Dans le tableau I-7 ci-dessous sont reportés les résultats du spectre RMN du proton.

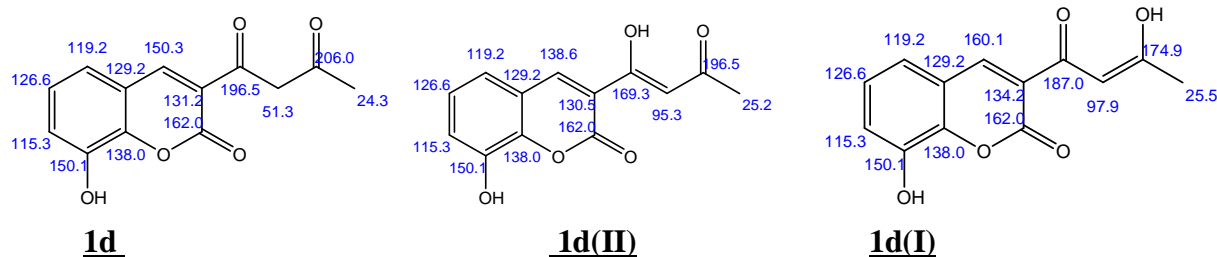
Tableau I-7: RMN ^1H à 300 MHz du composé **1d**

δ théorique (ppm)	δ expérimental (ppm)	Multiplicité	Attribution
2,09	2,22	s (3H)	CH_3 (14)
4,10	4,16	s (2H)	CH_2 (12, diones)
6,30-6,40	6,89	s (1H)	CH (12, énol)
6,92	7,18	d (1H)	CH(7)
7,05	7,20	t (1H)	CH(6)
7,19	7,34	d (1H)	CH (5)
8, 83	8,72	s (1H)	H (4)
5,00	10,40	S (1H)	OH (8)
15,00	16,02	Large	OH (céto-énolique)

II-4-4- Etude par spectroscopie RMN ^{13}C

Dans le spectre RMN ^{13}C réalisé, nous remarquons que tous les pics qui apparaissent sont compatibles avec le type des carbones du composé **1d**.

Les résultats du spectre RMN ^{13}C sont reportés dans le tableau I-8 ci-dessous et sont comparés au spectre obtenue par l'estimation théorique.

Estimation théorique RMN ^{13}C [69]Tableau I-8: Résultats du spectre RMN ^{13}C à 75 MHz du composé **1d**

δ Théorique (ppm)	δ expérimentale (ppm)	Attribution
24 ,3	27,03	CH ₃ (14, diones)
25,5	30,42	CH ₃ (14, céto-énolique)
51,30	56,49	CH ₂ (12, diones)
95,3-97,9	100,96	CH (12, émol)
119,20	119,22	C (7)
126,60	120,23	C (5)
129,20	124,93	C (6)
131,20	142,61	CH (3)
138,00	144,38	C (9)
150,10	146,51	C (8)
150,30	157,29	C(4)
162,00	173,05	C(2)
174,90	191,83	C (13, émol)
196,50	199,02	C (11)
206,60	203,35	C (13, diones)

II-4-5- Etude par spectroscopie UV/visible

Le spectre d'absorption est réalisé juste après dissolution dans l'acétate d'éthyle à 10^{-4} M, ce dernier montre une seule bande $\lambda_{\text{abs}} = 354$ nm (OH, éno) (Figure I.26)

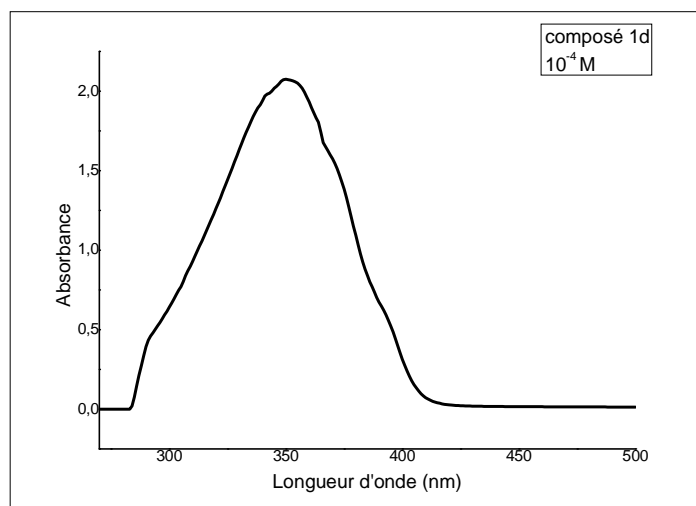
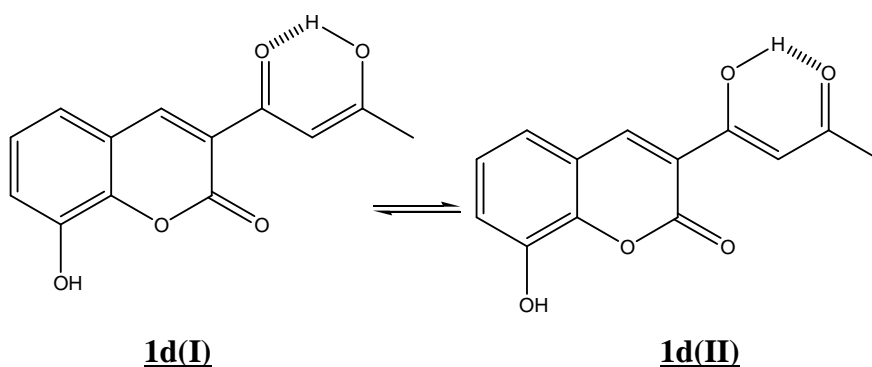


Figure I.26: Spectre d'absorption UV/vis du composé **1d** dans l'acétate d'éthyle à 10^{-4} M

II-4-6- Etude par spectroscopie Infra Rouge

Les principales bandes obtenues dans du KBr en pastilles se répartissent comme suit :
 ν (cm^{-1}): 3475 – 3198- 2260- 1750 - 1381- 1048- 754

La bande fine distincte 1750 cm^{-1} suggère la présence de la liaison C=O (2) de la coumarine et la bande à 2260 cm^{-1} confirme la présence d'un carbonyle extra cyclique (C=O du groupement acétoacétyle). Quant aux bandes, large à 3475 cm^{-1} et fine à 3198 cm^{-1} elles correspondent à la liaison C-OH (éno) associée par une liaison à hydrogène et -OH de la coumarine respectivement.



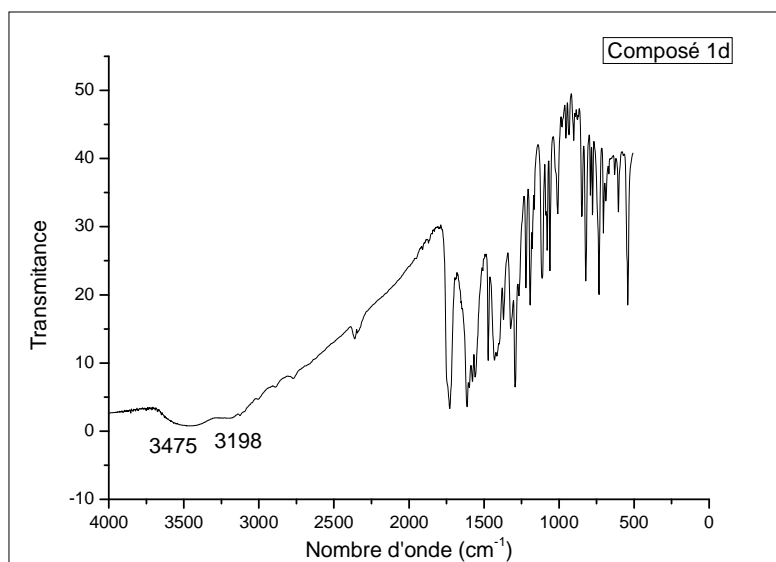
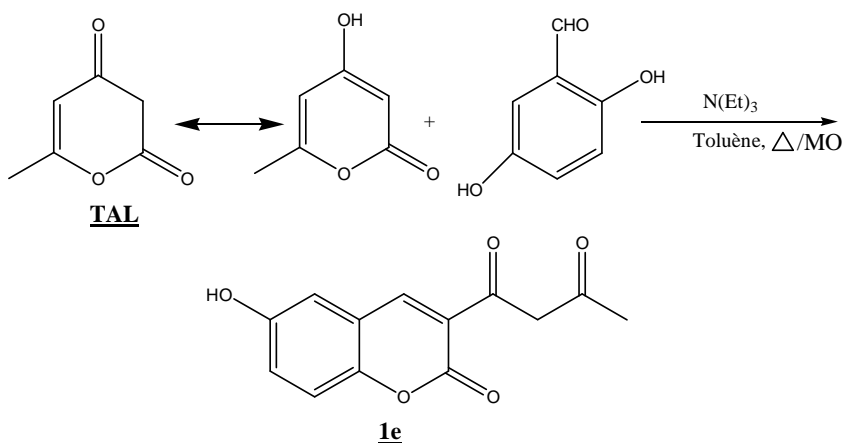


Figure I.27: Spectre I.R du composé **1d** dans KBr

II-5 Synthèse de la 6-hydroxy-3-acétoacétylcoumarine (**1e**)

L'action du 2,5-dihydroxybenzaldéhyde sur la TAL par les deux modes de chauffage conventionnel et sous irradiation micro-onde a conduit à la formation du composé 1-(6-hydroxy-2-oxo-2*H*-chromèn-3-yl) butane-1,3-dione (ou 3-acétoacétyl-6-hydroxycoumarine)

1e.



II-5-1- Etude par chromatographie sur couche mince

L'étude en chromatographie sur couche mince (CCM) a été réalisée dans un éluant constitué d'un mélange de solvants chloroforme-méthanol (2ml/7 gouttes). Nous avons obtenus une seule tache différente de celle du produit de départ.

II-5-2- Etude par spectroscopie UV/visible

Le spectre d'absorption du composé **1e** réalisé juste après dissolution dans le chloroforme révèle une seule bande à 342 nm (OH de l'énol, transition $\pi-\pi^*$) (Figure I.28). Ce déplacement dans la longueur d'ondes est dû d'une part à la présence et à la position du groupement -OH sur la coumarine et d'autre part au changement de la polarité du solvant.

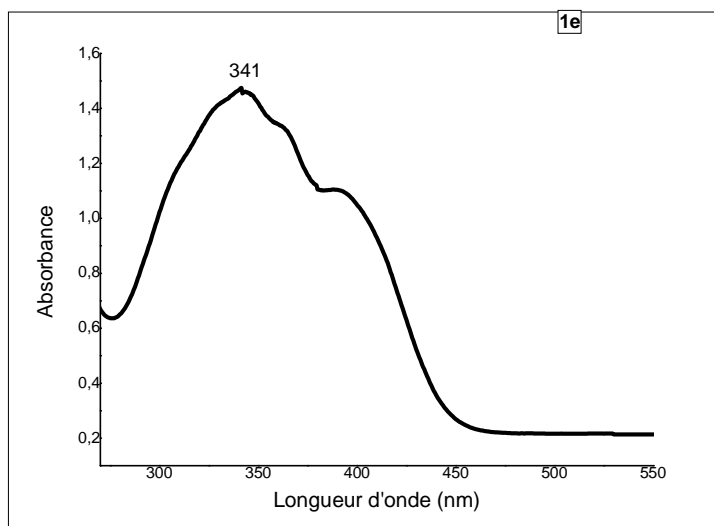


Figure I.28 : Spectre d'absorption UV/vis du composé **1e** dans le chloroforme à 10^{-4} M

II-5-3- Etude par spectroscopie Infra Rouge

Les principales bandes obtenues sans KBr réalisé dans un appareil de marque Tensor 27 burker se répartissent comme suit :

ν (cm^{-1}): 3205 – 3050- 2737-1723 - 1300- 818

La bande fine distincte 1723 cm^{-1} suggère la présence de la liaison C=O de la coumarine et les deux bandes à 3050 cm^{-1} et à 3205 cm^{-1} correspondent à la liaison -OH de la coumarine, et le C-OH (énol) respectivement.

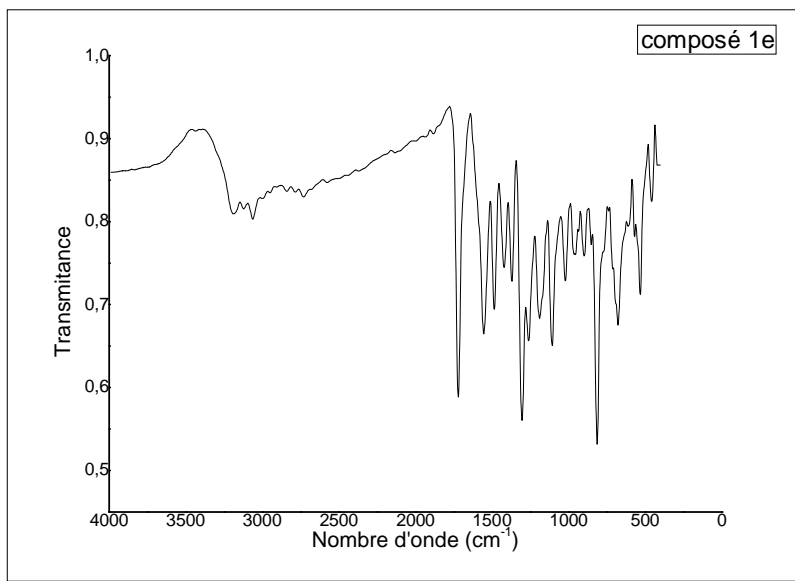


Figure I.29: Spectre I.R du composé **1e** sans KBr

III- Mécanisme de la réaction de Knoevenagel

Les condensations d'un composé portant un groupe méthylène actif, autre qu'un aldéhyde ou une cétone, avec un composé carbonylé sont appelées condensation de Knoevenagel [67].

A la différence des réactions de Wittig ou de Heck, qui conduisent à des enchaînements similaires, la réaction de Knoevenagel est une condensation purement thermique. Elle présente l'avantage d'être moins contraignante que les couplages organométalliques et ne produit que de l'eau comme produit secondaire.

Les groupes méthylènes actifs étant plus acides que les aldéhydes ou les cétones, les bases utilisées comme catalyseur sont plus faibles que celles nécessaires pour effectuer une aldolisation. La pipéridine, la diéthylamine et la triéthylamine sont parmi les catalyseurs les plus utilisés.

D'après la littérature, la condensation de Knoevenagel, dont le mécanisme réactionnel est présenté ci dessous, est plus couramment conduite en catalyse basique :

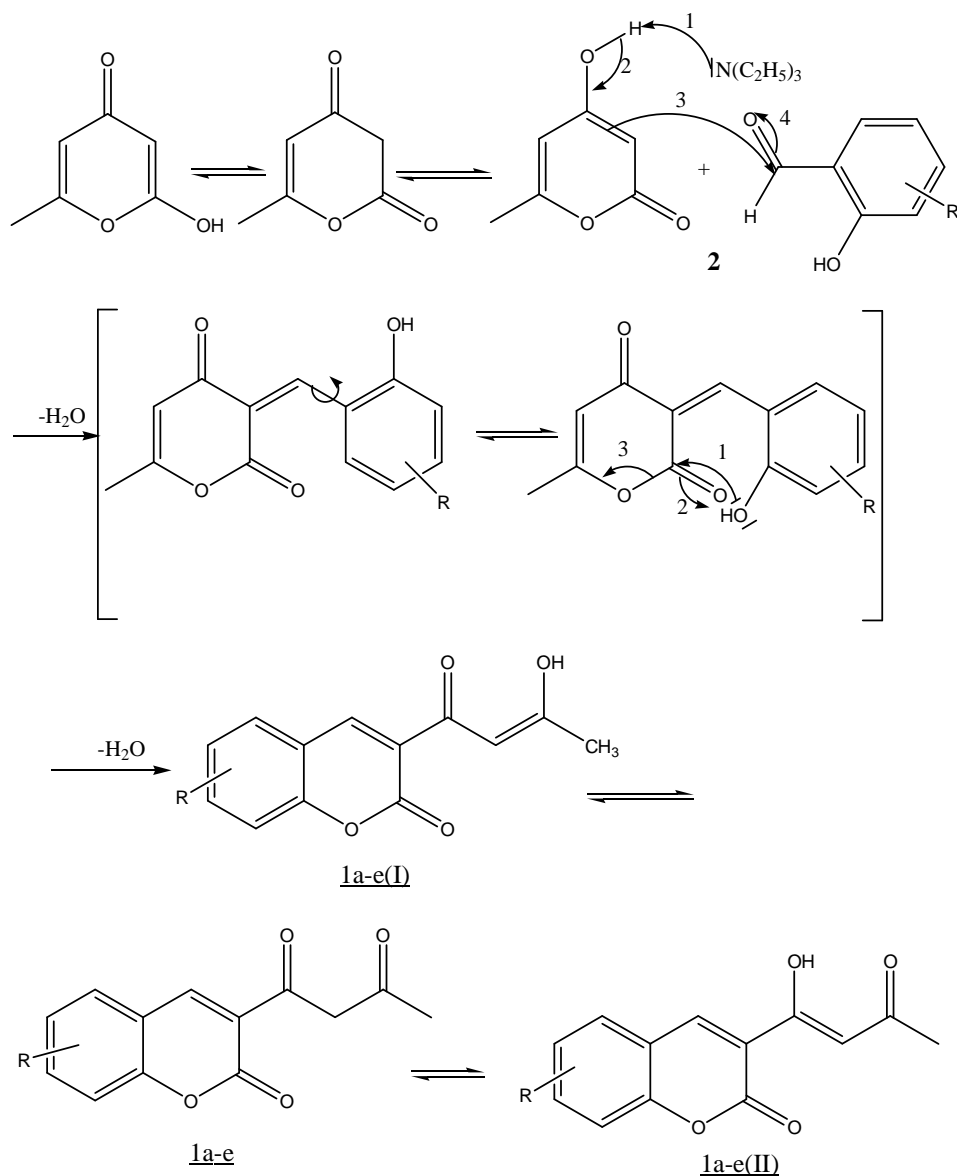


Schéma I.18: Mécanisme de synthèse des 3-acétoacétyl-coumarines **1a-e**

IV- Synthèse de molécules hybrides coumarin-3,4- dihydropyrimidin-2(H)-ones/thiones

Suite à nos études sur la recherche de nouvelles voies de synthèse de composés hétérocycliques biologiquement actifs, nous avons développé une synthèse en un pot efficace des 4-aryl-6-méthyl-5-(2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones / thiones (**4a-e**, **5a-d**, **6a-d**, **7** et **8**) [70]. Après plusieurs essais, nous avons constaté que ces nouveaux composés pourraient être obtenus par une réaction à plusieurs composants en une seule étape en utilisant la 3-acétoacétylcoumarines **1a-e**, benzaldéhyde et ses dérivés

substitués en para **2** et l'urée / thio-urée **3**, en présence d'acide sulfurique et au reflux de l'acétonitrile (schéma II. 19 et tableau I.9).

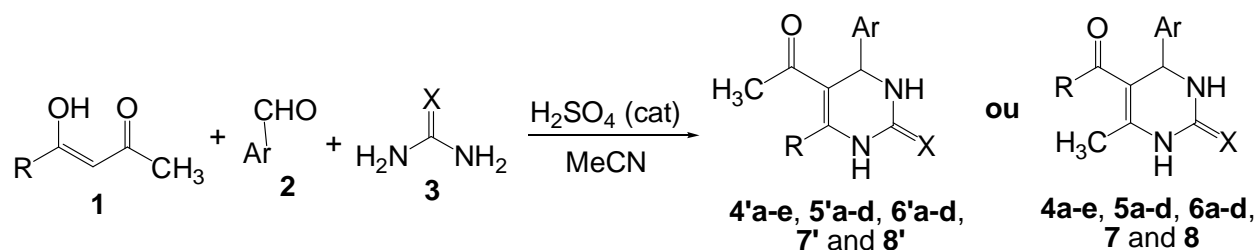


Schéma II.19 : Synthèse de 4-aryl-6-méthyl-5-(2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones / thiones (**4a-e, 5a-d, 6a-d, 7 et 8**)

Tableau I.9: Synthèse des 4-aryl-6-méthyl-5-(2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones/thiones **4a-e, 5a-d, 6a-d, 7 et 8**

Entrée	Produit	R	Ar	X	Rdt (%)	Pf °C
1	4a		C_6H_5	O	72	130-133
2	4b		4- $NO_2C_6H_5$	O	50	260
3	4c		4- ClC_6H_5	O	42	134
4	4d		C_6H_5	S	56	140-145
5	4e		4- ClC_6H_5	S	52	180-185
6	5a		C_6H_5	O	82	240
7	5b		4- $NO_2C_6H_5$	O	42	235
8	5c		4- ClC_6H_5	O	50	135
9	5d		C_6H_5	S	60	168-170
10	6a		C_6H_5	O	83	206
11	6b		4- $NO_2C_6H_5$	O	70	225
12	6c		4- ClC_6H_5	O	42	180-186
13	6d		4- ClC_6H_5	S	70	160
14	7		C_6H_5	O	94	225
15	8		C_6H_5	O	65	203

a) Mécanisme de la réaction

Le mécanisme de la réaction de Biginelli ainsi que la structure des synthons utilisés suggèrent la formation de deux dihydropyrimidinones / thiones possible (composés de type **4a-e**, **5a-d**, **6a-d**, **7**, **8** ou **4'a-e**, **5'a-d**, **6'a-d**, **7'**, **8'**) (schéma I.19, tableau I.9). Ce processus commence par la formation d'une imine, par condensation du benzaldéhyde avec l'urée / thio-urée, qui réagit ensuite avec le 1,3-dicarbonylé après protonation de l'azote de l'imine. Dans la dernière étape du mécanisme il y a deux sites de cyclisation possibles, qui peuvent mener après déshydratation à la DHPM(T)s **4a-e**, **5a-d**, **6a-d**, **7**, **8** ou **4'a-e**, **5'a-d**, **6'a-d**, **7'**, **8'** (schéma I.20).

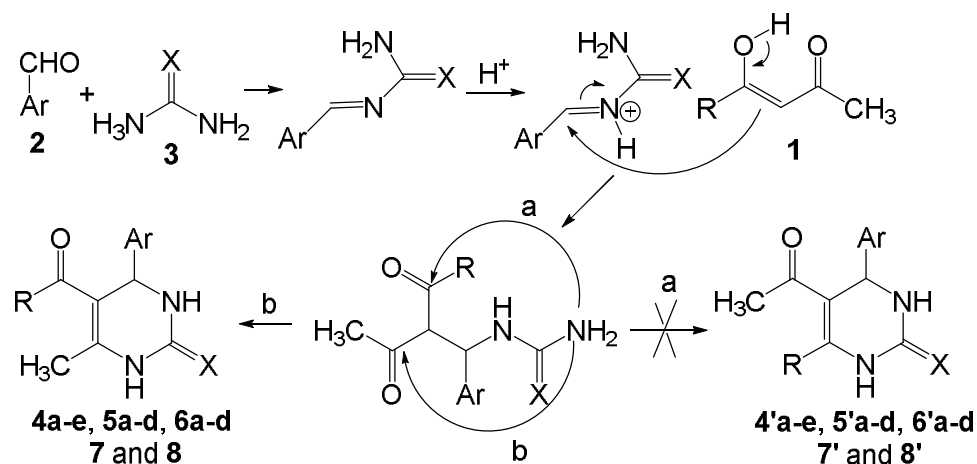
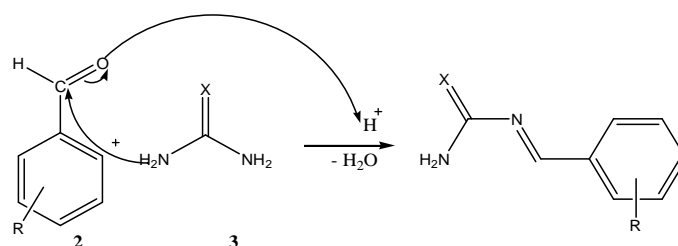
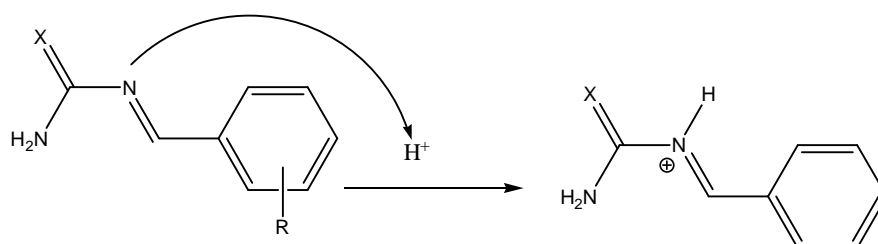
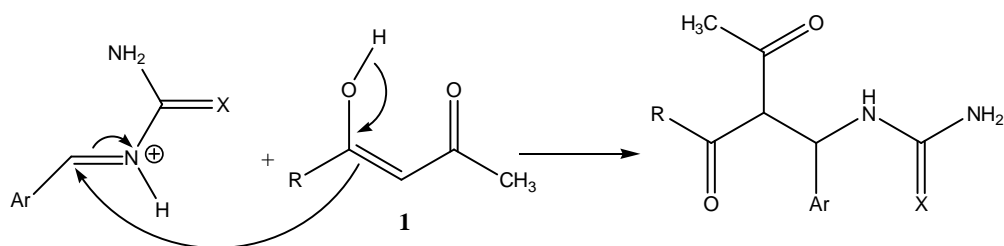


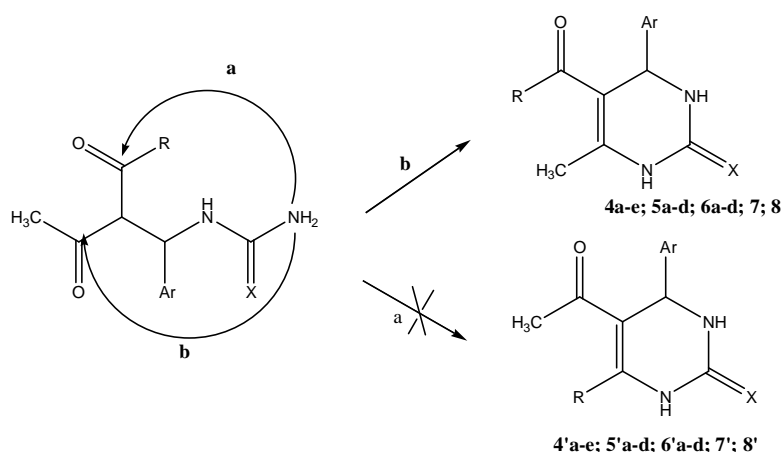
Schéma I.20 : Mécanisme de formation des dihydropyrimidinones/thiones

1^{ère} étape : formation d'une imine2^{ème} étape : protonation de l'imine

3^{ème} étape : action du dérivé 1,3-dicarbonylé sur l'imine après protonation de l'azote



4^{ème} étape : cyclisation et formation de la coumarin-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one



La structure de l'ensemble des composés synthétisés a été établie par la spectroscopie RMN 2D (HSQC, HMBC et NOESY), l'analyse élémentaire et la spectrométrie de masse.

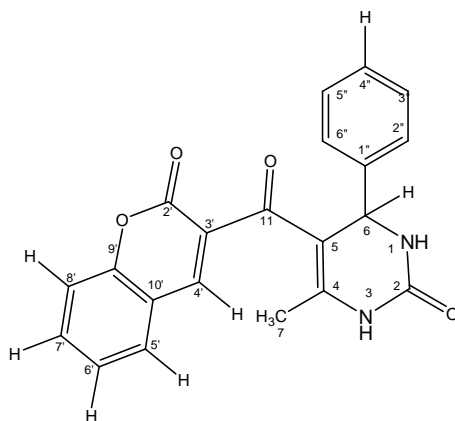
Ce travail a fait l'objet d'une publication internationale dans le journal Tetrahedron [70].

IV-1-Synthèse des composés 4-aryl-6-méthyl-5-(2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (4a-e)

IV-1-1-Composé 6-méthyl-5-(2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-4-phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (4a)

Ce composé a été obtenu par réaction de la 3-acétoacétylecoumarine **1a**, le benzaldéhyde **2** et l'urée **3** dans l'acétonitrile en présence de quelques gouttes d'acide sulfurique (H₂SO₄) concentrée, le mélange est porté au reflux et suivie par CCM pendant une durée de 18 heures.

La pureté du produit a été confirmée par la CCM en utilisant comme éluant un mélange de méthanol-chloroforme (1/5 v/v). Une étude spectroscopique détaillée a été réalisée.



6-méthyl-5-(2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-4-phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (**4a**)

A- Etude par spectrométrie de masse (MS-ESI(+))

Le spectre de masse réalisé par la LC-MS en mode ESI(+), montre deux ions moléculaires, un pic à $m/z = 361$ (85%) correspondant à $(M+H)^+$, et un autre pic à $m/z=383$ (100%) correspond à $(M+Na)^+$ confirmant ainsi la formule brute $C_{21}H_{16}O_4N_2$ du composé **4a**.

B-Etude par spectroscopie RMN du 1H

Les spectres RMN du 1H sont réalisés dans un appareil Spectromètre Bruker Avance 300, Proton: 300.13 MHz, en utilisant le DMSO comme solvant et le TMS comme référence interne. Les valeurs des déplacements chimiques sont exprimées en ppm par rapport au signal du tétraméthylsilane (TMS).

L'absence des pics caractéristiques du groupement acétoacétyle et précisément le OH énolique, le =CH cétoénolique et le CH_2 de la dicétone confirme que ce dernier a réagit. De même l'apparition d'un pic à $\delta=5,26$ ppm caractéristique de H(6) d'une dihydropyrimidinone confirme la formation de ce noyau. Il apparait dans les champs forts un pic à $\delta=2,09$ ppm (s, 3H) qui ne peut être attribuable qu'aux trois hydrogènes identiques de $-CH_3$ (12).

Le proton H4' de la coumarine est conservé et apparait à 7,97ppm(s, 1H). Les protons du noyau aromatique lié à la DHPM apparaissent entre 7,22 et 7,51 ppm comme multiplet (5H ; H2 ",3",4",5",6"), et les protons du noyau benzopyranone (4H ; H5', 6', 7', 8') apparaissent comme multiplet à 7,58 -7,94 ppm.

Dans les champs faibles apparaissent deux signaux à 8,01ppm (d ,1H) attribué à NH-1 et à 9,54ppm (s, 1H) attribué à NH-3 de la dihydropyrimidinone. L'ensemble des résultats sont regroupés dans le tableau I.10

Tableau I.10: Résultats de la spectroscopie RMN ^1H du composé **4a**

δ (ppm)	Multiplicité	Attribution
2,09	s, 3H	CH ₃ (7)
5,26	d, 1H J=3,4Hz	H6
7,19-7,32	M	H2'',3'',4'',5'',6''
7,58-7,94	M	H5',6',7',8'
7,97	s, 1H	H4'
8,01	d, 1H J=3,4Hz	NH-1
9,54	s, 1H	NH-3

C- Etude par spectroscopie RMN du ^{13}C

Le spectre RMN du ^{13}C est réalisé dans un appareil Spectromètre Bruker Avance 300, Carbone: 75,47 MHz, en utilisant le DMSO comme solvant et le TMS comme référence interne. Les valeurs des déplacements chimiques sont exprimées en ppm par rapport au signal du tétraméthylsilane (TMS).

Le nombre de signaux qui apparaissent sur le spectre RMN du Carbone-13 est compatible avec le nombre de carbone que contient la molécule.

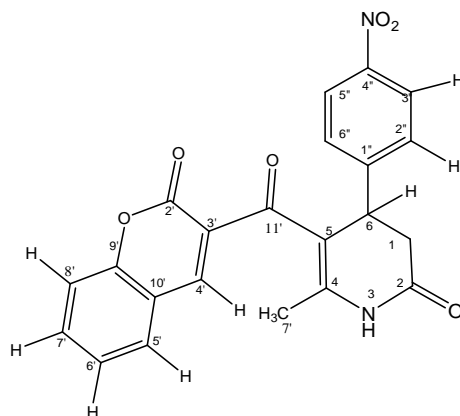
Sur le spectre RMN du Carbone-13 apparaît un pic caractéristique d'un carbonyle (C=O) en position C₁₁' à $\delta = 187,0$ ppm différent de celui de l'acétoacétylcoumarine qui apparaît aux environs de 200 ppm. À $\delta = 53,8$ ppm apparaît un pic caractéristique d'un groupement méthylène en C₆ ainsi nous observons un pic à $\delta = 18,6$ ppm correspondant à CH₃ (C7). Le tableau I.11 résume les résultats obtenus.

Tableau I.11 : Résultats du spectre RMN du ^{13}C du composé **4a**

C _n	δ (ppm) du ^{13}C	C _n	δ (ppm) du ^{13}C
CH ₃ (C7)	18,6	C ₇ '	127,3
C ₆	53,8	C ₃ '',5''	128,4
C ₅	109,4	C ₃ '	134,5
C ₈ '	116,1	C ₁ ''	143,8
C ₁₀	118,3	C ₄ '	146,1
C ₆ '	119,8	C ₉	151,7
C ₅ '	124,9	C ₂	153,3
C ₄ '	125,1	C ₄	157,8
C ₂ '',6''	126,3	C ₂ '	173,0
		C ₁₁	187,0

IV-1-2- Composé 6-méthyl-4-(4-nitrophényl)-5-(2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (4b)

En travaillant dans les mêmes conditions opératoires que celles décrites précédemment et en utilisant le 4-nitrobenzaldéhyde, le composé 6-méthyl-4-(4-nitrophényl)-5-(2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one **4b** a été isolé après une purification par recristallisation dans un solvant approprié.



6-méthyl -4-(4-nitrophényl)-5-(2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one 4b

A- Etude par spectrométrie de masse (MS-ESI(+))

Le spectre de masse ESI+, montre deux ions moléculaires, à $m/z=428$ (100%) et un autre à $m/z=406$ (23%) correspondant à $(M+Na)^+$ et à $(M+H)^+$ respectivement, ce qui nous amène à confirmer la structure du composé **4b**, dont la formule brute est $C_{21}H_{15}N_3O_6$.

B- Etude par spectroscopie RMN du 1H

Dans le spectre RMN du 1H réalisé, on observe les pics caractéristiques des protons identiques du groupement méthyle à $\delta=2,08\text{ppm}$ (s, $CH_3(7)$), et celui de H en position (6) à $\delta=5,42\text{ppm}$ (d, CH, H6). Les pics du groupement acétoacétyle à savoir celui de -OH énolique, =CH cétoénolique et -CH₂ de la dicétone sont absents ce qui confirme que ce groupement a réagi pour donner la DHPM.

Le noyau coumarinique est conservé par l'apparition du pic de H4'(S) à $\delta=8,16$ ppm. Ils apparaissent aussi d'autres signaux à $\delta=7,77\text{ppm}$ (d, 2H), à $\delta=8,22\text{ppm}$ (d, 2H) correspondant aux protons du noyau aromatique, et de deux pic à 8,10 et 9,69 ppm caractéristiques du -NH(1) et -NH(3). Dans le tableau I.12 sont représentés l'ensemble des résultats du spectre RMN du proton enregistrés.

Tableau I.12 : résultats du spectre RMN du proton du composé **4b**

δ (ppm)	Multiplicité	Attribution
2,08	s, 3H	CH ₃ (7)
5,42	d, 1H J=3,4Hz	H6
7,36	t, 1H J=8,9Hz	H6'
7,43	d, 1H J=8,9Hz	H8'
7,54	d, 1H J=8,9Hz	H5'
7,68	t, 1H J=8,9Hz	H7'
7,77	d, 2H J=8,6Hz	H2'',6''
8,10	d, 1H J=3,4Hz	NH-1
8,16	s, 1H	H4'
8,22	d, 2H J=8,6Hz	H3'',5''
8,69	s, 1H	NH-3

C- Etude par spectroscopie RMN du ¹³C

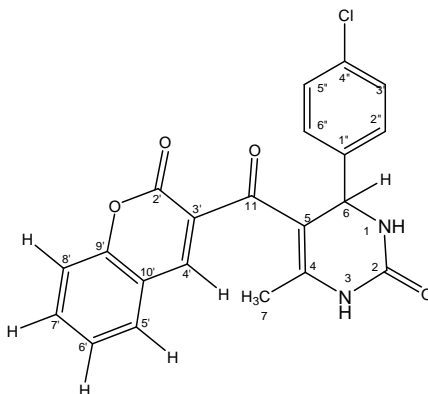
Le spectre RMN du ¹³C montre un pic caractéristique du CH₃ et un autre pic caractéristique du CH (C6). Dans les champs faibles Le carbone la fonction cétone en C11' apparaît à 187,5ppm confirmant la structure **4b**. Dans le tableau I.13 suivant nous reportons les résultats du spectre RMN du carbone-13 enregistrés.

Tableau I.13 : Résultats RMN du ¹³C enregistrés pour le composé **4b**

C _n	δ (ppm) du ¹³ C	C _n	δ (ppm) du ¹³ C
C ₇	18,7	C _{7'}	129,6
C ₆	53,9	C _{3'}	133,1
C ₅	109,2	C _{4''}	144,9
C _{3'',5''}	116,1	C _{4'}	145,6
C _{8'}	118,1	C _{1''}	146,7
C _{10'}	123,4	C _{9'}	150,9
C _{6'}	124,8	C ₂	153,4
C _{5'}	127,6	C ₄	157,5
C _{2'',6''}	128,0	C _{2'}	173,1
		C _{11'}	187,5

IV-1-3- Composé 4-(4-chlorophényl)-6-méthyl-5-(2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (4c)

Par la même méthode de synthèse que celle citée précédemment, nous avons isolé un seul produit qui est le 4-(4-chlorophényl)-6-méthyl-5-(2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one **4c** en utilisant le 4-chlorobenzaldéhyde.



4-(4-chlorophényl)-6-méthyl-5-(2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one **4c**

A- Etude par spectrométrie de masse (MS-ESI(+))

Le spectre de masse réalisé par la LC-MS en mode ESI(+) montre deux pics isotopiques du chlore à $m/z=395(35, (M+H)^+, ^{35}\text{Cl})$ et un autre à $m/z=397(10, (M+H)^+, ^{37}\text{Cl})$. Ils apparaissent aussi deux autres à $m/z=417(100, (M+Na)^+, ^{35}\text{Cl})$ et à $m/z=419(38, (M+Na)^+, ^{37}\text{Cl})$, ce qui confirme la présence d'un chlore dans la structure de la molécule de formule brute $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_4$.

B- Etude par spectroscopie RMN du ^1H

Comme dans le cas des produits **4a** et **4b**, nous observons que les pics du groupement acétoacétyl sont absents avec apparition des pics caractéristiques de la DHPM, dans le domaine des champs forts, à $\delta=2,08\text{ppm}$ (s, 3H) attribuable aux trois protons identiques de $\text{CH}_3(7)$, un autre à $\delta=5,27\text{ppm}$ (d, 1H) correspondant au proton éthylénique H(6). Dans le domaine des champs faibles. Nous observons aussi les pics de la DHPM à $\delta=8,84\text{ppm}$ (d, 1H, NH-1) et un autre à $\delta=9,59\text{ppm}$ (s, 1H, NH-3).

Les pics du noyau coumarinique sont tous conservés et les pics du noyau aromatique apparaissent comme doublets à $\delta=7,26\text{ppm}$ (d, 2H, H3'', 5'') et à $\delta=7,75\text{ppm}$ (d, 2H, H 2'', 6''). L'ensemble de ces résultats reportés dans le tableau I.14 confirme la formation du composé hybride **4c**.

Tableau I.14 : Résultats du spectre RMN du proton enregistrés pour le composé **4c**

δ (ppm)	Multiplicité	Attribution
2,08	s, 3H	CH ₃ (7)
5,27	d, 1H J=3,3Hz	H6
7,26	d, 2H J=8,7Hz	H3'',5''
7,38	d, 1H J=8,9Hz	H8'
7,40	t, 1H J=8,9Hz	H6'
7,68	t, 1H J=8,9Hz	H7'
7,75	d, 1H J=8,7Hz	H2'',6''
7,96	d, 1H J=8,9Hz	H5'
8,06	s, 1H	H4'
8,84	d, 1H J=3,3Hz	NH-1
9,59	s, 1H	NH-3

C- Etude par spectroscopie RMN du ¹³C

Sur le spectre RMN du carbone-13 apparait le pic caractéristique de la cétone en position 11' à $\delta=186,9$ ppm différent de celui de l'acétoacétylcoumarine. À $\delta=53,2$ ppm, apparait un pic caractéristique du groupement méthylène en C6. Nous observons aussi un pic à $\delta=18,06$ ppm correspondant à CH₃, confirmant ainsi la structure de **4c**.

l'ensemble des résultats de RMN du carbone -13 enregistrés pour le composé **4c** sont présenté dans le tableau I.15.

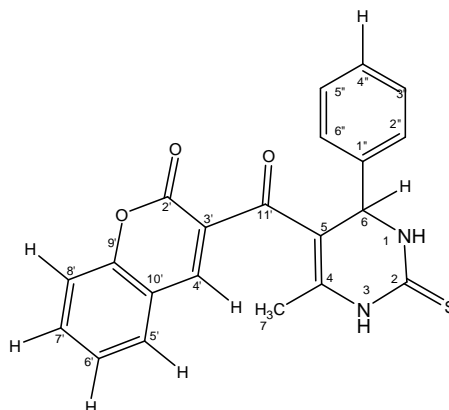
Tableau I.15 : résultats de RMN du carbone -13 du composé **4c**

C _n	δ (ppm) du ¹³ C	C _n	δ (ppm)du ¹³ C
C ₇	18,6	C _{3'',5''}	128,6
C ₆	53,1	C _{4''}	129,0
C ₅	102,0	C _{3'}	134,5
C _{8'}	109,2	C _{1''}	142,4
C _{10'}	116,3	C _{4'}	142,9
C _{6'}	118,3	C _{9'}	146,1
C _{5'}	124,9	C ₂	151,6
C _{2'',6''}	128,3	C ₄	153,5
C _{7'}	128,3	C _{2'}	157,8
		C _{11'}	186,9

IV-1 -4- Composé 6-méthyl-5-(2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-4-phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-thione (4d)

Dans les mêmes conditions opératoires que celle citées précédemment, nous avons isolé un seul produit qui est le 6-méthyl-5-(2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)- 4-phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(*H*)-thione, **4d** en utilisant la thio-urée et le benzaldéhyde.

Les analyses en spectrométrie de masse, RMN du proton et du carbone-13 confirment la formation du produit **4d**.



6-méthyl-5-(2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-4-phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(*H*)-thione(**4d**)

A- Etude par spectrométrie de masse(MS-ESI(+))

Le spectre de masse réalisé par la LC-MS en mode ESI(+) montre deux pic à $m/z=416$ (100) correspond à $(M+K)^+$ et un autre à $m/z=377(25)$ pour le $(M+H)^+$, ce qui est en accord avec la formule brute $C_{21}H_{16}O_3N_2S$.

B- Etude par spectroscopie RMN du 1H

L'apparition dans les champs forts du pic à $\delta=5,26\text{ppm}$ (d, 1H) attribuable à H (6) et à $\delta=2,09\text{ppm}$ (S, 3H) attribuable à CH_3 et la disparition des pics caractéristiques du groupement acétoacétyle confirme que ce dernier a réagi et donne la formation de la DHPM.

Dans les champs faibles on observe l'apparition des pics à $\delta=8,62\text{ppm}$ et $10,02\text{ppm}$ attribuable à NH-1 (d, 1H) et NH-3 (s, 1H) de la dihydropyrimidinthione.

Le pic du $H_{4'}$ (s, 1H) de la coumarine est conservé et apparaît à $\delta=8,35\text{ppm}$. Les protons du noyau aromatique apparaissent à $\delta=6,75-7,17\text{ppm}$ comme multiplet (m, 5H, $H_{2''}$, $3''$, $4''$, $5''$, $6''$) et les protons du noyau benzopyranone apparaissent à $\delta=7,21-7,83\text{ppm}$ (m, 4H, $H_{5'}$, $6'$, $7'$, $8'$). Dans le tableau I.16 nous représentons les résultats enregistrés.

Tableau I.16 : Résultats du spectre RMN ^1H du composé **4d**

$\delta(\text{ppm})$	Multiplicité	Attribution
2,09	s, 3H	$\text{CH}_3(7)$
5,26	d, 1H $J=3,5\text{Hz}$	H6
6,75-7,17	M	$\text{H}2'', 3'', 4'', 5'', 6''$
7,21-7,83	M	$\text{H}5', 6', 7', 8'$
8,35	s, 1H	$\text{H}4'$
8,62	d, 1H $J=3,5\text{Hz}$	NH-1
10,02	s, 1H	NH-3

C- Etude par spectroscopie RMN du ^{13}C

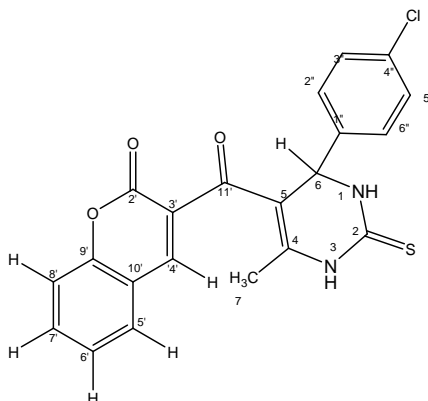
Sur le spectre RMN du ^{13}C du composé **4d** apparaît le pic du carbone de la fonction cétone en $\text{C}11'$ à $\delta = 191,3\text{ppm}$ différent de celui de la coumarine, et à $\delta = 51,9\text{ppm}$ apparaît le pic du groupement méthylène en $\text{C}6$ ainsi que le pic de CH_3 à $\delta = 18,6\text{ppm}$ confirmant la structure du composé hybride **4d**. L'ensemble des résultats obtenus sont représentés dans le tableau I.17.

Tableau I.17: Résultats RMN du ^{13}C du composé **4d**

C_n	δ (ppm) du ^{13}C	C_n	δ (ppm) du ^{13}C
C_7	18,6	$\text{C}_{7'}$	129,5
C_6	51,9	$\text{C}_{3'', 5''}$	140,9
C_5	101,8	$\text{C}_{2'}$	141,0
$\text{C}_{8'}$	110,9	$\text{C}_{1''}$	147,0
$\text{C}_{6'}$	114,6	$\text{C}_{4'}$	148,0
$\text{C}_{10'}$	126,2	$\text{C}_{9'}$	150,5
$\text{C}_{5'}$	127,3	$\text{C}_{2'}$	157,4
$\text{C}_{4''}$	129,2	C_4	164,8
$\text{C}_{2'', 6''}$	126,3	C_2	168,3
		$\text{C}_{11'}$	191,3

IV-1-5- Composé 4-(4-chlorophényl)-6-méthyl-5-(2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-thione (4e)

En une seule étape, la 3-acétoacétyle coumarine, le 4-chlorobenzaldéhyde en quantité équimolaire et un excès de thio-urée au reflux de l'acétonitrile, et en présence de 20 gouttes de H₂SO₄, la réaction conduit à la formation d'un seul produit qui est le composé 4-(4-chlorophényl)-6-méthyl-5-(2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-4-phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-thione **4e**.



4-(4-chlorophényl)-6-méthyl-5-(2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-4-phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-thione(4e)

A- Etude par spectrométrie de masse

Le spectre de masse réalisé par la LC-MS en mode ESI(+) montre des pics isotopiques du chlore à $m/z=434$ [50, (M+Na)⁺, ³⁵Cl], 436 [25, (M+Na)⁺, ³⁷Cl] ; 451 [75, (M+K)⁺, ³⁵Cl] ; 453 [45, (M+K)⁺, ³⁷Cl], ce qui confirme la présence du chlore dans la formule brute C₂₁H₁₅O₃N₂Cl.

B- Etude par spectroscopie RMN du ¹H

L'apparition du pic à $\delta=5,35$ ppm du H6 et l'absence des signaux caractéristiques du 3-acétoacétyle confirme la formation de la DHPM.

Les signaux caractéristiques du noyau aromatique et du benzopyranone apparaissent entre 7,25 et 8,40 ppm.

Nous observons aussi dans le domaine des champs faibles un pic à $\delta=8,67$ ppm correspond à NH-1 et à $\delta= 8,84$ ppm correspondant à NH-3 de la dihydropyrimidine. Ces résultats spectroscopiques confirment la formation du composé hybride **4e**. Dans le tableau I.18 nous reportons les déplacements chimiques du spectre RMN.

Tableau I.18: Résultats du spectre RMN ^1H du composé **4e**

δ (ppm)	Multiplicité	Attribution
2,10	s,3H	$\text{CH}_3(7)$
5,35	d,1H J=3,5Hz	H6
7,25	d,2H J=8,5Hz	H3'',5''
7,42	d,1H J=8,9Hz	H8'
7,48	d,1H J=8,5Hz	H2'',6''
7,72	t,1H J=8,9Hz	H6'
7,87	d,1H J=8,9Hz	H5'
7,95	t,1H J=8,9Hz	H7'
8,40	s,1H	H4'
8,67	d,1H J=3,5Hz	NH-1
8,84	s,1H	NH-3

C- Etude par spectroscopie RMN du ^{13}C

Le spectre RMN du ^{13}C montre un pic caractéristique du CH_3 et un autre pic caractéristique du CH (C6) dans les champs forts. Le carbone la fonction cétone en C11 apparait à 188,1ppm confirmant la structure **4e**. L'ensemble des résultats obtenus sont reportés dans le tableau I.19

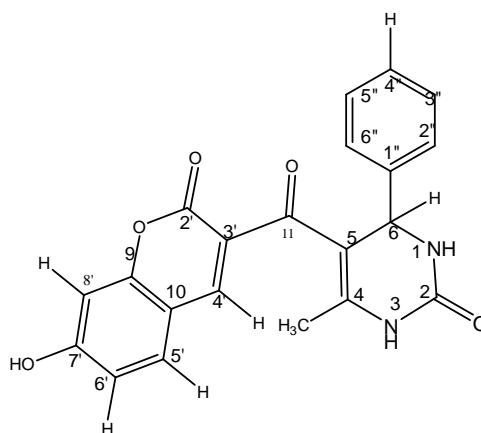
Tableau I.19 : résultats du spectre RMN ^{13}C du composé **4e**

C_n	δ (ppm) du ^{13}C	C_n	δ (ppm) du ^{13}C
C_7	18,3	$\text{C}_{3'',5''}$	132,9
C_6	54,2	$\text{C}_{4''}$	133,9
C_5	105,7	$\text{C}_{3'}$	136,4
$\text{C}_{8'}$	116,3	$\text{C}_{1''}$	139,1
$\text{C}_{10'}$	118,5	$\text{C}_{4'}$	144,5
$\text{C}_{6'}$	120,7	$\text{C}_{9'}$	150,8
		$\text{C}_{11'}$	188.1

IV-2- Composés 4-aryl-5-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-6-méthyl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (5a-d)

IV-2-1- Composés 5-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-6-méthyl-4-phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (5a)

Par la même méthode de synthèse que celle citée précédemment pour la synthèse des composés **4a-e**, la réaction en un pot de 3-acétoacétyl-7-hydroxycoumarine **1b**, du benzaldéhyde **2** et d'urée **3** a conduit à la formation d'un seul produit **5a** qui est le composé 5-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-6-méthyl-4-phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(H)-one.



5-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-6-méthyl-4-phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(H)-one **5a**

A- Etude par spectrométrie de masse (MS-ESI(+))

Le spectre de masse réalisé par la LC-MS en mode ESI(+) montre un pic $m/z = 399$ (100) correspondant à l'ion $(M+Na)^+$, et un autre pic $m/z = 377$ (60) correspond à $(M+H)^+$, ce qui confirme la formule brute $C_{21}H_{16}N_2O_5$.

B- Etude par spectroscopie RMN du 1H

Dans le domaine des champs forts, apparaît le pic de H(6) à $\delta=5,21\text{ppm}$ (d, 1H) caractéristique de la DHPM, de même le pic des protons équivalents du groupement méthyle CH_3 (12) à $\delta=2,04\text{ppm}$ (s, 3H). L'absence des pics caractéristiques du groupement acétoacétyle confirme qu'il a réagit. Les protons du noyau aromatique de la coumarine sont conservés et apparaissent à $6,74\text{ppm}$ (s, 1H) attribué à H8', à $\delta=6,79\text{ ppm}$ (d, 1H)

correspondant à H6' et 7,55 ppm (d, 1H) pour H5'. Le pic du proton de la coumarine H4' apparaît à $\delta=7,90$ ppm (s, 1H).

Entre 7,21 ppm et 7,30 ppm apparaissent les pics caractéristiques du noyau aromatique lié à la dihydropyrimidinone sous forme d'un multiplet attribué au H2'', 3'', 4'', 5'', 6''.

À $\delta=7,92$ ppm apparaît le pic de NH-1 et à $\delta=9,39$ ppm NH-3 affirme la formation de la dihydropyrimidinone. À $\delta=11,06$ ppm apparaît le pic caractéristique de OH (7').

Dans le tableau I.20, sont reportés les résultats RMN du proton enregistrés pour le composé **5a**.

Tableau I.20: Résultats de RMN ^1H du composé **5a**

δ (ppm)	Multiplicité	Attribution
2,04	s, 3H	CH ₃ (7)
5,21	d, 1H J=3,3Hz	H6
6,74	S, 1H	H8'
6,79	d, 1H J=8,6Hz	H6'
7,21-7,30	M	H2'', 3'', 4'', 5'', 6''
7,55	d, 1H J=8,6Hz	H5'
7,90	s, 1H	H4'
7,92	d, 1H J=3,3Hz	NH-1
9,39	s, 1H	NH-3
11,06	Large	OH 7'

C- Etude par spectroscopie RMN du ^{13}C

Le nombre de signaux qui apparaissent sur le spectre est en accord avec le nombre de carbone de la molécule.

Les pics caractéristiques de la molécule apparaissent à $\delta=18,4$ ppm (CH₃), à $\delta=53,9$ ppm (C6) et le carbone de la cétone apparaît à $\delta=187,8$ ppm (C11) différent de celui de l'acétoacétylcoumarine. Dans le tableau I.21 sont reportés les résultats de RMN du carbone-13 enregistrés pour le composé **5a**.

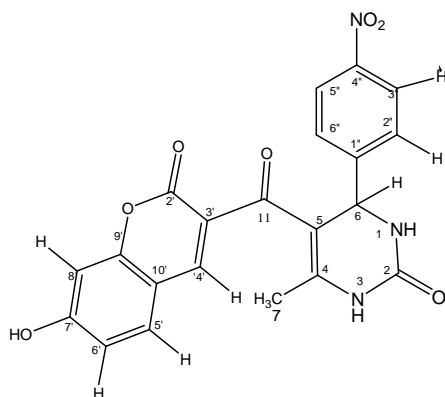
I.21 : Résultats du spectre RMN du ^{13}C enregistrés pour le composé **5a**

C_n	δ (ppm) du ^{13}C	C_n	δ (ppm) du ^{13}C
C_7	18,4	$\text{C}_{3''}, 5''$	134,6
C_6	53,9	$\text{C}_{3'}$	144,3
$\text{C}_{8'}$	101,8	$\text{C}_{4'}$	146,8
C_6	110,8	C_2	151,9
$\text{C}_{10'}$	111,4	$\text{C}_{9'}$	152,4
C_5	113,8	C_4	156,1
$\text{C}_{4''}$	124,9	$\text{C}_{7'}$	158,3
$\text{C}_{2''}, 6''$	128,4	$\text{C}_{2'}$	162,7
$\text{C}_{5'}$	128,7	$\text{C}_{11'}$	187,8

IV-2-2- Composé 5-(7-hydroxy-2-oxo-2*H*-chromène-3-carbonyl)-6-méthyl-4-(4-nitrophényl)-3,4-dihydropyrimidin-2(*H*)-one (**5b**)

La réaction à multicomposant mettant en jeu la 3-acétoacétyl-7-hydroxycoumarine **1b**, le 4-nitrobenzaldéhyde et l'urée conduit après 12 heures de reflux dans l'acétonitrile à la formation d'un seul produit **5b** qui est le composé 5-(7-hydroxy-2-oxo-2*H*-chromène-3-carbonyl)-6-méthyl-4-(4-nitrophényl)-3,4-dihydropyrimidin-2(*H*)-one.

Une analyse complète pour ce composé a été réalisée : en spectrométrie de masse, en spectroscopie RMN du ^1H et du ^{13}C , en RMN à 2D (HMBC, HSQC (ou HETCOR) et NOESY). L'ensemble des résultats ont confirmé la formation d'un nouveau produit et la RMN à 2D nous a aidé à identifier la structure du composé **5b** et la structure générale des produits de toute la série.

5-(7-hydroxy-2-oxo-2*H*-chromène-3-carbonyl)-6-méthyl-4-(4-nitrophényl)-3,4-dihydropyrimidin-2(*H*)-one**5b**

A- Etude par spectrométrie de masse (MS-ESI(+))

Le spectre de masse réalisé par la LC-MS en mode ESI(+) montre un pic à $m/z = 444$ (100) $[M+Na]^+$ qui est le pic de base et un autre à 422 (60) $[M+H]^+$, ce qui es en accord avec la formule brute $C_{21}H_{15}O_7N_3$.

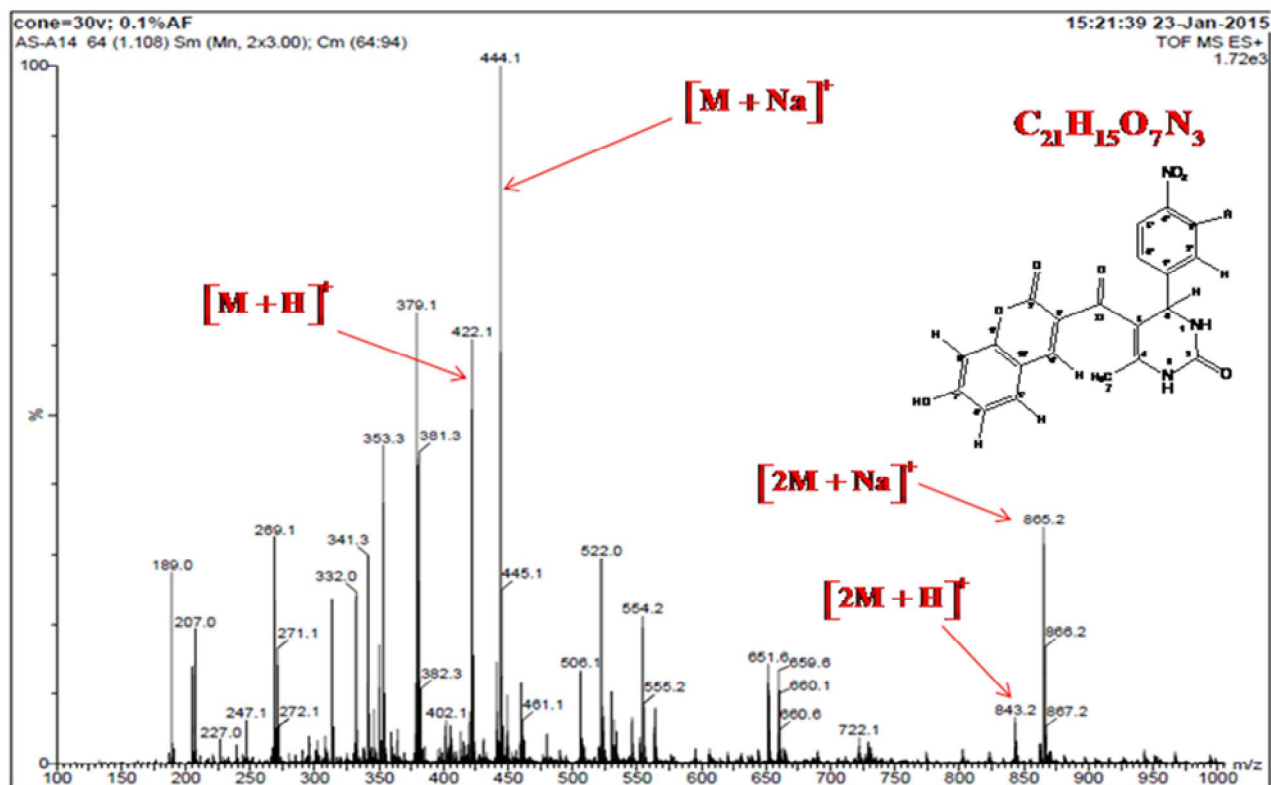


Figure I.30: Spectre de masse (MS-ESI⁺) du composé **5b**

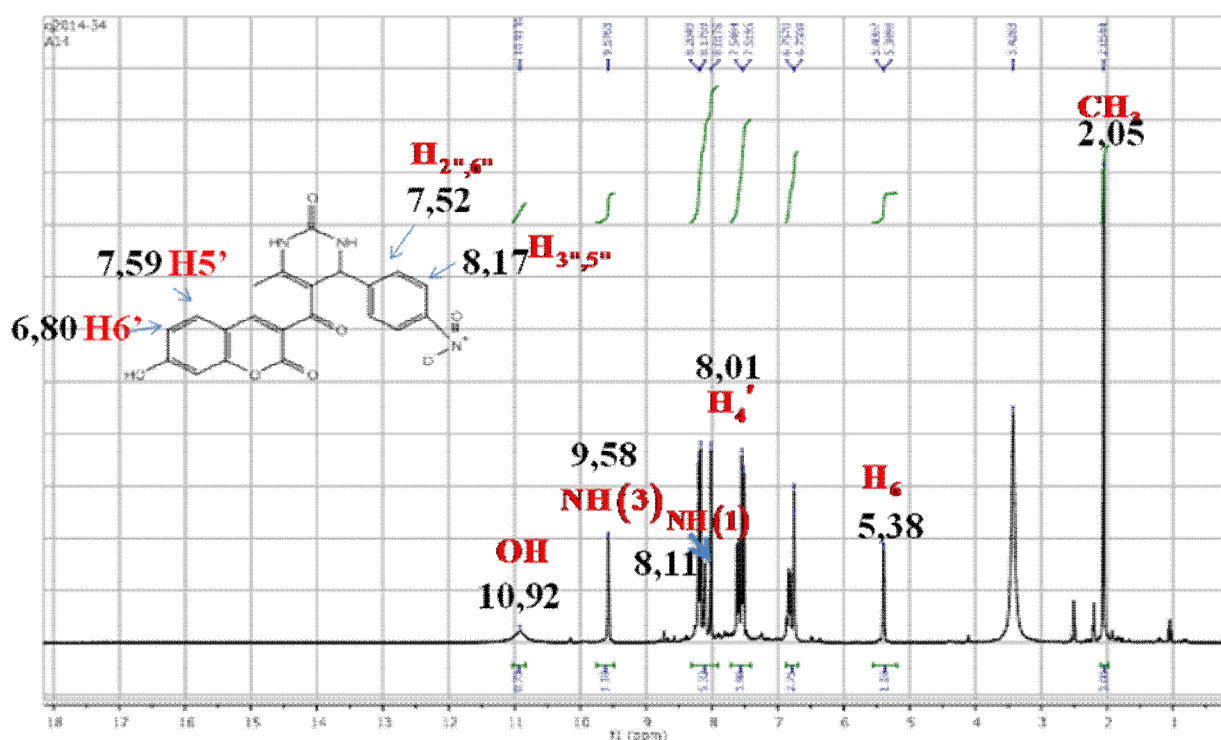
B- Etude par spectroscopie RMN du ¹H

Comme dans le cas des produits précédents, nous remarquons la disparition des pics du groupement acétoacétyle et l'apparition dans le domaine des champs forts d'un doublet à 5,38ppm affecté au proton H₆ de la DHPM et celui de CH₃ à $\delta = 2,05$ ppm. Dans le domaine des champs faibles apparaît un pic à $\delta = 8,11$ ppm (d, 1H) correspondant à NH (1) et à $\delta = 9,58$ ppm (s, 1H) correspondant à NH (3) confirmant la formation de la DHPM. Les pics de la coumarine sont conservés et apparaissent à 8,01ppm pour le H_{4'}. Le pic du OH apparait à $\delta = 10,92$ ppm (Large, 1H). Les autres pics de la benzopyranone apparaissent comme doublets à 6.80 (d, 1H, J=8,5 Hz, H-6'), 7,59 (d, 2H, J = 8,6 Hz, H-5').

Les protons du 4-nitrophényle lié à la dihydropyrimidinone apparaissent sous forme de doublets à 7,52 ppm (d, 2H, J=8.6 Hz, H-2'', 6'') et à 8,17 ppm (d, 1H, J = 8,7 Hz, H-3'', 5''). Dans le tableau I.22 nous reportons les résultats enregistrés

Tableau I.22: Résultats du spectre RMN du ^1H du composé **5b**

$\delta(\text{ppm})$	Multiplicité	Attribution	$\delta(\text{ppm})$	Multiplicité	Attribution
2,05	s (3H)	CH ₃ (7)	8,02	s (1H)	H (4')
5,38	d (1H) J=3,3Hz	H (6)	8,11	d (1H) J=3,3Hz	NH(1)
6,75	s (1H)	H(8')	8,17	d (1H) J=8,7Hz	CH(3'',5'')
6,80	d (1H) J=8,5Hz	H (6')	9,58	s (1H)	NH(3)
7,52	d (2H) J=8,6Hz	H(2'',6'')	10,92	Large	OH(7')
7,59	d (2H) J=8,6Hz	H(5')			

Figure I.31: Spectre RMN du ^1H du composé **5b**

C-Etude par spectroscopie RMN du ^{13}C , NOESY, HSQC et HMBC

Pour identifier et confirmer sans ambiguïtés la structure exacte de nos produits, la RMN à 2D a été réalisée pour le composé **5b**: spectre NOESY, HSQC (ou HETCOR) et HMBC.

Le spectre HSQC permet d'identifier tous les carbones protonés par corrélation entre le carbone et son proton à distance J^1 . Tandis que les carbones non protonés ou carbone quaternaire sont identifiés par le spectre HMBC à distance J^2 et J^3 par corrélation avec les protons des carbones voisins.

Dans le domaine des carbones sp^3 du RMN, nous observons un pic à $\delta = 18,5$ ppm qui ne peut être attribué qu'au groupement méthyle CH_3 et un autre un pic à $\delta = 53,7$ ppm attribué pour le C6. Le pic caractéristique du carbonyle (C=O) en position C11 apparaît à $\delta = 187,6$ ppm et celui du OH (7') à $\delta = 162,7$ ppm. A l'aide du spectre HSQC nous avons attribué tous les carbones protonés à distance J^1 . Les carbones non protonés ou carbones quaternaires ont été identifiés à l'aide du spectre HMBC à distance J^2 et J^3 . Dans le tableau I.23 sont reportés les résultats du spectre RMN du ^{13}C avec HSQC et HMBC.

Tableau I.23:Résultats du spectre RMN du RMN du ^{13}C avec HSQC et HMBC du composé **5b**

N° de carbone	$\delta^{13}C$ (ppm)	δ^1H (ppm)	HSQC H-C (J^1)	HMBC H-C ($J^2 J^3$)
C ₇	18,5	2,05	H-CH ₃ (7)	
C ₆	53,7	5,38	H-C ₆	
C _{8'}	102,0	6,75	H-C _{8'}	
C ₅	109,0	-	-	H ₇ ,H ₆
C _{10'}	110,8	-	-	H _{4'} ,H _{5'} ,H _{6'} ,H _{8'}
C _{6'}	113,8	6,80	H-C _{6'}	
C _{3''} , _{5''}	123,7	8,17	H-C _{3''} ,H-C _{5''}	
C _{3'}	124,4	-	-	H _{4'}
C _{2''} , _{6''}	127,7	7,52	H-C _{2''} , H-C _{6''}	
C _{5'}	131,1	7,59	H-C _{5'}	
C _{4'}	144	8,02	H-C _{4'}	
C _{4''}	146,7	-	-	H _{2''} , _{3''} , _{5''} , _{6''} .
C ₂	150,2	-	-	H-6
C ₄	151,4	-	-	H-7
C _{1''}	151,6	-	-	H ₆ , H _{2''} , _{3''} , _{5''} , _{6''} .
C _{9'}	155,9	-	-	H _{4'} ,H _{5'} ,H _{8'}
C _{2'}	158,2	-	-	H _{4'}
C _{7'}	162,7	-	-	H _{6'} ,H _{8'} ,H _{5'}
C=O(11)	187,6	-	-	H ₆ ,H _{4'}

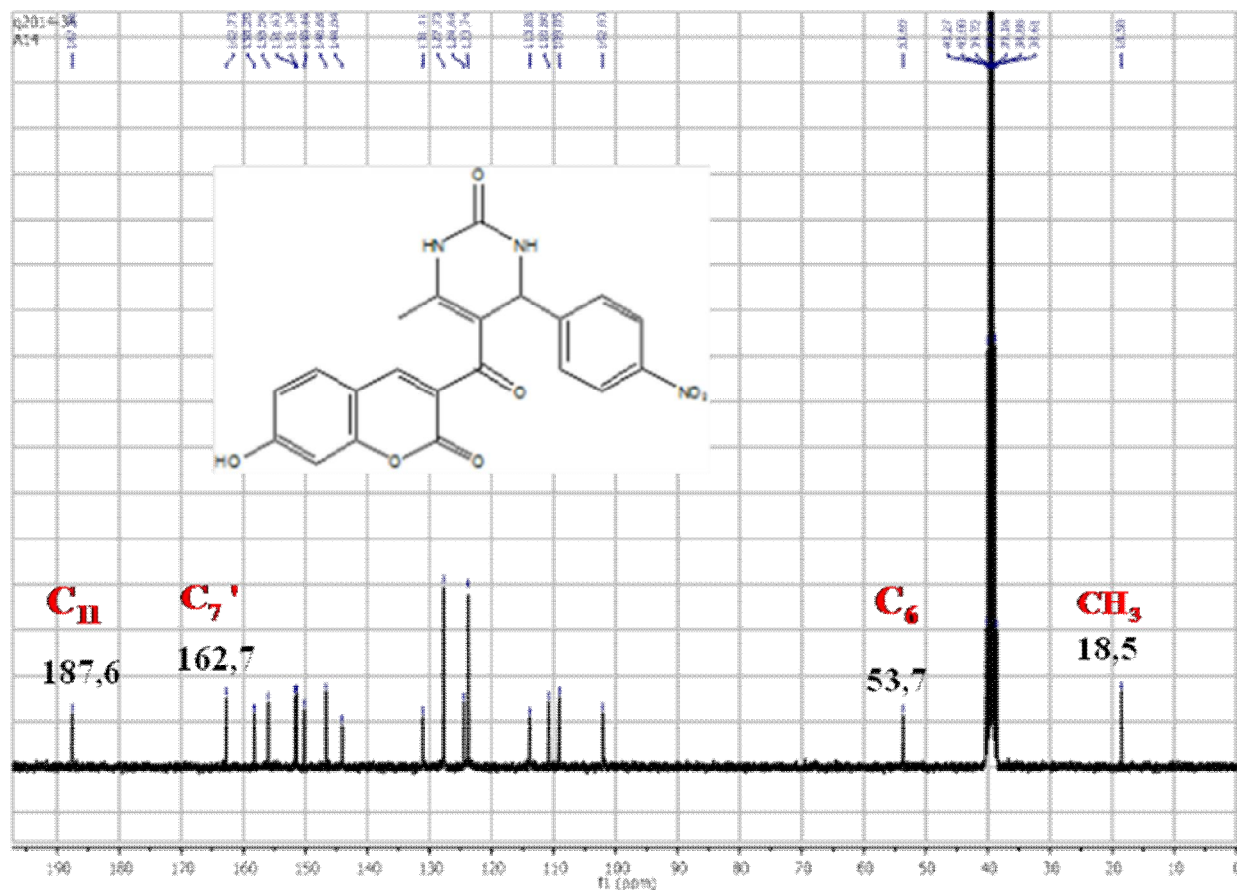


Figure I.32: Spectre RMN du ^{13}C du composé **5b**

Le spectre HMBC nous renseigne sur la présence de corrélation entre H-4' et l'atome de carbone du carbonyle de la fonction cétone (C11), qui est également en corrélation avec H-6 (Figure I.28). Ces corrélations sont uniquement compatibles avec la structure **5b** et non **5b'**. ce qui prouve que nous avons obtenu 4-aryl-6-méthyl-5-(2-oxo-2*H*-chromène-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones/thiones **4a-e**, **5a-d**, **6a-d**, **7** et **8**, et non les isomères correspondants ou **4'a-e**, **5'a-d**, **6'a-d**, **7'** et **8'**.

D'autres corrélations sont aussi observées :

- ✓ le H4' est en corrélation avec le C11', C2', C9 et le C10'.
- ✓ le H6' est en corrélation avec le C10' et le C7'.
- ✓ le H8' est en corrélation avec le C9', le C7' et le C10'.
- ✓ le H6 est en corrélation avec le C5, C2, C1'' et avec le C11'.
- ✓ le H2'' est en corrélation avec le C1'' et le C4''.

Ces différentes corrélations sont représentées dans la figure I.33.

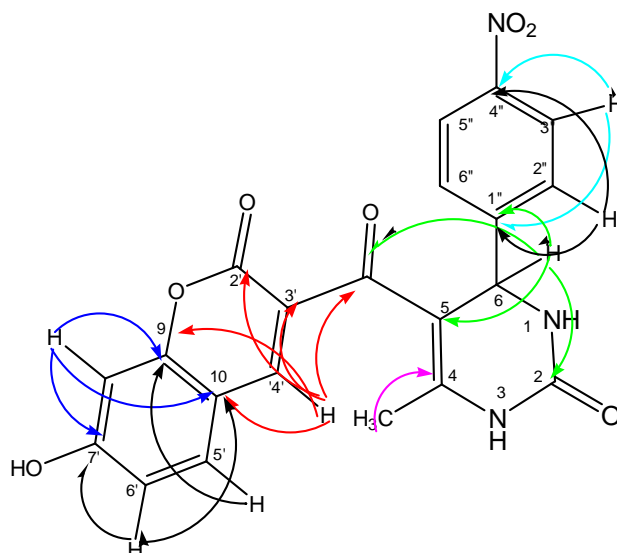


Figure I.33: Corrélations HMBC de 5-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-6-méthyl-4(4-nitrophényl)-3,4-dihydropyrimidin-2(*H*)-one **5b**

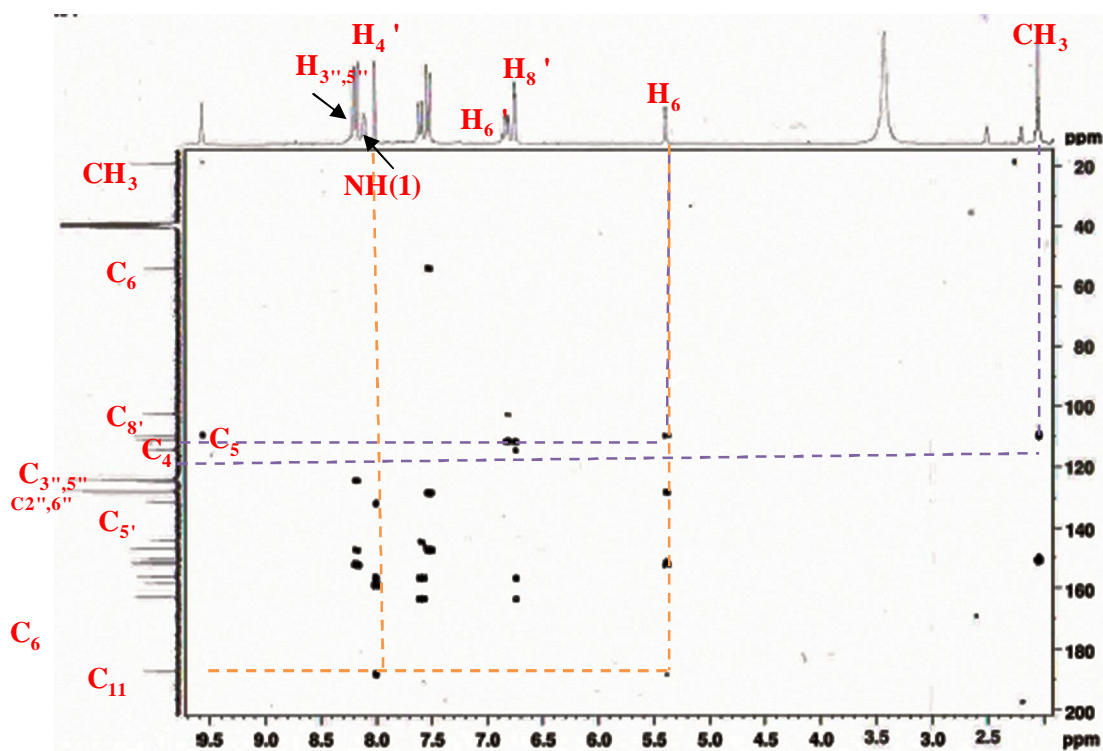


Figure I.34: Spectre HMBC du composé **5b**

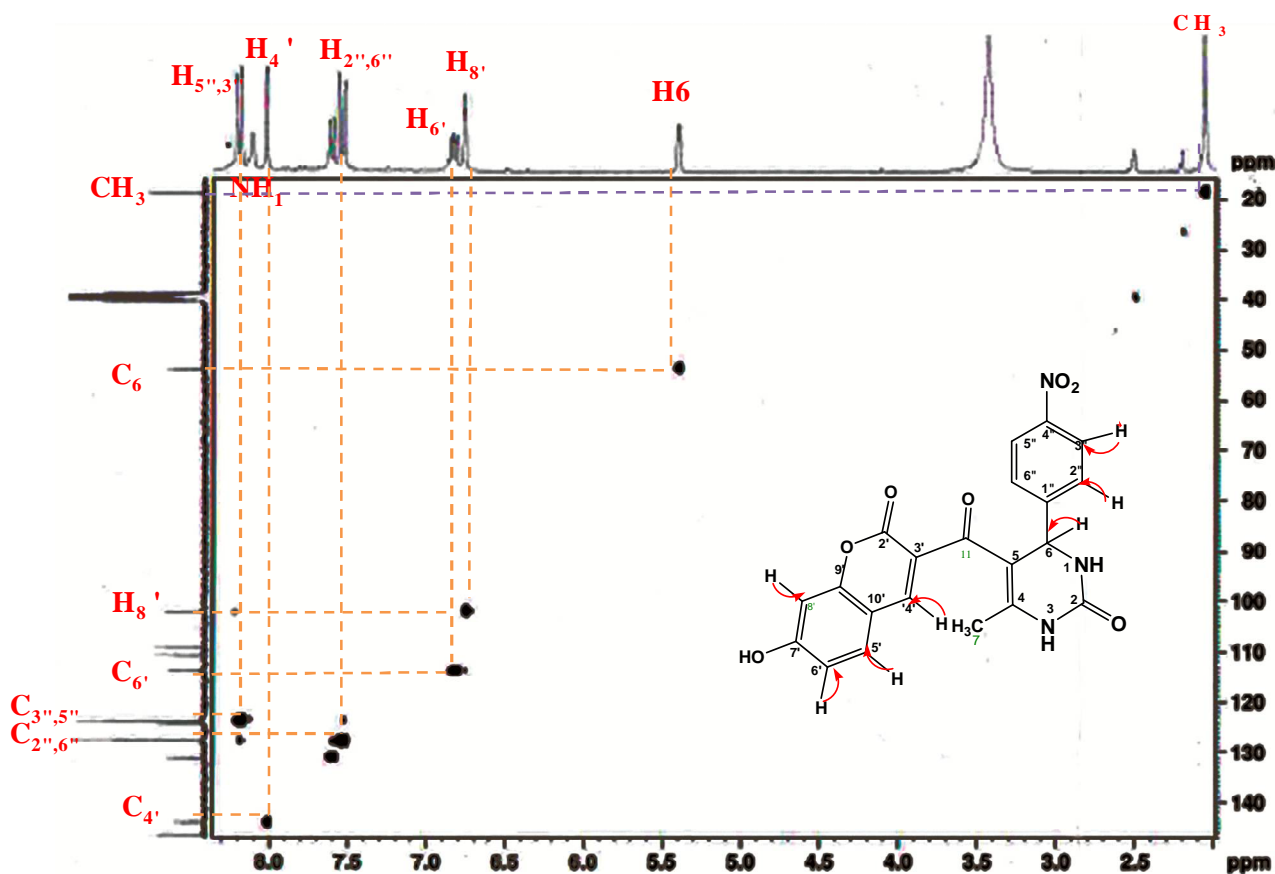


Figure I.35: Spectre HSQC du composé **5b**

D- Etude par spectroscopie NOESY

Le spectre NOESY correspond aux couplages ^1H - ^1H , présenté ci-dessous dans la figure II.29 révèle la présence d'effets NOE entre H-2'', 6'' et H-6, NH-1, NH-3 et CH_3 , qui peut être dû au centre asymétrique en C-6. Il ya aussi des effets NOE :

- ✓ Entre H-4' avec H-5' et H7 du CH_3 ;
- ✓ un autre effet est observé entre H-5' et H-6', et NH-3.
- ✓ Un autre est observé entre le CH_3 et le NH-3.

La figure I.29 ci-dessous représente les différents effets NOE observés.

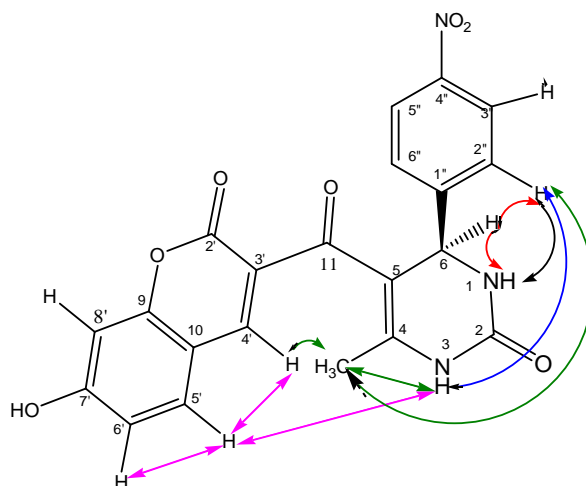


Figure I. 36 : Effets Noesy observés de 5-(7-hydroxy-2-oxo-2*H*-chromène-3-carbonyl)-6-méthyl-4-(4-nitrophényl)-3,4-dihydropyrimidin-2(*H*)-one: **5b**.

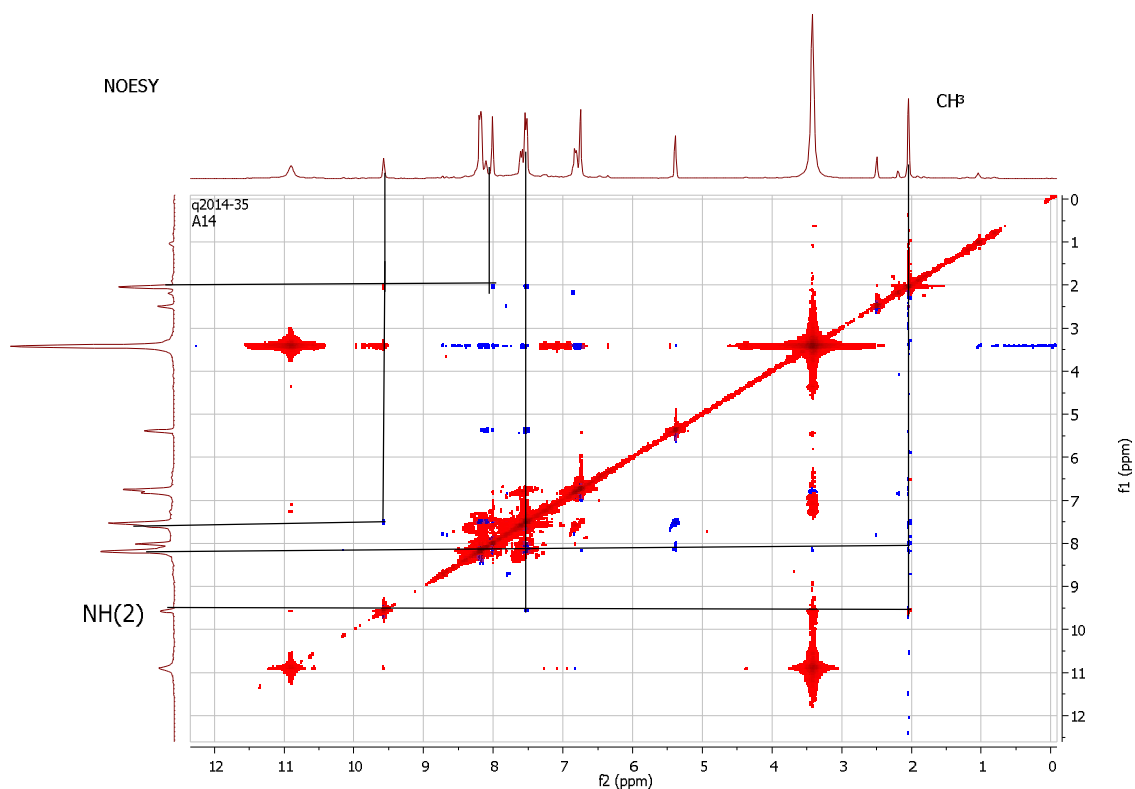
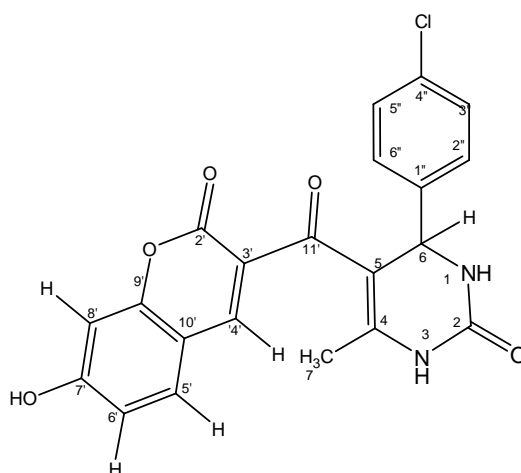


Figure I.37 : Spectre NOESY du composé **5b**.

Le spectre NOESY du composé **5b** ne nous a pas permis d'identifier l'isomère obtenu. Les analyses effectuées avec le spectre HMBC, qui nous a permis d'attribuer tous les carbones non protonés à distances J^2 et J^3 et les connectivités de HMBC du composé **5b** sont la clé de la structure de l'isomère obtenu.

IV-2-3- Composé 4-(4-chlorophényl)-5-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-6-méthyl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (**5c**)

La réaction de la 3-acétoacétyl-7-hydroxycoumarine **1b** le 4-chlorobenzaldéhyde et l'urée au reflux d'acétonitrile et en présence de H₂SO₄ comme catalyseur, conduit à la formation d'un seul produit après addition d'eau distillée glacée et purification par recristallisation. Il s'agit du composé 4-(4-chlorophényl)-5-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-6-méthyl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one **5c**.



4-(4-chlorophényl)-5-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-6-méthyl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one **5c**

A- Etude par spectrométrie de masse

Le spectre de masse en mode ESI(+), montre des pics à $m/z=433$ (100, (M+Na)⁺, ³⁵Cl), à $m/z =435$ (38, (M+Na)⁺, ³⁷Cl), à $m/z =412$ (40, (M+H)⁺, ³⁵Cl) et à $m/z =414$ (15, (M+H)⁺, ³⁷Cl), pics isotopiques du chlore, Ce qui confirme la formule brute du composé **5c** C₂₁H₁₅Cl N₂O₅.

B- Etude par spectroscopie RMN du ¹H

Les pics du groupement acétoacétyle (OH énolique,=CH cétoénolique) sont absents et les pics qui confirme la formation de la DHPM apparaissent à $\delta=2,05$ ppm (s, 3H) du CH₃(12) et à $\delta=5,25$ ppm (d, 1H) attribuable à H6. Dans le domaine des champs faibles, on observe un pic à $\delta=8,73$ ppm (d, 1H) de NH-1 et à $\delta=9,47$ ppm (s, 1H) correspondant à NH-3. Il apparait aussi un pic large à $\delta=10,90$ ppm correspondant à OH (7'). Le noyau coumarinique est conservé par

apparition du pic de H4' à $\delta=8,09$ ppm. L'ensemble des résultats enregistrés sont regroupés dans le tableau I.24.

Tableau I.24 : Résultats du spectre RMN ^1H obtenus pour le composé **5c**

δ (ppm)	Multiplicité	Attribution
2,05	s, 3H	CH ₃ (7)
5,25	d, 1H J=3,3Hz	H6
6,74	s, 1H	H8'
6,86	d, 1H J=8,6Hz	H6'
7,24	d, 2H J=8,3Hz	H3'', 5''
7,35	d, 2H J=8,3Hz	H2'', 6''
7,76	d, 1H J=8,7Hz	H5'
8,09	s, 1H	H4'
8,73	d, 1H J=3,3Hz	NH-1
9,47	s, 1H	NH-3
10,90	Large	OH 7'

C- Etude par spectroscopie RMN du ^{13}C

Sur le spectre RMN du Carbone-13 apparaît le pic caractéristique du carbonyle (C=O) en position C_{11'} à $\delta = 187,6$ ppm et les pics caractéristiques de la DHPM et de la coumarine.

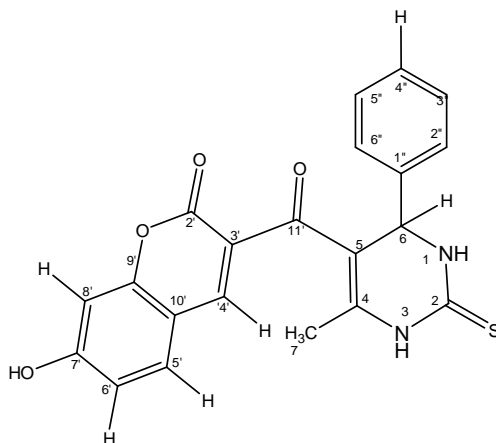
Dans le tableau I.25 nous reportons les résultats de RMN du carbone-13 enregistrés pour le composé **5c**.

Tableau I.25 : Résultats du spectre RMN ^{13}C du composé **5c**

C _n	δ (ppm) du ^{13}C	C _n	δ (ppm) du ^{13}C
C ₇	18,5	C _{3'}	131,8
C ₆	53,5	C _{1''}	143,9
C _{8'}	102,0	C _{4'}	146,6
C _{6'}	109,5	C ₂	149,6
C _{10'}	110,8	C _{9'}	151,7
C ₅	113,7	C ₄	155,9
C _{5'}	121,2	C _{7'}	158,2
C _{2'',6''}	124,4	C _{2'}	162,8
C _{3'',5''}	128,3	C _{11'}	187,6

IV-2-4- Composé 5-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-6-méthyl-4-phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(H)-thione (5d)

Dans les mêmes conditions que celles décrites auparavant, la RMC du benzaldéhyde **2**, de la 3-acétoacyl-7-hydroxycoumarine **1b** et de la thio-urée **3** donne le composé 5-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-6-méthyl-4-phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(H)-thione **5d**, sa structure est identifiée par l'étude spectroscopie RMN et la spectrométrie de masse.



5-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-6-méthyl-4-phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(H)-thione **5d**.

A- Etude par spectrométrie de masse (MS-ESI(+))

À $m/z = 393$ (100) apparaît le pic de l'ion moléculaire $(M+H)^+$ et un autre à 415 (10) correspondant à $[M+Na]^+$, confirmant ainsi la formule brute $C_{21}H_{16}O_5N_2S$. Le pic moléculaire $(M+H)^+$ représente aussi le pic de base de la molécule ce qui confirme la pureté et la stabilité de la structure.

B- Etude par spectroscopie RMN du 1H

Comme dans les cas précédents on observe que dans le domaine des champs forts, apparaît un pic à $\delta = 2,08$ ppm (s, 3H) attribuable aux trois protons identiques de CH_3 (7), un autre à $\delta=5,21$ ppm (d, 1H), correspondant au proton éthylénique H (6) confirmant ainsi la formation de la DHPM et dans le domaine des champs faibles, on observe un pic à $\delta = 8,86$ attribué à NH-1, et à 8,74 ppm attribué à NH-3 de la dihydropyrimidinone . À $\delta = 11,16$ ppm apparaît un pic large de OH7' et les protons du noyau coumariniques sont conservés. Dans le tableau I.26, nous reportons les résultats enregistrés.

Tableau I.26 : Résultats du spectre RMN ^1H enregistrés pour le composé **5d**

δ (ppm)	Multiplicité	Attribution
2,08	s, 3H	$\text{CH}_3(7)$
5,21	d, 1H $J=3,5\text{Hz}$	H6
6,76	s, 1H	H8'
6,84	d, 1H $J=8,6\text{Hz}$	H6'
7,19-7,32	M	H2'', 3'', 4'', 5'', 6''
7,78	d, 1H $J=8,6\text{Hz}$	H5'
8,06	s, 1H	H4'
8,68	d, 1H $J=3,5\text{Hz}$	NH-1
8,74	s, 1H	NH-3
11,16	Large	OH 7'

C- Etude par spectroscopie RMN du ^{13}C

Le nombre de signaux qui apparaissent sur le spectre RMN du carbone-13 est compatible avec le nombre de carbone que contient la molécule.

Sur le spectre RMN du carbone-13 apparaît un pic caractéristique d'un carbonyle ($\text{C}=\text{O}$) en position C_{11} , différent de celui de l'acétoacétylcoumarine qui apparaît aux environs de 200ppm, et celui de $\text{C}=\text{O}$ en position C2 de la DHPM confirmant l'absence de l'acétoacétyte et formation de la DHPM. Les résultats enregistrés sont reportés dans le tableau I.27.

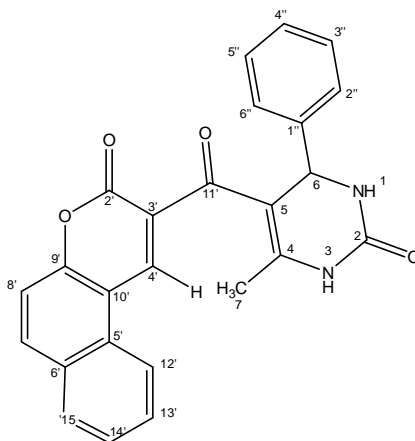
Tableau I.27: Résultats du spectre RMN ^{13}C enregistrés pour le composé **5d**

C_n	δ (ppm)	C_n	δ (ppm)
CH_3 (C12)	18,4	$\text{C}_{3'', 5''}$	132,9
C_6	54,2	$\text{C}_{3'}$	142,8
$\text{C}_{8'}$	101,7	$\text{C}_{1''}$	146,5
$\text{C}_{6'}$	110,9	$\text{C}_{4'}$	148,4
C_{10}	113,8	C_9	157,7
C_5	114,4	$\text{C}_{7'}$	157,9
$\text{C}_{4''}$	126,3	C_4	164,5
$\text{C}_{2'', 6''}$	128,4	$\text{C}_{2'}$	174,7
$\text{C}_{5'}$	132,2	C_{11}	191,3

IV-3- Composés 4-aryl-6-méthyl-5-(3-oxo-3*H*-benzo[f]chromène-2-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-one (6a-d)

IV-3-1- Composé 6-méthyl-5-(3-oxo-3*H*-benzo[f]chromène-2-carbonyl)-4-phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-one (6a)

En suivant la même méthode décrite précédemment, nous avons isolé un seul produit dont la pureté a été confirmée par la CCM en utilisant comme éluant un mélange de méthanol-chloroforme (1V/5V).



6-méthyl-5-(3-oxo-3*H*-benzo[f]chromène-2-carbonyl)-4-phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-one **6a**

A- Etude par spectrométrie de masse(MS-ESI(+))

Le spectre de masse en mode LC-MS mode ESI(+) de **6a** montre un pic à $m/z= 411$ (50) qui est le pic de l'ion moléculaire $(M+H)^+$. Un autre pic est observé à $m/z= 450$ (100) correspondant au pic moléculaire $(M+K)^+$ ce qui confirme la formule brute $C_{25}H_{18}N_2O_4$ du composé **6a**.

B- Etude par spectroscopie RMN du 1H

Les pics caractéristiques du groupement acétoacétyle sont absents et ceux du noyau coumarinique sont conservés.

Des pics caractéristiques du noyau DHPM sont observés à $\delta= 2,11$ ppm apparait un singulet de multiplicité (3H) attribuable au groupement méthyle $CH_3(7)$ et à $\delta= 5,38$ ppm apparait un doublet de multiplicité (1H) attribuable à CH-6. Les groupements $-NH$ apparaissent à $\delta= 9,37$ ppm (NH-1) et à $\delta= 9,62$ ppm (NH-3). Le noyau benzénique apparait sous forme d'un multiplet entre 6,99-7,44ppm.

L'ensemble des résultats enregistrés sont reportés dans le tableau I. 28 confirmant ainsi la formation du composé hybride **6a**.

Tableau I.28 : Résultats du spectre RMN du proton enregistrés pour le composé **6a**

δ (ppm)	Multiplicité	Attribution
2,11	s, 3H	CH ₃
5,38	d, 1H J=3,5Hz	H6
6,99-7,44	m, 5H	H2'',2'',3'',4'',5'',6''
7,60	d, 1H J=8,8Hz	H8'
7,65	t, 1H J=8,8Hz	H7'
7,72	d, 1H J=8,8Hz	H5'
8,02	t, 1H J=8,8Hz	H6'
8,14	d, 1H J=8,7Hz	H9'
8,50	d, 1H J=8,7Hz	H10'
8,94	s, 1H	H4'
9,37	d, 1H J=3,5Hz	NH-1
9,62	s, 1H	NH-3

C- Etude par spectroscopie RMN du ¹³C

Dans les champs forts les pics du groupement acétoacétyl sont absents à savoir les signaux du groupement méthyle du CH₂ (forme diones) et =CH(forme cétoénolique). L'apparition d'un pic à $\delta=18,4$ ppm qui ne peut être attribué qu'à un groupement méthyle de la DHPM, et du pic caractéristique de H6 à $\delta= 53,6$ ppm confirment la présence de la DHPM.

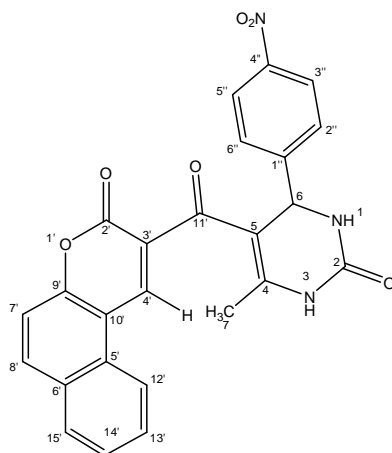
Les pics des carbones du noyau benzocoumarinique sont conservés, et le pic du carbone de la fonction cétone en C11' apparait à $\delta=187,3$. Les résultats enregistrés sont représentés dans le tableau I.29

Tableau I.29 : Résultats obtenus du spectre RMN ^{13}C du composé **6a**

C_n	δ (ppm) du ^{13}C	C_n	δ (ppm) du ^{13}C
C_7	18,4	$\text{C}_{6'}$	134,2
C_6	53,6	$\text{C}_{7'}$	134,8
$\text{C}_{8'}$	110,6	$\text{C}_{5'}$	137,6
$\text{C}_{10'}$	112,6	$\text{C}_{3'}$	138,9
$\text{C}_{12'}$	116,1	$\text{C}_{1''}$	143,8
$\text{C}_{14'}$	119,5	$\text{C}_{4'}$	148,5
$\text{C}_{13'}$	126,3	C_2	152,2
$\text{C}_{4''}$	127,3	$\text{C}_{9'}$	153,6
$\text{C}_{2'',6''}$	128,4	C_4	157,8
$\text{C}_{15''}$	129,0	$\text{C}_{2'}$	170,2
$\text{C}_{3'',5''}$	129,7	$\text{C}_{11'}$	187,3

IV-3-2- Composé 6-méthyl-4-(4-nitrophényl)-5-(3-oxo-3*H*-enzo[f]chromène-2-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-one (**6b**)

En suivant la même méthode décrite précédemment pour **6a**, nous avons obtenu un seul produit **6b** qui est le 6-méthyl-4-(4-nitrophényl)-5-(3-oxo-3*H*-benzo[f]chromène-2-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-one en utilisant le 4-nitrobenzaldéhyde.



6-méthyl-4-(4-nitrophényl)-5-(3-oxo-3*H*-benzo[f]chromène-2-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-one

6b

A- Etude par spectrométrie de masse (MS-ESI(+))

Le spectre de masse réalisé par la LC-MS en mode ESI(+) montre un pic à $m/z = 456$ (35) correspondant à l'ion moléculaire $(M+H)^+$ et un autre pic à $m/z=478$ (100) correspondant à $(M+Na)^+$, confirmant ainsi la formule brute $C_{25}H_{17}N_3O_6$ du composé **6b**.

B- Etude par spectroscopie RMN du 1H

Comme dans le cas des produits de la série Coum-DHPM, les pics caractéristique du groupement acétoacétyle sont absents et apparition dans le domaine des champs forts d'un pic à $\delta=5,47$ ppm correspond au proton éthylénique H6 caractéristique de la DHPM et à $\delta =2,13$ ppm (S, 3H) attribuable aux trois protons identique de CH_3 (7).

Dans les champs faibles, les pics caractéristiques du $-NH(1)$ et $-NH(3)$ de la dihydropyrimidinone apparaissent à $\delta=9,32$ et $9,71$ ppm. Les protons du noyau aromatique et du benzocouamrine sont aussi observés. Les résultats enregistrés sont reportés dans le tableau I.30.

Tableau I.30 : Résultats du spectre RMN du proton du composé **6b**

δ (ppm)	Multiplicité	Attribution
2,13	s, 3H	CH_3
5,47	d, 1H J=3,3Hz	H6
7,58	d, 1H J=8,7Hz	H9'
7,61	t, 1H J=8,7Hz	H7'
7,64	d, 1H J=8,1Hz	H2'',6''
7,74	t, 1H J=8,7Hz	H6'
8,06	d, 1H J=8,7Hz	H5'
8,19	d, 1H J=7,8 Hz	H9'
8,27	d, 1H J=7,8Hz	H10'
8,51	d, 1H J=8,1Hz	H3'',5''
8,86	s, 1H	H4'
9,32	d, 1H J=3,3Hz	NH-1
9,71	s, 1H	NH-3

C- Etude par spectroscopie RMN du ^{13}C

Dans le spectre RMN ^{13}C nous remarquons que tous les pics qui apparaissent sont compatibles avec les carbones du composé **6b**. Il apparaît un pic caractéristique d'un carbonyle (C=O) en position $\text{C}_{11'}$ à $\delta = 187,1$ ppm et à $\delta = 53,5$ ppm apparaît un pic caractéristique d'un groupement méthylène en C_6 ainsi nous observons un pic à $\delta = 18,5$ ppm correspondant à CH_3 (C_7). Les pics du groupement acétoacétyle sont absents. Les résultats enregistrés du spectre RMN du carbone-13 confirme sans ambiguïté la formation du composé **6b** et sont résumés dans le tableau I.31.

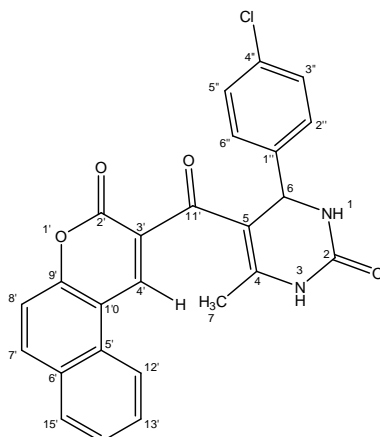
Tableau I.31 : Résultats enregistrés du spectre RMN ^{13}C pour le composé **6b**

C_n	δ (ppm)	C_n	δ (ppm)
C_7	18,5	$\text{C}_{7'}$	129,9
C_6	53,5	$\text{C}_{5'}$	134,4
$\text{C}_{8'}$	108,8	$\text{C}_{3'}$	138,5
$\text{C}_{10'}$	112,7	$\text{C}_{4''}$	146,7
C_5	116,4	$\text{C}_{4'}$	151,3
$\text{C}_{2'',6''}$	122,2	$\text{C}_{1''}$	151,5
$\text{C}_{12'}$	122,6	C_2	151,8
$\text{C}_{14'}$	123,7	$\text{C}_{9'}$	153,7
$\text{C}_{13'}$	126,3	C_4	157,9
$\text{C}_{3'',5''}$	127,8	$\text{C}_{2'}$	173,8
$\text{C}_{15'}$	128,6	$\text{C}_{11'}$	187,1
$\text{C}_{6'}$	128,9		

IV-3-3- Composé 4-(4-chlorophényl)-6-méthyl-5-(3-oxo-benzo[f]chromène-2-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (**6c**)

En suivant la même méthode décrite au dessus, et en utilisant le 4-chlorobenzaldéhyde, on obtient un seul produit le 4-(4-chlorophényl)-6-méthyl-5-(3-oxo-benzo[f]chromène-2-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one **6c**.

L'analyse en spectroscopie RMN du proton et carbone-13 et la spectrométrie de masse ont été réalisés pour déterminer sa structure.



4-(4-chlorophenyl)-6-méthyl-5-(3-oxo-3H-benzo[f]chromene-2-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one
6c

A- Etude par spectrométrie de masse (MS-ESI(+))

Le spectre de masse réalisé par la LC-MS en modeESI(+) montre deux pics isotopiques du chlore à $m/z=434$ (50) $(M+Na)^+$ pour le ^{35}Cl et $m/z=436$ (25) $(M+Na)^+$ pour le ^{37}Cl et deux autres pics à $m/z=451$ [75, $(M+K)^+$, ^{35}Cl] ; 453 [45, $(M+K)^+$, ^{37}Cl] , ce qui confirme la formule brute $C_{21}H_{15}O_3N_2Cl$.

B- Etude par spectroscopie RMN du 1H

Dans le domaine des champs forts, apparaît un pic à $\delta = 2,13$ ppm (s, 3H) attribuable aux trois protons identiques de CH_3 , un doublet à 5,31ppm affecté au proton H_6 de la DHPM. Deux autres singulets attribués à $H_{8'}$ (7,31ppm) et au proton $H_{4'}$ de la coumarine qui est conservé (8,78ppm) .

Dans le domaine des champs faibles, on observe un pic à $\delta = 9,60$ ppm (Large, 1H) correspondant à -NH(3) et un autre à $\delta = 9,35$ ppm (d, 1H) correspondant à -NH(1) confirmant la formation de la dihydropyrimidinone.

Les protons du noyau aromatique et de la benzopyranone apparaissent entre 7,29 et 8,56 ppm. Les déplacements chimiques des pics du spectre RMN du 1H enregistré du composé **6c** sont reportés dans le tableau I.32.

Tableau I.32: Résultats du spectre RMN du proton du composé **6c**

δ (ppm)	Multiplicité	Attribution
2,13	s, 3H	CH ₃
5,31	d, 1H J=3,2Hz	H6
7,29	d, 1H J=8,6Hz	H3'',5''
7,31	d, 1H J=8,6Hz	H8'
7,34	t, 1H J=8,6Hz	H7'
7,66	t, 1H J=8,6Hz	H6'
8,25	d, 1H J=8,6Hz	H2'',6''
8,34	d, 1H J=8,6Hz	H5'
8,47	d, 1H J=7,9Hz	H9'
8,56	d, 1H J=7,9Hz	H10'
8,78	s, 1H	H4'
9,35	d, 1H J=3,2Hz	NH-1
9,60	s, 1H	NH-3

C- Etude par spectroscopie RMN du ¹³C

Comme dans les produits **6a-b** les pics du groupement acétoacétyle sont absents et les pics caractéristiques de la molécule hybride apparaissent à $\delta=18,7$ ppm (CH₃) et à $\delta=53,3$ ppm (C6). Dans les champs faibles apparait le pic caractéristique de la fonction cétone à $\delta=187,2$ ppm (C11'). Les résultats enregistrés du spectre RMN du carbone-13 pour le composé hybride **6c** sont résumés dans le tableau I.33.

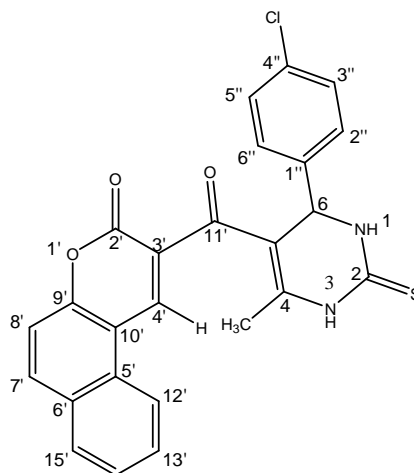
Tableau I.33: Résultats du spectre RMN du carbone du composé **6c**

C _n	δ (ppm)	C _n	δ (ppm)
C ₇	18,7	C _{7'}	129,0
C ₆	53,3	C _{5'}	130,0
C _{10'}	109,2	C _{4''}	134,8
C _{8'}	112,6	C _{3'}	138,2
C ₅	116,4	C _{1''}	143,0
C _{12'}	122,2	C _{4'}	151,4
C _{14'}	122,6	C ₂	151,6

C _{13'}	123,5	C _{9'}	153,6
C _{2'',6''}	124,6	C ₄	154,6
C _{6'}	126,4	C _{2'}	158,0
C _{15'}	126,9	C _{11'}	187,2
C _{3'',5''}	128,4		

IV-3-4- Composé 4-(4-chlorophényl) -6-méthyl- 5-(3-oxo-3*H* benzo[f] chromène-2-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-thione (**6d**)

En travaillant dans les mêmes conditions opératoires que celles décrites précédemment et en présence de la thiourée et du 4-chlorobenzaldéhyde on obtient le composé : 4-(4-chlorophényl)-6-meéthyl-5-(3-oxo-3*H*-benzo[f]chromène-2-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-thione **6d**.



4-(4-chlorophényl) -6-méthyl- 5-(3-oxo-3*H*-benzo[f]chromène-2-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-thione **6d**

A- Etude par spectrométrie de masse (MS-ESI⁺)

Le spectre de masse réalisé par la LC-MS en mode ESI(+) montre un pic à $m/z = 483$ [100, (M+Na)⁺, ³⁵Cl], un autre à $m/z = 485$ [38, (M+Na)⁺, ³⁷Cl] pics isotopiques du chlore et à $m/z = 500$ [75, (M+K)⁺, ³⁵Cl], à $m/z = 502$ [10, (M+K)⁺, ³⁷Cl], ce qui confirme la formule brute C₂₅H₁₇ClN₂O₃S du composé **6d**.

B- Etude par spectroscopie RMN du ¹H

Comme pour les produits **6a-c**, les pics du groupement acétoacétyle sont absents à savoir le OH énoïque, le =CH cétoénoïque et le CH₂ dicéto. L'apparition des pics à $\delta = 2,12$ ppm (s, 3H) attribuable aux trois protons identiques de CH₃, à $\delta = 5,32$ ppm (d, 1H)

correspondant au proton éthylénique H (6), et dans le domaine des champs faibles, un pic à $\delta = 10,0$ ppm (d, 1H, NH-1) et un autre à $\delta = 10,64$ ppm (s, 1H, NH-3) caractéristique de la DHPM ce qui confirme la formation de cette dernière.

Nous observons aussi les pics caractéristiques des protons aromatiques et les pics de la benzocoumarine qui sont conservés. Dans le tableau I.34, nous reportons l'ensemble des résultats enregistrés.

Tableau I.34: Résultats du spectre RMN ^1H du composé **6d**

δ (ppm)	Multiplicité	Attribution
2,12	s, 3H	CH ₃
5,32	d, 1H J=3,5Hz	H6
7,27	d, 1H J=8,8Hz	H8'
7,41	d, 1H J=8,4Hz	H3'',5''
7,47	t, 1H J=8,8Hz	H7'
7,60	t, 1H J=8,8Hz	H6'
7,79	d, 1H J=8,8Hz	H5'
8,27	d, 1H J=7,8Hz	H2'',6''
8,55	d, 1H J=8,7Hz	H9'
8,88	d, 1H J=8,7Hz	H10'
9,40	s, 1H	H4'
10,00	d, 1H J=3,5Hz	NH-1
10,64	s, 1H	NH-3

C- Etude par spectroscopie RMN du ^{13}C

Sur le spectre RMN du carbone-13 apparaît un pic à $\delta = 191,4$ ppm caractéristique du carbonyle (C=O, C-11') et à $\delta = 53,3$ ppm apparaît un pic caractéristique d'un groupement méthylène en C6, nous observons aussi un pic à $\delta = 18,4$ ppm correspondant à un groupement méthyle CH₃ différent des pics caractéristique du groupement acétoacétyle et confirmant la formation de **6d**.

Dans le tableau I.35, nous reportons les résultats du spectre RMN du carbone-13 enregistrés qui confirme la formation du composé **6d**.

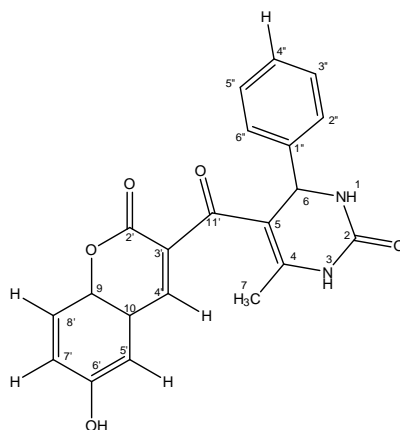
Tableau I.35: Résultats du spectre RMN ^{13}C du composé **6d**

C_n	δ (ppm)	C_n	δ (ppm)
C_7	18,4	$\text{C}_{1''}$	129,4
C_8	53,3	$\text{C}_{5'}$	129,8
$\text{C}_{10'}$	110,0	$\text{C}_{4''}$	131,6
C_5	112,4	$\text{C}_{3'}$	136,9
$\text{C}_{12'}$	116,3	$\text{C}_{4'}$	141,1
$\text{C}_{14'}$	118,4	C_9	154,5
$\text{C}_{13'}$	121,5	$\text{C}_{2'}$	157,3
$\text{C}_{2'',6''}$	126,6	C_4	168,6
$\text{C}_{15'}$	127,8	$\text{C}_{2'}$	173,7
$\text{C}_{3'',5''}$	128,1	$\text{C}_{11'}$	191,4
$\text{C}_{6'}$	128,5		
$\text{C}_{7'}$	129,0		

IV-4- Composé 5-(6-hydroxy-2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-6-méthyl-4-phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (**7**)

En suivant le même concept que les synthèses précédentes, et en travaillant dans les mêmes conditions opératoires, il nous a semblé intéressant de changer la position de OH de l'acétoacétylcoumarine pour comparer le rendement, le temps de la réaction ainsi que l'influence de la position du OH, sa présence et son absence sur l'activité biologique.

Un mélange équimolaire de **1d** et de benzaldéhyde **2** est porté au reflux en présence de 1,5 équivalents d'urée dans l'acétonitrile comme solvant et quelques gouttes de H_2SO_4 comme catalyseur. Après 18 heures de chauffage, de l'eau distillée glacée est ajoutée au mélange, un précipité s'est formé, filtré lavé avec de l'eau et recristallisé pour obtenir le produit **7**.



5-(6-hydroxy-2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-6-méthyl-4-phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one: **7**

A- Etude par spectrométrie de masse (MS-ESI(+))

Le spectre de masse montre un pic moléculaire à $m/z=377$ correspondant à l'ion moléculaire $(M+H)^+$ avec une intensité de 60%, et un autre pic à $m/z=399$ (32%) correspondant à l'ion moléculaire $(M+Na)^+$, ce qui correspond à la formule brute $C_{21}H_{16}N_2O_5$.

B- Etude par spectroscopie RMN du 1H

Le spectre RMN du 1H montre des signaux, à $\delta=2,08$ ppm (s, 3H) correspondant aux 3H équivalents de CH_3 , à $\delta=5,29$ ppm (d, 1H) correspondant au groupement méthylène H6 et à $\delta=9,58$ et 9,90 ppm apparaissent les pics de NH-1 et NH-3 de la DHPM.

Les protons du noyau aromatique apparaissent comme multiplet entre 7,14-7,35 ppm (m, H-2'', 3'', 4'', 5'', 6''). Et les pics caractéristiques du noyau chromène sont conservés par l'apparition à $\delta= 8.10$ ppm (s, 1H) du H4', les protons de la benzopyrone et OH(7') à $\delta=10,20$ ppm dans le domaine des champs faibles. L'ensemble des résultats sont donnés dans le tableau I.36.

Tableau I .36: Résultats du spectre RMN 1H à 300 MHz du composé **7**

δ (ppm)	Multiplicité	Attribution
2,08	s, 3H	$CH_3(7)$
5,29	d, 1H $J=3,4$ Hz	H6
7,14-7,35	m, 8H	H2'', 6'', 4'', 3'', 5'', H5', H7', H8'
8,10	s, 1H	H4'
9,58	d, 1H $J=3,4$ Hz	NH-1
9,90	s, 1H	NH-3
10,20	S	OH(7')

C- Etude par spectroscopie RMN du ^{13}C

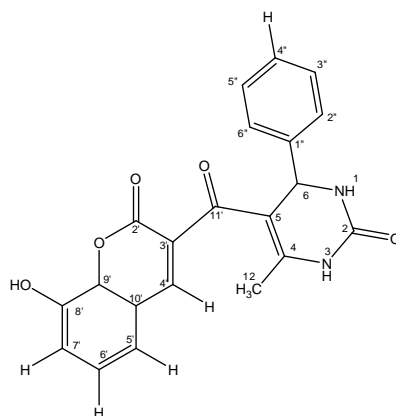
Comme dans le cas des produits précédents, on observe la disparition des pics du groupement acétoacétyle et l'apparition des pics de la molécule hybride. Le déplacement chimique du carbone de la cétone reliant les deux hétérocycles DHPM et coumarine à $\delta=187,3\text{ppm}$ est différent de celui de l'acétoacétylecoumarine, de même la conservation des pics de la benzopyrone et l'apparition des pics des deux groupements $-\text{NH}$, de H_6 et de CH_3 de la DHPM confirment aussi la formation de la molécule hybride **7**. L'ensemble des résultats sont données dans le tableau I.37.

Tableau I.37: Résultats du spectre RMN du carbone-13 du composé **7**

C_n	δ (ppm) du ^{13}C
C_7	18,4
C_6	53,5
C_{10}	110,7
C_9	119,1
$\text{C}_{5'}$	126,2
C_5	127,3
$\text{C}_{7'}$	128,3
$\text{C}_{4''}$	129,2
$\text{C}_{2''},6''$	134,9
$\text{C}_{8'}$	137,3
$\text{C}_{3''},5''$	142,1
C_3	143,3
C_1	144,3
C_2	147,9
C_4	152,1
$\text{C}_{2'}$	157,7
$\text{C}_{6'}$	161,1
C_{11}	187,3

IV-5- Composé 5-(8-hydroxy-2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-6-méthyl-4- phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (**8**)

Un mélange équimolaire de **1e** et de benzaldéhyde **2** est porté au reflux en présence d'un 1,5 équivalent d'urée dans l'acétonitrile comme solvant et quelques gouttes de H_2SO_4 comme catalyseur. Après 18 heures de chauffage, de l'eau distillée glacée est ajoutée au mélange, un précipité s'est formé, filtré, lavé avec de l'eau et recristallisé pour obtenir le produit **8**.



5-(8-hydroxy-2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-6-méthyl-4-phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one 8

A- Etude par spectrométrie de masse (MS-ESI(+))

Le spectre de masse de **8** réalisé par la LC-MS en mode ESI (+) montre un pic à $m/z = 377$ (10) qui est le pic de l'ion moléculaire $(M+H)^+$. Nous observons un autre pic à $m/z = 399$ (55) correspondant à $(M+Na)^+$ confirmant ainsi la formule brute $C_{21}H_{16}O_5N_2$.

B- Etude par spectroscopie RMN du 1H

L'apparition dans le domaine des champs forts, d'un pic à $\delta = 2,08$ ppm (s, 3H) attribuable aux trois protons identiques de CH_3 , d'un doublet à 5,24 ppm affecté au proton H_6 d'une dihydropyrimidinone confirme la formation de ce noyau. Il apparaît un singulet attribué à $H_{4'}$ (8,73 ppm) caractéristique de la coumarine et deux autres signaux correspondant à $NH(1)$ et $NH(3)$ à $\delta = 9,58$ ppm et à $\delta = 9,80$ ppm respectivement.

Entre 7,00 ppm et 7,35 ppm apparaissent les pics caractéristiques du noyau aromatique et benzopyranone comme multiplets attribués aux $H_{2''}, 3'', 4'', 5'', 6''$, $H_{5'}$, $H_{7'}$ et $H_{6'}$. A $\delta = 9,96$ ppm apparaît un pic Large correspondant à $OH(8')$, et l'ensemble de ces résultats sont reportés dans le tableau I.38

Tableau I.38: Résultats du spectre RMN 1H du composé **8**

δ (ppm)	Multiplicité	Attribution
2,08	s, 3H	$CH_3(7)$
5,24	d, 1H $J=3,3Hz$	H_6
7,00-7,35	m, 8H	$H_{2''}, 6'', 4'', 3'', 5'', H_{5'}, H_{7'}, H_{6'}$
8,73	s, 1H	$H_{4'}$
9,58	d, 1H $J=3,3Hz$	NH-1
9,80	s, 1H	NH-3
9,96	S	OH-8'

C- Etude par spectroscopie RMN du ^{13}C

Sur le spectre RMN du carbone-13 nous remarquons la disparition des pics de l'acétoacétyl et l'apparition des pics caractéristique de la molécule hybride **8**, comme est la cas pour les autres molécules. Les résultats enregistrés confirmant la formation de **8** sont reportés dans le tableau I.39.

Tableau I.39 : Résultats du spectre RMN du carbone -13 du composé **8**

C_n	δ (ppm) du ^{13}C	C_n	δ (ppm) du ^{13}C	C_n	δ (ppm) du ^{13}C
CH_3	18,5	$\text{C4}''$	128,6	C4	154,1
C6	53,5	$\text{C2}''$, $\text{6}''$	134,9	$\text{C2}''$	157,6
$\text{C9}'$	110,8	$\text{C3}''$, $\text{5}''$	137,4	$\text{C8}'$	159,1
$\text{C10}'$	113,7	$\text{C5}'$	143,8	$\text{C11}'$	187,3
$\text{C7}'$	116,9	$\text{C3}'$	146,9		
C5	126,3	$\text{C1}''$	147,9		
$\text{C6}'$	126,9	C2	152,2		

V- Conclusion

En conclusion, dans ce travail nous avons montré que la réaction à trois composants des dérivés 3-acétoacétylcoumarines **1a-e**, des dérivés du benzaldéhydes substitués en para **2**, et de l'urée / thiourée **3**, catalysée par l'acide sulfurique permet la synthèse avec de bon rendements d'une nouvelles série en une seule étape de 4-aryl-6-méthyl-5-(2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones / thiones **4a-e**, **5a-d**, **6a-d**, **7**, et **8**.

Le mécanisme de la réaction de Biginelli ainsi que la structure des synthons utilisés suggèrent la formation possible de deux composés de type dihydropyrimidinones / thiones. Cependant, avec l'élucidation des produits obtenus, nous avons montré que la cyclisation s'est faite au niveau du carbone du carbonyle le plus électrophile.

Partie expérimentale

I-Généralités

I-1- Appareillage et techniques analytiques

Les points de fusion sont déterminés par un appareil scientifique SPM3 équipé d'un microscope. Les spectres RMN ^1H et ^{13}C sont réalisés dans un appareil spectromètre BRUKER Avance 300, carbone : 75.47 MHz et proton : 300.13 MHz, dans le DMSO- d_6 et le CDCl_3 comme solvants et le TMS comme référence interne. Les valeurs des déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au signal du TMS. Une haute résolution en spectrométrie de masse a été réalisée pour tous les composés. Les attributions des ^{13}C sont réalisées en utilisant les couplages à 2D, JC/H à longues distances (HSQC et HMBC) et les structure par le couplage H/H (NOESY). Une haute résolution en spectrométrie de masse a été réalisée pour tous les composés. Les spectres de masse sont obtenus par la l'analyse en MS-ESI, les échantillons sont introduits par électrospray et infusion directe (Ils sont solubilisés dans un mélange dichloromethane/méthanol/eau en présence d'acide formique).

Les analyses en chromatographie sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur des plaques de gel de silice de type 60 F 254 (Merck) et éventuellement révélées sous une lampe UV. Les noms des composés chimiques sont donnés selon la nomenclature de l'IUPAC.

I-2- Matériels

Pour la synthèse, le toluène utilisé est celui de Fluka et l'acétonitrile est de Sigma Aldrich. Les aldéhydes aromatiques utilisés sont commerciaux.

II- Manipulations

II-1 Synthèse des dérivés 3-acétoacétylcoumarines

a- Voie conventionnelle

Dans un ballon de 250 ml, on introduit 2,5 g (0,020 mole) de TAL et 50 ml de toluène puis on additionne 0,02 mole d'aldéhyde aromatique α - hydroxylé et 0,5 ml de triéthylamine.

A froid la TAL est partiellement soluble et à chaud elle se dissout complètement. On met au reflux pendant 1 heure et 30 mn, il se forme un précipité jaune à chaud, on filtre. Le produit est lavé avec du méthanol chaud et on récupère un produit jaune pure.

b- Sous irradiation dans un four à micro-onde avec un minimum de solvant

Dans un ballon de 100 ml, on introduit 1,26 g (0,01 mole) de TAL et 5 ml de toluène puis on additionne 0,01 mole d'aldéhyde aromatique α - hydroxylé et 0,25 ml de triéthylamine.

A froid la TAL est partiellement soluble et à chaud elle se dissout complètement. On met le mélange réactionnel dans un four à micro-ondes à une énergie de 100W dont le reflux n'est pas nécessaire, la température de fin de réaction est mentionnée dans le tableau I.40. Il se forme un précipité jaune à chaud, lavé avec du méthanol chaud ne nécessite pas la recristallisation.

Tableau I.40: Résultats des deux différentes voies de synthèse des produits 1a-d

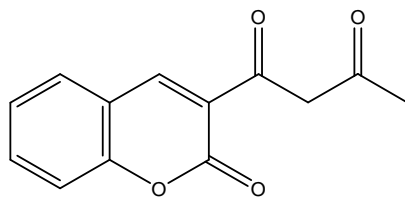
Réactif	N° du produit obtenu	Temps [T °C]		Rendement (%)		Pf °C	Pf °C Litt
		a[Reflux]	b[MO, 100W]	A	b		
Salicylaldéhyde	1a	90mn	10mn[48°C]	70	60	150	150[66,67]
2,4-dihydroxy benzaldéhyde	1b	90mn	10mn[49°C]	70	70	215	215[66,67]
2-hydroxy naphaldéhyde	1c	90mn	10mn[41°C]	86	87	201	201[66,67]
2,3-dihydroxy benzaldéhyde	1d	90mn			54	232	232[66,67]

a : Voie conventionnelle

b : Sous irradiation aux micro-ondes avec solvant à 100 W

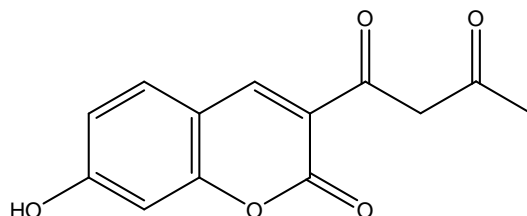
II-2- Résultats spectroscopiques

1-(2-oxo-2H-chromèn-3-yl) butane-1, 3-dione (1a)

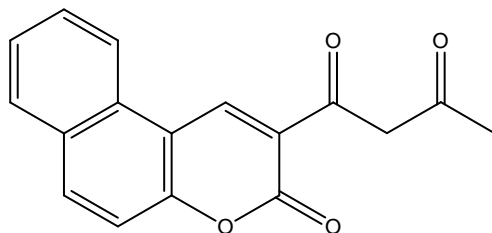


Ce composé est obtenu sous forme de cristaux Jaunes, Pf = 150°C; Rdt= 59% masse (2.95 g). **RMN ¹H (CDCl₃)**: δ 2.26 (s, 3H, 14-CH₃, dicétone), 2.35 (s, 3H, 14-CH₃, céto-énolique), 4.22 (s, 2H, 12-CH₂, dione), 7.01 (s, 1H, 12-CH, enol), 7.31 (d, 1H, H-8), 7.34 (t, 1H, H-6), 7.60 (t, 1H, H-7), 7.65 (d, 1H, H-5), 8.63 (s, 1H, H-4), 15.85 (s, large, 1H, OH, éno). **RMN ¹³C (CDCl₃)**: 27.45 (14-CH₃), 56.34 (12-CH₂, dione), 101.49 (12-CH, éno), 116.44 (C-8), 118.40 (C-6), 120.46 (C-5), 124.84 (C-10), 129.46 (C-7), 133.87 (C-3), 145.33 (C-9), 154.27 (C-4), 157.90 (C-9), 171.83 (C-2), 191.4 (C-13, éno), 199.61 (C-11), 202.94 (C-13, cétone). **Ms (ESI)⁺**: m/z (% intensité relative): m/z =253 (100%)[M+Na]⁺, m/z=254 (10%)[M+H+Na]⁺. **IR v (cm⁻¹)**: 3479-2250-1617.3-1381-1048-753.83. **UV-vis**: λ_{abs1} = 290 nm (C=O) et λ_{abs2} = 350 nm (OH, éno).

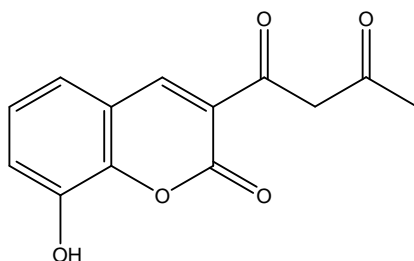
1-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl) butane-1,3-dione (1b)



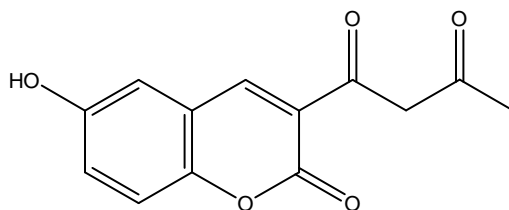
Ce composé est obtenu sous forme d'une poudre Jaune, Pf= 215-217 °C; Rdt = 51% (2.05 g). **RMN ¹H (DMSO-D₆)**: δ 2.20 (s, 3H, 14-CH₃), 4.10 (s, 2H, 12-CH₂, dione), 6.74 (s, 1H, 12-CH, éno), 6.83 (s, 1H, H-8), 6.85 (d, 1H, H-6), 7.77 (d, 1H, H-5), 8.72 (s, 1H, H-4), 11.16 (Large, 1H, OH-7), 16.26 (s, large, OH, céto-énolique); **RMN ¹³C (DMSO-D₆)**: 26.59 (14-CH₃), 56.51 (12-CH₂, dione), 100.04 (CH-12,éno), 101.71 (C-8), 110.85 (C-6), 114.28 (C-10), 132.26 (C-5), 146.65(C-3), 156.55 (C-9), 157.83 (C-7), 164.22 (C-4), 174.80 (C-2), 191,41 (C-13, éno), 197.56 (C-11), 203.36 (C-13, diones). **Ms (ESI)**: m/z (% intensité relative): m/z =269 (100%) [M+Na]⁺, m/z=247 (10%)[M+H]⁺. **IR v (cm⁻¹)**: 3470-2250-1650; **UV-vis**: λ_{abs1} = 280 nm (C=O) et λ_{abs2} = 383 nm (OH, éno).

1-(3-oxo-3H-benzo[f]chromen-2-yl) butane-1, 3-dione (1c)

Ce composé est obtenu sous forme de cristaux oranges, Pf = 202 °C ; Rdt= 60 % (3,16 g); **RMN¹H** (CDCl₃): δ 2.27 (s, 3H, 14-CH₃) , 4.26 (s, 2H, 12-CH₂, dione), 7.06 (s, 1H, 12-CH, énoI), 7.39 (d, 1H, H-8), 7.55 (t, 1H, H-16), 7.68 (t, 1H, H-17), 7.87 (d, 1H, H-7), 8.02 (d, 1H, H-15), 8.29 (d, 1H, H-18), 9.31 (s , 1H ,H-4), 16.00 (s, large ,1H, OH, énoI); **RMN¹³C** (CDCl₃): 27.37 (14-CH₃), 57.00 (12-CH₂ , dione), 101.38 (12-CH, énoI), 112.90 (CH-10), 116.36 (CH-8), 118.82 (CH-18), 121.61 (C-16), 126.51 (C-17), 128.98 (C-15), 129.08 (C-6), 129.30 (C-7) , 130.14 (C-3), 135.66 (C-5), 140.77 (C-4) , 154.79 (C-9), 158.02 (C-2) , 172.5 (C-11) , 199.31 (C-13, enol), 199.8 (C-13, dione); **ms (ESI)**: m/z (% intensité relative): m/z = 303 (100%)[M+Na]⁺, m/z=281 (10%) [M+H]⁺, m/z= 304 (10%) [M+H+Na]⁺. **IR v** (Cm⁻¹): 3470-2250-1750; **UV-vis**: λ_{abs1} = 268 nm (C=O) et λ_{abs2} = 401 nm (OH, énoI).

1-(8-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-3-yl) butane-1, 3-dione (1d)

Ce composé est obtenu sous forme d'une poudre Jaune , Pf= 232°C ; Rdt = 54% masse (2.85 g) ; **RMN¹H** (DMSO-D₆): δ 2.22 (S, 3H, 14-CH₃) , 4.16 (S, 2H, 12-CH₂, diones), 6.89 (S, 1H, 12-CH, enol), 7.18 (d, 1H, H-7) , 7.20 (t, 1H, H-6), 7.34 (d, 1H, H-5),8.72 (S , 1H, H-4), 10.40 (S, 1H, OH-8) , 16.02 (S large ,1H, OH,céto-enolique) ; **RMN¹³C** (DMSO-D₆): 27.03 (14-CH₃,diones) ,30.42 (14-CH₃ ,céto-enolique), 56.49 (12-CH₂ , dione), 100.96 (12-CH, enol), 119.22 (C-7), 120.23 (C-5), 124.93 (C-6),142.61(C-3), 144.38 (C-9), 146.51 (C-8), 157.29(C-4), 173.05 (C-2), 191.83 (C-13, enol), 199.02 (C-11) ,203.35 (C-13, diones); **IR v** (cm⁻¹) : 3500-2260-1750-1381-1048-753.83; **UV-vis**: λ_{abs} = 354 nm (OH, énoI).

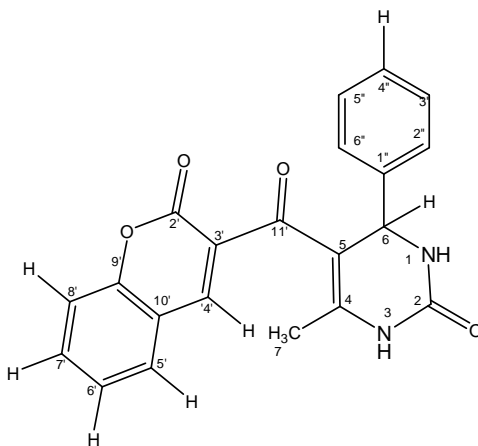
1-(6-hydroxy-2-oxo-2H-chromèn-3-yl) butane-1, 3-dione (1e)

Ce composé est obtenu sous forme d'une poudre Jaune, Pf=240°C; Rendement = 70 %

UV-vis: $\lambda_{\text{abs1}} = 342 \text{ nm}$ (OH, éno). IR ν (cm^{-1}) : 3205 – 3050- 2737-1723 - 1300- 818

II-3- Synthèse des 4-aryl-6-méthyl-5-(2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2 (1H)-ones / thiones (4a-e, 5a-d, 6a-d, 7, et 8) :

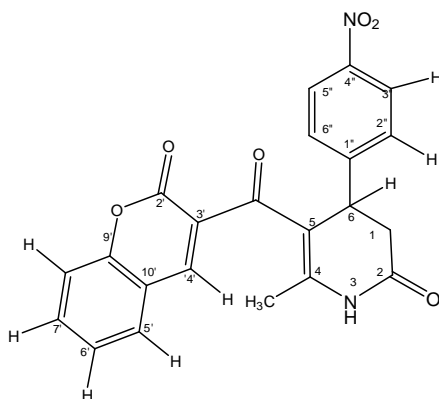
Un mélange approprié de 3-acétoacétylcoumarines **1** (1 mmol), benzaldéhydes **2** (1 mmol), de l'urée / thiourée **3** (1,5 mmol), et de l'acide sulfurique concentré (20 gouttes) dans 10 ml d'acétonitrile a été agité et chauffé au reflux pendant une durée de temps appropriée (12-18 h). Après achèvement de la réaction, comme indiqué par la Chromatographie sur couche mince (CCM), (en utilisant un mélange CHCl_3 / méthanol 1: 4 comme éluant), le mélange a été refroidi à température ambiante, puis de la glace et de l'eau ont été ajoutés pour former le produit. Le solide a été séparé par filtration et lavé avec de l'eau froide, séché, lavé avec de l'éther diéthylique et recristallisé dans l'éthanol ou l'acétate d'éthyle.

II-4- Résultats spectroscopiques**6-méthyl-5-(2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-4-phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (4a)**

Ce produit est obtenu sous forme d'une poudre orange avec un Rdt=72% (260 mg). Pf=130-133°C ; RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300.13 MHz): $\delta = 2.09$ (s, 3H, CH₃), 5.26 (d, 1H, J 3.4

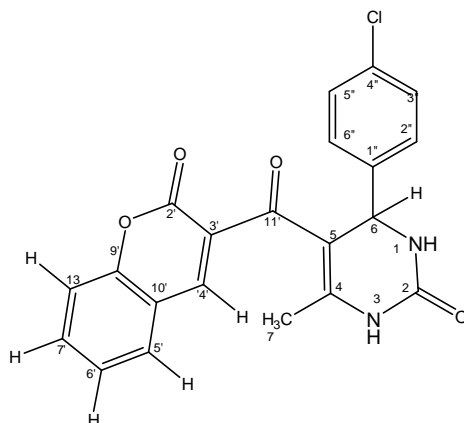
Hz, H-6), 7.22e7.51 (m, 5H, H-200,300,400,500,600), 7.58e7.94 (m, 4H, H-50,60,70,80), 7.97 (s, 1H, H-40), 8.01 (d, 1H, J 3.4 Hz, NH-1), 9.54 (s, 1H, NH-3); **RMN** ^{13}C (DMSO-d₆, 75.47 MHz): δ =18.6 (CH₃), 53.8 (C-6), 109.4, 116.1, 118.3, 119.8, 124.9, 125.1, 126.3, 127.3, 128.4, 134.5, 143.8,146.1, 151.7,153.3,157.8,173.0,187.0 (C=O, cétone); **MS (ESI+)**: m/z 383 (100) [M+Na]⁺, 361 (85) [M+H]⁺. **Anal. Element. Calc** pour C₂₁H₁₆N₂O₄: C 69.99, H 4.48, N 7.77. Trouvées: C 69.79, H 4.54, N 7.65%.

6-méthyl-4-(4-nitrophényl)-5-(2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (4b)



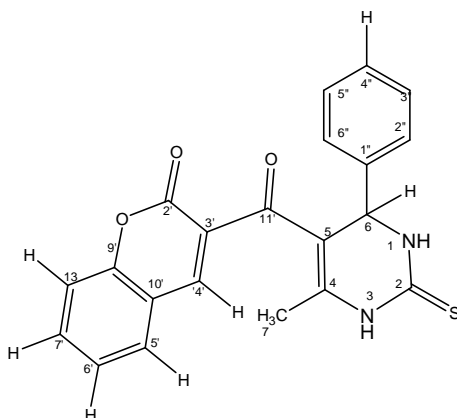
Ce produit est obtenu sous forme d'une poudre jaune avec un Rdt=52% (210 mg). Pf=260°C ; **RMN** ^1H (DMSO-d₆, 300.13 MHz): δ 2.08 (s, 3H, CH₃), 5.42 (d, J 3.4 Hz, 1H, H-6), 7.36 (t, 1H, J 8.9 Hz, H-6'), 7.43 (d, 1H, J 8.9 Hz, H-8'), 7.54 (d, 1H, J 8.9 Hz, H-5'), 7.68 (t, 1H, J 8.9 Hz, H-7'), 7.77 (d, 2H, J 8.6 Hz, H-2'',6''), 8.10 (d, 1H, J 3.4 Hz, NH-1), 8.16 (s, 1H, H-4'), 8.22 (d, 2H, J 8.6 Hz, H-3'',5''), 9.69 (s, 1H, NH-3); **RMN** ^{13}C (DMSO-d₆, 75.47 MHz): δ 18.7 (CH₃), 53.9 (C-6), 109.2, 116.1, 118.1, 123.4, 124.8, 127.6,128.0, 129.6, 133.1, 144.9, 145.6, 146.7, 150.9, 153.4, 157.5, 173.1, 187.5 (C=O, cétone); **MS (ESI+)**: m/z 428 (100) [M+Na]⁺, 406 (23) [M+H]⁺. **Anal. Élément. Calc** pour C₂₁H₁₅N₃O₆: C 62.22, H 3.73, N 10.37. Trouvées: C 62.42, H 3.67, N 10.25%.

4-(4-chlorophenyl)-6-méthyl-5-(2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (4c)



Ce produit est obtenu sous forme d'une poudre Jaune avec un Rdt=43% (170 mg) (recristallisé avec l'éthanol) Pf=134°C ; **RMN ¹H** (DMSO-d₆, 300.13 MHz): δ 2.08 (s, 3H, CH₃), 5.27 (d, 1H, *J* 3.3 Hz, H-6), 7.26 (d, 2H, *J* 8.7 Hz, H-3'',5''), 7.38 (d, 1H, *J* 8.9 Hz, H-8'), 7.40 (t, 1H, *J* 8.9 Hz, H-6'), 7.68 (t, 1H, *J* 8.9 Hz, H-7'), 7.75 (d, 1H, *J* 8.7, H-2'',6''), 7.96 (d, 1H, *J* 8.9 Hz, H-5'), 8.06 (s, 1H, H-4'), 8.84 (d, 1H, *J* 3.3 Hz, NH-1), 9.59 (s, 1H, NH-3); **RMN ¹³C** (DMSO-d₆, 75.47 MHz): δ 18.6 (CH₃), 53.2 (C-6), 101.0, 109.2, 116.3, 118.3, 124.9, 128.3, 128.6, 129.0, 134.5, 142.4, 142.9, 146.1, 151.6, 153.5, 157.8, 173.0, 186.9 (C=O, cétone); **MS (ESI⁺)**: *m/z* 417 (100) [M+Na, ³⁵Cl]⁺, 419 (38) [(M+Na)⁺, ³⁷Cl], 395 (35) [(M+H)⁺, ³⁵Cl], 397(10) [(M+H)⁺, ³⁷Cl]. **Anal. Element. Calc** pour C₂₁H₁₅ClN₂O₄: C 63.89, H 3.83, Cl 8.98, N 7.10. Trouvées: C 63.79, H 3.63, Cl 8.78, N 7.22%.

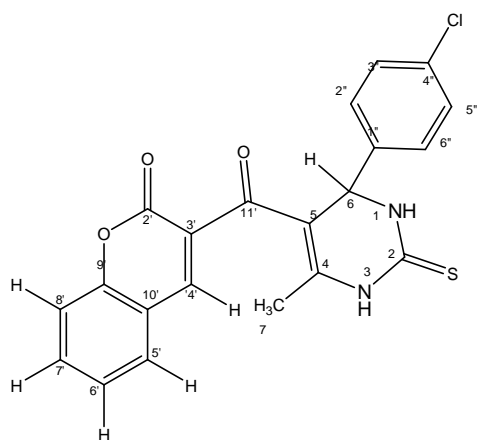
6-méthyl-5-(2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-4-phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-thione (4d)



Ce composé est obtenu sous forme d'une poudre de couleur rouge brique avec un Rdt =56% (210 mg) ; Pf=140-145°C (recristallisé dans l'acétate d'éthyle). **RMN ¹H** (DMSO-d₆,

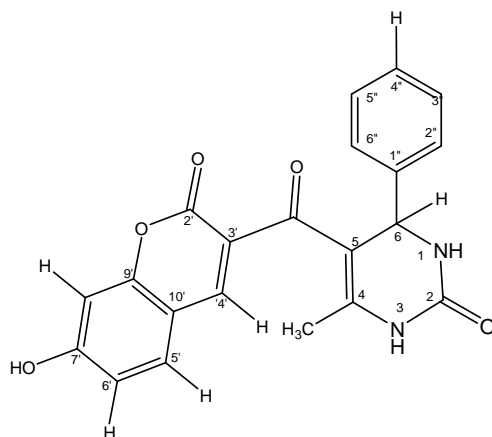
300.13 MHz): δ 2.09 (s, 3H, CH_3), 5.26 (d, 1H, J 3.5 Hz, H-6), 6.75-7.17 (m, 5H, H-2'',3'',4'',5'',6''), 7.21-7.83 (m, 4H, H-5',6',7',8'), 8.35 (s, 1H, H-4'), 8.62 (d, 1H, J 3.5 Hz, NH-1), 10.02 (s, 1H, NH-3); **RMN** ^{13}C (DMSO- d_6 , 75.47 MHz): δ 18.6 (CH_3), 51.9 (C-6), 101.8, 110.9, 114.6, 126.2, 127.3, 129.2, 129.5, 140.9, 141.0, 147.0, 148.0, 150.5, 157.4, 164.8, 168.3, 174.0, 191.3 (C=O, cétone); **MS (ESI $^+$)**: m/z 416 (100) $[M+K]^+$, 377 (25) $[M+H]^+$. **Anal. Element. Calc** pour $C_{21}H_{16}N_2O_3S$: C 67.00, H 4.28, N 7.44, S 8.52. Trouvées: C 67.20, H 4.18, N 7.34, S 8.72%.

4-(4-chlorophényl)-6-méthyl-5-(2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-thione (4e)



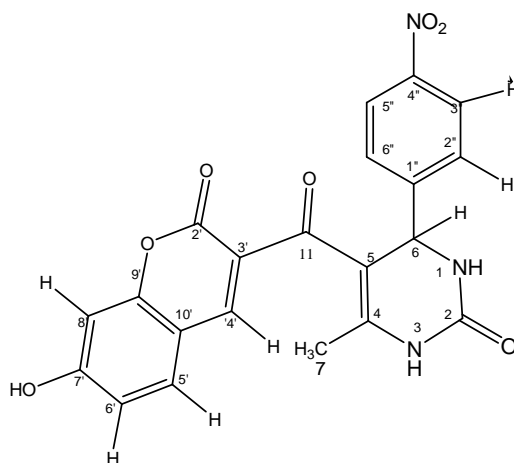
Ce produit est obtenu sous forme de poudre jaune avec un Rdt=51% (210 mg) ; Pf=180-185°C (recristallisé dans l'acétoacétate d'éthyle). **RMN** 1H (DMSO- d_6 , 300.13 MHz): δ 2.10 (s, 3H, CH_3), 5.35 (d, 1H, J 3.5 Hz, H-6), 7.25 (d, 2H, J 8.5 Hz, H-3'',5''), 7.42 (d, 1H, J 8.9 Hz, H-8'), 7.48 (d, 1H, J 8.5 Hz, H-2'',6''), 7.72 (t, 1H, J 8.9 Hz, H-6'), 7.87 (d, 1H, J 8.9 Hz, H-5'), 7.95 (t, 1H, J 8.9 Hz, H-7'), 8.40 (s, 1H, H-4'), 8.67 (d, 1H, J 3.5 Hz, NH-1), 8.84 (s, 1H, NH-3); **RMN** ^{13}C (DMSO- d_6 , 75.47 MHz): δ 18.3 (CH_3), 54.2 (C-6), 105.7, 116.3, 118.5, 120.7, 122.9, 127.8, 129.8, 132.9, 133.9, 136.4; 139.1, 144.5, 150.8, 158.6, 164.4, 174.5, 188.1 (C=O, cétone); **MS (ESI $^+$)**: m/z 434 (50) $[(M+Na)^+, ^{35}Cl]$, 436 (25) $[(M+Na)^+, ^{37}Cl]$, 451 (75) $[(M+K)^+, ^{35}Cl]$, 453 (45) $[(M+K)^+, ^{37}Cl]$. **Anal. Element. Calc** pour $C_{21}H_{15}ClN_2O_3$. Found: C 61.59, H 3.80, Cl 8.83, N 6.65, S 7.65%.

5-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-6-méthyl-4-phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(H)-one (5a)



Ce produit est obtenu sous forme de poudre Jaune, Rdt=82% (310 mg), Pf=240°C. **RMN ¹H** (DMSO-d₆, 300.13 MHz): δ 2.04 (s, 3H, CH₃), 5.21 (d, 1H, *J* 3.3 Hz, H-6), 6.74 (s, 1H, H-8'), 6.79 (d, 1H, *J* 8.6 Hz, H-6'), 7.21-7.30 (m, H-2'',3'',4'',5'',6''), 7.55 (d, 1H, *J* 8.6 Hz, H-5'), 7.90 (s, 1H, H-4'), 7.92 (d, 1H, *J* 3.3 Hz, NH-1), 9.39 (s, 1H, NH-3), 11.06 (s, OH-7'); **RMN ¹³C** (DMSO-d₆, 75.47 MHz): δ 18.4 (CH₃), 53.9 (C-6), 101.8, 110.8, 111.4, 113.8, 124.9, 128.4, 128.7, 134.6, 144.3, 146.8, 151.9, 152.4, 156.1, 158.3, 162.7, 187.8 (C=O, cétone); **MS (ESI⁺)**: *m/z* 399 (100) [M+Na]⁺, 377 (60) [M+H]⁺. **Anal. Element. Calc** pour C₂₁H₁₆N₂O₅: C 67.02, H 4.28, N 7.44 ; Trouvées: C, 67.22, H 4.40, N 7.385.

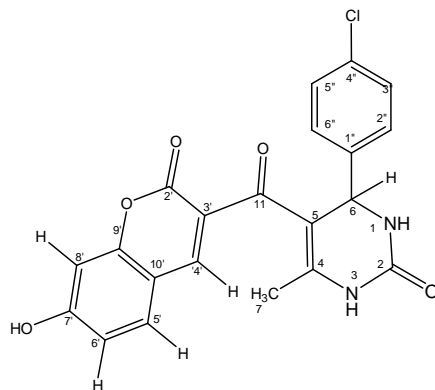
5-(7-Hydroxy-2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-6-méthyl-4-phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (5b)



Ce produit est obtenu sous forme d'une poudre jaune avec un Rdt = 43% (180 mg), Pf = 235°C. **RMN ¹H** (DMSO-d₆, 300.13 MHz): δ 2.05 (s, 3H, CH₃), 5.38 (d, 1H, *J* 3.3 Hz, H-

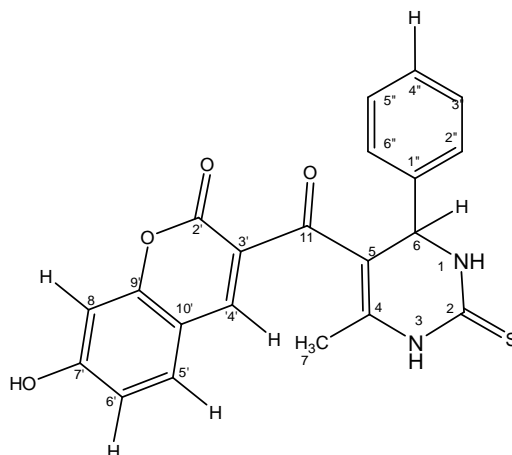
6), 6.75 (s, 1H, H-8'), 6.80 (d, 1H, J 8.5, H-6'), 7.52 (d, 2H, J 8.6 Hz, H-2'',6''), 7.59 (d, 2H, J 8.6 Hz, H-5'), 8.02 (s, 1H, H-4'), 8.11 (d, 1H, J 3.3 Hz, NH-1), 8.17 (d, 1H, J 8.7 Hz, H-3'',5''), 9.58 (s, 1H, NH-3), 10.92 (OH-7'); **RMN** ^{13}C (DMSO- d_6 , 75.47 MHz): δ 18.5 (CH_3), 53.7 (C-6), 102.0 (C-8'), 109.0 (C-5), 110.8 (C-4'a), 113.8 (C-6'), 123.7 (C-3'',5''), 124.4 (C-3'), 127.7 (C-2'',6''), 131.1 (C-5'), 144.0 (C-4'), 146.7 (C-4''), 150.2 (C-2), 151.4 et 151.6 (C-4 et C-1''), 155.9 (C-8'a), 158.2 (C-2'), 162.7 (C-7), 187.6 (C=O, cétone); **MS (ESI $^+$)**: m/z 444 (100) $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 422 (60) $[\text{M}+\text{H}]^+$. **Anal. Element. Calc** pour $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_7$: C 59.86, H 3.59, N 9.97. Trouvées: C 59.68, H 3.70, N 9.75%.

4-(4-chlorophényl)-5-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-6-méthyl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (5c)



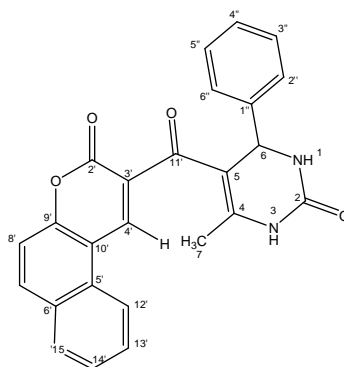
Ce produit est obtenu sous forme de poudre Jaune avec un Rdt = 51% (210 mg) ; Pf=135°C (recristallisé dans l'éthanol). **RMN** ^1H (DMSO- d_6 , 300.13 MHz): δ 2.05 (s, 3H, CH_3), 5.25 (d, 1H, J 3.3 Hz, H-6), 6.74 (s, 1H, H-8'), 6.86 (d, 1H, J 8.6 Hz, H-6'), 7.24 (d, 2H, J 8.3 Hz, H-3'',5''), 7.35 (d, 2H, J 8.3, H-2'',6''), 7.76 (d, 1H, J 8.7 Hz, H-5'), 8.09 (s, 1H, H-4'), 8.73 (d, 1H, J 3.3 Hz, NH-1), 9.47 (s, 1H, NH-3), 10.90 (OH-7'); **RMN** ^{13}C (DMSO- d_6 , 75.47 MHz): δ 18.5 (CH_3), 53.5 (C-6), 102.0, 109.5, 110.8, 113.7, 121.2, 124.4, 128.3, 131.8, 143.9, 146.6, 149.6, 151.7, 155.9, 158.2, 162.8, 187.6 (C=O, cétone); **MS (ESI $^+$)**: m/z 433 (100) $[(\text{M}+\text{Na})^+, ^{35}\text{Cl}]$, 435 (38) $[(\text{M}+\text{Na})^+, ^{37}\text{Cl}]$, 412 (40) $[(\text{M}+\text{H})^+, ^{35}\text{Cl}]$, 414 (15) $[(\text{M}+\text{H})^+, ^{37}\text{Cl}]$. **Anal. Element. Calc** pour $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_5$: C 61.40, H 3.68, Cl 8.63, N 6.82. Trouvées: C 61.62, H 3.88, Cl 8.80, N 6.58%.

5-(7-hydroxy-2-oxo-2*H*-chromène-3-carbonyl)-6-méthyl-4-phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(*H*)-thione (5d)



Ce produit est obtenu sous forme d'une poudre orange avec un Rdt=61% (240 mg) ; Pf=168-170°C (recristallisé dans l'acétoacétate d'éthyle) ; **RMN ¹H** (DMSO-d₆, 300.13 MHz): δ 2.08 (s, 3H, CH₃), 5.21 (d, 1H, *J* 3.5 Hz, H-6), 6.76 (s, 1H, H-8'), 6.84 (d, 1H, *J* 8.6 Hz, H-6'), 7.19-7.32 (m, H-2'',3'',4'',5'',6''), 7.78 (d, 1H, *J* 8.6 Hz, H-5'), 8.06 (s, 1H, H-4'), 8.68 (d, 1H, *J* 3.5 Hz, NH-1), 8.74 (s, 1H, NH-3), 11.16 (s, OH-7'); **RMN ¹³C** (DMSO-d₆, 75.47 MHz): δ 18.4 (CH₃), 54.2 (C-6), 101.7, 110.9, 113.8, 114.4, 126.3, 128.4, 132.2, 132.9, 142.8, 146.5, 148.4, 157.7, 157.9, 164.5, 174.7, 191.3 (C=O, cétone); **MS (ESI⁺)**: *m/z* 415 (10) [M+Na]⁺, 393 (100) [M+H]⁺. **Anal. Element. Calc** pour C₂₁H₁₆N₂O₅S: C 64.27, H 4.11, N 7.14, S 8.17. Trouvées: C 64.49, H 4.33, N 7.34, S 8.20%.

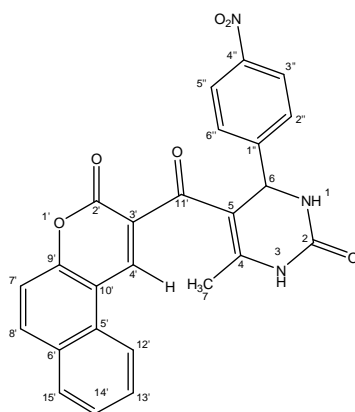
6-Méthyl-5-(3-oxo-3*H*-benzo[*f*]chromène-2-carbonyl)-4-phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-one (6a).



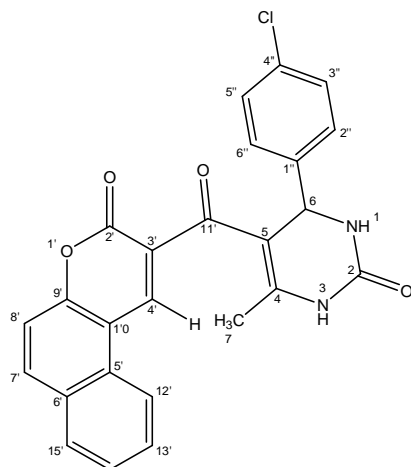
Ce produit est obtenu sous forme d'une poudre verte avec un Rdt=83% (340 mg); Pf=206°C (recristallisé dans l'acétoacétate d'éthyl). **RMN ¹H** (DMSO-d₆, 300.13 MHz): δ 2.11 (s, 3H, CH₃), 5.38 (d, 1H, *J* 3.5 Hz, H-6), 6.99-7.44 (m, 5H, H-2'',3'',4'',5'',6''), 7.60 (d, 1H, *J* 8.8 Hz, H-8'), 7.65 (t, 1H, *J* 8.8 Hz, H-7'), 7.72 (d, 1H, *J* 8.8 Hz, H-5'), 8.02 (t, 1H, *J*

8.8 Hz, H-6'), 8.14 (d, 1H, *J* 8.7 Hz, H-9'), 8.50 (d, 1H, *J* 8.7 Hz, H-10'), 8.94 (s, 1H, H-4'), 9.37 (d, 1H, *J* 3.5 Hz, NH-1), 9.62 (s, 1H, NH-3); **RMN** ¹³C (DMSO-d₆, 75.47 MHz): δ 18.4 (CH₃), 53.6 (CH₃), 110.6, 112.6, 116.1, 119.5, 126.3, 127.3, 128.4, 128.9, 129.0, 129.7, 134.2, 134.8, 137.6, 138.9, 143.8, 148.5, 152.2, 153.6, 157.8, 170.2, 187.3 (C=O, cétone); **MS** (**ESI**⁺): *m/z* 450 (100) [M+K]⁺, 411 (50) [M+H]⁺. **Anal. Element. Calc** pour C₂₅H₁₈N₂O₄: C 73.16, H 4.42, N 6.83. Trouvées: C 73.26, H 4.64, N 6.62%.

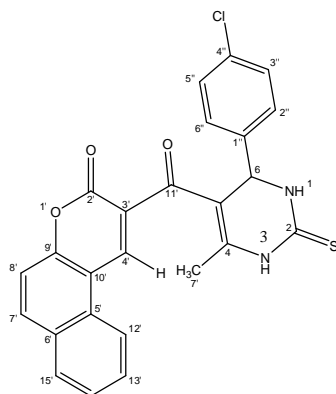
6-méthyl-4-(4-nitrophényl)-5-(3-oxo-3*H*-benzo[*f*]chromène-2-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-one (6b)



Ce produit est obtenu sous forme de produit jaune avec un Rdt=70% (320 mg); Pf=225°C (recristallisé dans l'éthanol). **RMN** ¹H (DMSO-d₆, 300.13 MHz): δ 2.13 (s, 3H, CH₃), 5.47 (d, 1H, *J* 3.3 Hz, H-6), 7.58 (d, 1H, *J* 8.7 Hz, H-9'), 7.61 (t, 1H, *J* 8.7 Hz, H-7'), 7.64 (d, 1H, *J* 8.1 Hz, H-2'',6''), 7.74 (t, 1H, *J* 8.7 Hz, H-6'), 8.06 (d, 1H, *J* 8.7 Hz, H-5'), 8.19 (d, 1H, *J* 7.8 Hz, H-9'), 8.27 (d, 1H, *J* 7.8 Hz, H-10'), 8.51 (d, 1H, *J* 8.1 Hz, H-3'',5''), 8.86 (s, 1H, H-4'), 9.32 (d, 1H, *J* 3.3 Hz, NH-1), 9.71 (s, 1H, NH-3); **RMN** ¹³C (DMSO-d₆, 75.47 MHz): δ 18.5 (CH₃), 53.5 (C-6), 108.8, 112.7, 116.4, 122.2, 122.6, 123.7, 126.3, 127.8, 128.6, 128.9, 129.9, 134.4, 138.5, 146.7, 151.3, 151.5, 151.8, 153.7, 157.9, 173.8, 187.1 (C=O, cétone); **MS** (**ESI**⁺): *m/z* 478 (100) [M+Na]⁺, 456 (35) [M+H]⁺. **Anal. Element. Calc** pour C₂₅H₁₇N₃O₆: C 65.93, H 3.76, N 9.23. Trouvées: C 65.84, H 3.88, N 9.29%.

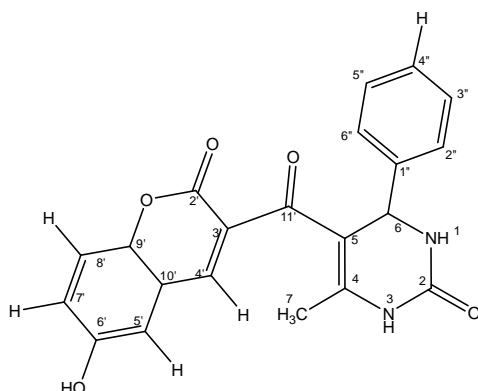
4-(4-Chlorophényl)-6-méthyl--5-(3-oxo-3H-benzo[f]chromène-2-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (6c)

Ce produit est obtenu sous forme d'une poudre jaune avec un Rdt=43% (190 mg); Pf=180-186°C (recristallisé dans l'éthanol). **RMN ¹H** (DMSO-d₆, 300.13 MHz): δ 2.13 (s, 3H, CH₃), 5.31 (d, 1H, *J* 3.2 Hz, H-6), 7.29 (d, 1H, *J* 8.6 Hz, H-3'',5''), 7.31 (d, 1H, *J* 8.6 Hz, H-8'), 7.34 (t, 1H, *J* 8.6 Hz, H-7'), 7.66 (t, 1H, *J* 8.6 Hz, H-6'), 8.25 (d, 1H, *J* 8.6 Hz, H-2'',6''), 8.34 (d, 1H, *J* 8.6 Hz, H-5'), 8.47 (d, 1H, *J* 7.9 Hz, H-9'), 8.56 (d, 1H, *J* 7.9 Hz, H-10'), 8.78 (s, 1H, H-4'), 9.35 (d, 1H, *J* 3.2 Hz, NH-1), 9.60 (s, 1H, NH-3); **RMN ¹³C** (DMSO-d₆, 75.47 MHz): δ 18.7 (CH₃), 53.3 (C-6), 109.2, 112.6, 116.4, 122.2, 123.5, 124.6, 126.4, 126.9, 128.4, 129.0, 130.0, 134.8, 138.2, 143.0, 151.4, 151.6, 153.6, 154.6, 158.0, 173.8, 187.2 (C=O, cétone); **MS (ESI⁺)**: *m/z* 467 (100) [(M+Na)⁺, ³⁵Cl], 469 (38) [(M+Na)⁺, ³⁷Cl], 445 (40) [(M+H)⁺, ³⁵Cl], 447 (15) [(M+H)⁺, ³⁷Cl]. **Anal. Element. Calc** pour C₂₅H₁₇ClN₂O₄: C 67.50, H 3.85, Cl 7.97, N 6.30. Trouvées: C 67.65, H 3.73, Cl 7.77, N 6.42%.

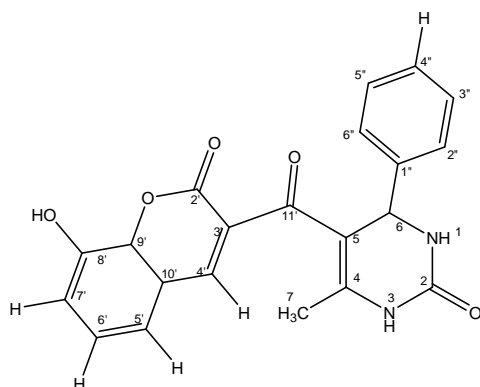
4-(4-Chlorophényl)-6-méthyl-5-(3-oxo-3H-benzo[f]chromène-2-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-thione (6d)

Ce produit est obtenu sous forme d'une poudre orange avec un Rdt=70% (320 mg); Pf=160°C (recristallisé dans l'acétoacétate d'éthyle). **RMN ¹H** (DMSO-d₆, 300 MHz): δ 2.12 (s, 3H, CH₃), 5.32 (d, 1H, *J* 3.5 Hz, H-6), 7.27 (d, 1H, *J* 8.8 Hz, H-8'), 7.41 (d, 1H, *J* 8.6 Hz, H-3'',5''), 7.47 (t, 1H, *J* 8.8 Hz, H-7'), 7.60 (t, 1H, *J* 8.8 Hz, H-6'), 7.79 (d, 1H, *J* 8.8 Hz, H-5'), 8.27 (d, 1H, *J* 7.8 Hz, H-2'',6''), 8.55 (d, 1H, *J* 8.7 Hz, H-9'), 8.88 (d, 1H, *J* 8.7 Hz, H-10'), 9.40 (s, 1H, H-4'), 10.00 (d, 1H, *J* 3.5 Hz, NH-1), 10.64 (s, 1H, NH-3); **RMN ¹³C** (DMSO-d₆, 75.47 MHz): δ 18.4 (CH₃), 53.3 (C-6), 110.0, 112.4, 116.3, 118.4, 121.5, 126.6, 127.8, 128.1, 128.5, 129.0, 129.4, 129.8, 131.6, 136.9, 141.1, 143.1, 154.5, 157.3, 168.6, 173.7, 191.4 (C=O, cétone); **MS (ESI⁺)**: *m/z* 483 (100) [(M+Na)⁺, ³⁵Cl], 485 (38) [(M+Na)⁺, ³⁷Cl], 500 (75) [(M+K)⁺, ³⁵Cl], 502 (10) [(M+K)⁺, ³⁷Cl], 461 (10) [(M+H)⁺, ³⁵Cl], 463 (5) [(M+H)⁺, ³⁷Cl]. **Anal. Element. Calc** pour C₂₅H₁₇ClN₂O₃S: C 65.14, H 3.72, Cl 7.69, N 6.08, S 6.96. Trouvées: C 65.36, H 3.67, Cl 7.73, N 6.12; S 6.78%.

5-(6-Hydroxy-2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-6-méthyl-4phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (7)



Ce produit est obtenu sous forme d'une poudre jaune avec un Rdt=93% (350 mg); Pf=225°C. **RMN ¹H** (DMSO-d₆, 300 MHz): δ 2.08 (s, 3H, CH₃), 5.29 (d, 1H, *J* 3.4 Hz, H-6), 7.14-7.35 (m, 8H, H-2'',3'',4'',5'',6'', H-5' and H-7',8'), 8.10 (s, 1H, H-4'), 9.90 (d, 1H, *J* 3.4 Hz, NH-1), 9.58 (s, 1H, NH-3), 10.20 (s, OH-6'); **RMN ¹³C** (DMSO-d₆, 100 MHz): δ 18.4 (CH₃), 53.5 (C-6), 110.7, 119.1, 126.2, 127.3, 128.3, 129.2, 134.9, 137.3, 142.1, 143.3, 144.3, 147.9, 152.1, 157.7, 161.1, 187.3 (C=O, cétone); **MS (ESI⁺)**: *m/z* 399 (32) [M+Na]⁺, 377 (60) [M+H]⁺. **Anal. Element. Calc** pour C₂₁H₁₆N₂O₅: C 67.02, H 4.28, N 7.44. Trouvées: C 67.22, H 4.32, N 7.56%.

5-(8-Hydroxy-2-oxo-2H-chromène-3-carbonyl)-6-méthyl-4-phényl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (8)

Ce produit est obtenu sous forme d'une poudre jaune avec un Rdt=66% (260 mg); Pf=203°C. **RMN ¹H** (DMSO-d₆, 300 MHz): δ 2.08 (s, 3H, CH₃), 5.24 (d, 1H, *J* 3.3 Hz, H-6), 7.00-7.35 (m, 8H, 2'',3'',4'',5'',6'', and H-6',7',8'), 8.73 (s, 1H, H-4'), 9.58 (d, 1H, *J* 3.3 Hz, NH-1), 9.80 (s, 1H, NH-3), 9.96 (OH-8'); **RMN ¹³C** (DMSO-d₆, 100 MHz): δ 18.5 (CH₃), 53.5 (C-6), 110.8, 113.7, 116.9, 126.3, 126.9, 128.6, 134.9, 137.4, 143.8, 146.9, 147.9, 152.2, 154.1, 157.6, 159.1, 187.3 (C=O, cétone); **MS (ESI⁺)**: m/z 399 (55) [M+Na]⁺, 377 (10) [M+H]⁺. **Anal. Element. Calc** pour C₂₁H₁₆N₂O₅: C 67.02, H 4.28, N 7.44. Trouvées: C 67.23, H 4.30, N 7.55%.

Références Bibliographiques

- [1] Ivar Ugi: Recent progress in the chemistry of multicomponent reactions. *Pure Appl Chem.*, 2001, Vol. 73, pages 187.
- [2] Lutz Weber: Multi-component reactions and evolutionary chemistry. *Drug Discovery Today*, 2002, Vol. 7, pages 143.
- [3] J. Ramon Diego et Miguel Yus: Asymmetric Multicomponent Reactions (AMCRs): The New Frontier. *Angew Chem. Int.*, 2005, Vol. 44, pages 1602.
- [4] Bruce Ganem: Strategies for Innovation in Multicomponent Reaction Design. *Acc. Chem. Res.*, 2009, Vol. 42, pages 463.
- [5] James D. Sunderhaus et Stephen F. Martin: Applications of Multicomponent Reactions to the Synthesis of Diverse Heterocyclic Scaffolds. *Chem Eur.*, 2009, Vol. 15, pages 1300.
- [6] Laurent El Kaim et Jieping Zhu : Isonitriles et réactions multicomposants. *Techniques de l'ingénieur*, 2010, pages 1.
- [7] Eelco Ruijter, Rachel Scheffelaar et Romano V. A. Orru : Multicomponent Reaction Design in the Quest for Molecular Complexity and Diversity. *Angew. Chem. Int.*, 2011, Vol. 50, pages 6234.
- [8] Dömling, I., Ugi *Angew: Multicomponent Reactions. Chem. Int*, 2000, Vol 39, pages 3168.
- [9] Nicolas CHERON : Approche théorique de la réactivité des isonitriles en chimie organique. Thèse doctorat, Ecole Doctorale de Chimie de Lyon - ED206 Novembre 2011.
- [10] Adolph Strecker: *Justus Liebigs .Ann. Chem.*, 1850, Vol. 75, pages 27.
- [11] Adolph Strecker: *Justus Liebigs .Ann. Chem.*, 1854, Vol. 91, pages 349.
- [12] Hantzsch, A., *Justus Liebigs .Ann. Chem.* 1882, Vol 1, pages 215.
- [13] Pietro Biginelli : *Über Aldehyduramide des Acetessigäthers. Chem. Ber.*, 1891, Vol. 24, pages 1317.
- [14] Pietro Biginelli : *Über Aldehyduramide des Acetessigäthers II. Chem. Ber.*, 1891, Vol. 24, pages 2962.
- [15] Carl Mannich et Walter Krosche : *Über ein Kondensationsprodukt aus Formaldehyd, Ammoniak und Antipyrin. Arch. Pharm.*, 1912, Vol. 250, pages 647.
- [16] Robert Robinson: *A Synthesis of Tropinone. J. Chem. Soc.*, 1917, Vol. 111, pages 762.
- [17] A. Martinez-Arias, A.B. Hungria, M. Fernandez-Garcia, J.C. Conesa, J.C.J. Munuera, *Phys. Chem.*, 2004, Vol 108, page 17983.
- [18] K. Surya, A. Richard, De. Gibbs, *Synthesis*, 2005, Vol 11, page 1748.

- [19] Su. Weike, Li. Jianjun, Zh. Zhiguo, Sh. Yinchu, *Tetrahedron Lett.*, 2005, Vol 45, page 6037.
- [20] Y. Yu, D. Liu, C. Liu, G. Luo, *Bioorg Med Chem Lett.*, 2006, Vol 17, page 3508.
- [21] : Radia TAFER, Synthèse en série hétérocyclique : nouvelles voies d'accès aux dérivés de la 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one et de la 1,4-dihydropyridine .Thèse De Doctorat Université CONSTANTINE .
- [22] M.M. khodaei , P. Salehi , M.A. Zolfigol ,S. Sirouszadeh, *Polish J. Chem.*, 2004, Vol 78, page 385.
- [23] Folkers, K, Johnson T. B. *J. Am. Chem. Soc.*, 1933, Vol 55, page 3784.
- [24] Sweet, F, Fissekis, J. D. *J. Am. Chem. Soc.*, 1973, Vol 95, page 8741.
- [25] O'Reilly, Atwal K. S. *Heterocycle*, 1987, Vol 26, page 1185.
- [26] Atwal K. S, O Reilly, Gougoutas J. Z, Malley M. F. *Heterocycles*, 1987, Vol 26, Page 1189.
- [27] Atwal K. S., Rovnyak, O Reilly, Schwartz J. *J Org. Chem.*, 1989, Vol 54, page 5898.
- [28] Pasunooti K K, Chai H, Jensen C N, Gorityala, Wang, S, Liu X.W. *Tetrahedron Lett.*, 2011, Vol 52, page 80.
- [29] Salim S. D, Akamanchi. *Catal. Commun.*, 2011.
- [30] Ma, J. G, Zhang J. M, Jiang H. H, Zhou J. H. *Chin Chem Lett.*, 2008, Vol 19, Page 375.
- [31] De Souza, da Penha, Milagre, Garden, Esteves, Eberlin, Antunes. *Chem. Eur. J.*, 2009, Vol 15, page 9799.
- [32] Shen Z-L, Xu X-P, Ji, S-J. *J. Org. Chem.*, 2010, Vol 75, page 1162.
- [33] Litvic, M, Vecenaj I, Ladisic Z. M, Lovric M, Vinkovic V, Litvic M. F., *Tetrahedron*, 2010, Vol 66, page 3463.
- [34]:W Krenn, P Verdino, G. Uray, K. Faber, C.O. Kappe. *Chirality*, 1999, Vol 11, page 659.
- [35] Munoz-Muniz, Juaristi E., *Arkivoc.*, 2003, Vol 11, page 16.
- [36] Holden M.S, Crouch R.D. *J. Chem.* 2001., Vol 78, page 1104.
- [37] Kappe C.O., Shishkin O.V., Uray G., Verdino P., *Tetrahedron*, 2000, Vol 56, page 1859.
- [38] Schnell B., Strauss U.T., Verdino P., Faber K., Kappe C.O.: *Asymmetry* .*Tetrahedron* 2000, Vol 11, page 1449.
- [39] Wang F., Wenslow R.M., Dowling T.M., Mueller K.T., Santons I., Wyvratt J., *Anal. Chem.*, 2003, Vol 75, page 5877.
- [40] Gong D., Zhang L., Yuan C., *Heteroatom. Chem.*, 2003, Vol 14, page 13.
- [41]Xia M., Wang Y.G., *Synthesis*, 2003, page 262.

- [42] Yadav S., Suddy B.V., Nagaiah K., Lingaiah N., Saiprasad P.S., *Eur. J. Org. Chem.*, 2004, page 522.
- [43] (a) Snider, B. B.; Shi, Z. *J. Org. Chem.* 1993, Vol 58, page 3828. (b) Patil, A. D.; Kumar, N. V.; Kokke, W. C.; Bean, M. F.; Freyer, A. J.; Debrosse, C.; Mai, S.; Truneh, A.; Faulkner, D. J.; Carte, B.; Breen, A. L.; Hertzberg, R. P.; Johnson, R. K.; Westly, J. W.; Ports, B. C. M. *J. Org. Chem.* 1995, Vol 60, page 1182.
- [44] (a) Blacquiere J. M., Sicora O., Vogels C. M., Cuperlovic-Culf M., Decken A., Ouellette R. J., Westcott S. A. *J. Chem.*, 2005, Vol 83, page 2052; (b) Wright C. M., Chovatiya R. J., Jameson N. E., Turner D. M., Zhu G., Werner S., Huryn D. M., Pipas J. M., Day B. W., Wipfb P., Brodsky J. L., *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, Vol 16, page 3291.
- [45] El-Subbagh H. I., Abu-Zaid S. M., Mahran M. A., Badria F. A., Al-Obaid A. M., *J. Med. Chem.*, 2000, Vol 43, page 2915.
- [46] Aouicha Benmaati: Réaction multicomposés : Réactivité de l'ester de Dieckmann vis à vis d'aldéhydes aromatiques et d'halogénures. Thèse de magister, université d'Oran, 2010.
- [47] Ksander G.M., Mc Murry, Johnson J.E., *J. Org. Chem.*, 1976, Vol 42, page 1180.
- [48] Huckin S.N., Weiber L., *J. Am. Chem. Soc.*, 1974, Vol 96, page 1082.
- [49] Benetti, S., Romagnoli, R., Rissi, C. De., Spalluto, G., Zanitow, V., *Chem Rev.*, 1995, Vol 95, page 1065.
- [50] Biginelli, P., *Gazz. Chem. Ital.*, 1983, Vol 23, page 360.
- [51] Wu L., Wang X., Xu W., Farzaneh F., Xu R.: The structure and pharmacological functions of coumarins and their derivatives. *Med. Chem.*, 2009, Vol 16, pages 4236–4260.
- [52] Potapov V et Tatarintchik K, (Chimie Organique), édition mir, mosco, 1981.
- [53] Khan I., Kulkari M.V., Gopal M., Shahabuddin., Synthesis and biological evaluation of novel angularly fused polycyclic coumarins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2005, Vol 15, pages 3584.
- [54] Olimpo, G., Osvaldo, Y., Antonio G., Mena, N., Marco, T. Synthesis of Coumarin Derivatives as Fluorescent probes for membrane and cell dynamics studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, Vol 76, pages 79.
- [55] Belluti F., Fontana G., Bo L.D., Gimmarelli C., Zunino F., *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, Vol 18, page 3543.
- [56] Bombardelli, E.; Valenti, P. *PCT Int. Pub.* 2001.
- [57] Sonali Sandhu, Yogita Bansal, Om Silakari, Gulshan Bansalet: Coumarin hybrids as novel therapeutic agents, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2014, Vol 22, pages 3806.

- [58] Koeni V. Sashidhara , Abdhesh Kumar , Manoj Kumar , Jayanta Sarkar , Sudhir Sinha : Synthesis and in vitro evaluation of novel coumarin–chalcone hybrids as potential anticancer agents, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2010, Vol 20, pages 7205 .
- [59] Amin, K. M.; Eissa, A. A. M.; Abou-Seri, S. M.; Awadallah, F. M.; Hassan, G. S. *Eur. J. Med. Chem.*, 2013, Vol 60, page 187.
- [60] Bansal, Y.; Silakari, O. *Bioorg. Med. Chem.*, 2012, Vol 20, page 6208.
- [61] Paul, K.; Bindal, S.; Luxami, V. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2013, Vol 23, page 3667.
- [62] Ratchanok Pingaew , Amporn Saekee , Prasit Mandi , Chanin Nantasenamat , Supaluk Prachayasittikul , Somsak Ruchirawat, Virapong Prachayasittikul : Synthesis, biological evaluation and molecular docking of novel chalconecoumarin hybrids as anticancer and antimalarial agents, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, Vol 85, pages 65.
- [63] Rosa F. A., Machado, P., Fiss, G. F., Vargas, P. S., Fernandes, T. S., Bonacorso, H.G., Zanatta, N., Martins, M. A. P. *Synthesis*, 2008, pages 3639.
- [64] Devi, I., Bhuyan, P. J. *Synlett.*, 2004, pages 283.
- [65] Hurlbert B. S., Ferone, R., Herrmann, T. A., Hitchings, G. H., Barnett, M., Bushby, S. R. *M. J. Med. Chem.*, 1968, Vol 11, pages 711.
- [66] (a) Makhloufi-Chebli M., Hamdi M., Silva A. M. S., Balegrone F., *J. Sos. Alger. Chim.*, 2008, Vol 18 (1), page 91-101. (b) Makhloufi-Chebli Malika, Thèse de doctorat U.S.T.H.B 2009.
- [67]. E. KNOEVENAGEL, *Ber.*, 1904, Vol 37, page 4461.
- [68] B. Boutemeur-Kheddis, Thèse de doctorat d'état U.S.T.H.B, 2001.
- [69]: Chem Office ChemDraw, 2004.
- [70]: Amina Benazzouz , Malika MAKHLOUFI-CHEBLI, Baya BOUTEMEUR-KHEDDIS, Artur M. S. SILVA et Maamar HAMDI, A facile synthesis of new coumarin-3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones/thiones dyads, *Tetrahedron*, June 2015, Vol 71, Page 3890.

PARTIE II
CHAPITRE I

Synthèse bibliographique sur la fluorescence

I-Définition de la fluorescence

La fluorescence est un processus dans lequel une molécule absorbe la lumière à une longueur d'onde et la réémet très rapidement à une autre longueur d'onde. Ces molécules, à l'état de repos (niveau d'énergie E_0) ont la propriété d'absorber de l'énergie émise par une source lumineuse et de gagner un niveau d'énergie supérieure (E_2) en faisant passer un électron d'une sous-couche à une autre. Si l'apport d'énergie extérieure cesse, l'électron va gagner une sous-couche d'énergie inférieure E_1 , dans un premier temps intermédiaire entre E_0 et E_2 , puis regagner finalement son niveau fondamental E_0 . Dans cette dernière étape, il va libérer l'énergie acquise $= E_1 - E_0$ sous forme de lumière de longueur d'onde $\lambda_3 = \lambda_1 - \lambda_0$, selon la relation de base:

$$E = h\nu$$

Avec : h , constante de Planck; et ν , fréquence de la lumière

Comme $\nu = c/\lambda$ (c vitesse de la lumière et λ , longueur d'onde). On écrit : $E = hc/\lambda$

Chaque longueur d'onde définit une "couleur". La "couleur" de la lumière émise par le fluorochrome est donc différente de la source d'excitation lumineuse.

La gamme des longueurs d'ondes absorbées par un fluorochrome définit le spectre d'absorption du fluorochrome et la gamme des longueurs d'ondes émises par un fluorochrome définit le spectre d'émission. Par exemple, la fluorescéine absorbe la lumière bleue (maximum à $\lambda = 490$ nm) et émet une lumière bleu-vert (maximum à $\lambda = 520$ nm).

Les molécules qui ont cette propriété d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation sont appelées fluorochromes, substances fluorescentes ou sondes fluorescentes. Ce sont des substances chimiques définies par différentes propriétés dont le spectre d'excitation et le spectre d'émission. Les fluorochromes choisis doivent être compatibles avec la source lumineuse utilisée qui elle aussi émet selon un certain spectre. En cas d'utilisation simultanée de plusieurs fluorochromes, ils doivent être choisis de façon à être distingués les uns des autres (spectres d'émission différents) mais si possible pouvoir être excités par la même source lumineuse (spectres d'absorption proches).

En plus d'une bonne adéquation avec la région d'absorption et d'émission recherchée, les fluorochromes doivent posséder des coefficients d'extinction molaire et des rendements

quantiques élevés. La recherche de nouveaux chromophores organiques a connu un intérêt important comme le démontre le nombre d'applications croissantes dans différents domaines, la spectroscopie de fluorescence s'est avérée une méthode de détection efficace. [1]

Les sondes fluorescentes sont utilisées:

- soit couplé à un marqueur spécifique: un anticorps ou une lectine par exemple.
- soit pour ses propriétés chimiques : reconnaissance d'un site cellulaire, par exemple le Hoechst 33342 se lie spécifiquement à l'ADN donnant ainsi une intensité de fluorescence proportionnelle à la quantité d'ADN.

La fluorescence d'un fluorochrome peut varier suivant les conditions d'utilisation : la concentration, la température, le milieu de dilution. Ils sont très sensibles à la lumière, et au pH (certains fluorochromes peuvent même servir d'indicateur de pH).

II- Fluorimètre

Dans le fluorimètre, le monochromateur d'excitation découpe une bande étroite de longueurs d'onde dans le spectre continu de la lampe. Cette lumière, focalisée sur l'échantillon, porte les molécules dans un état électronique excité. La lumière émise lors du retour à l'équilibre est analysée à l'aide du monochromateur d'émission (spectre d'émission: longueur d'onde d'excitation constante, longueur d'onde d'émission variable). Son intensité permet de remonter à la concentration du chromophore. Les déplacements et déformations du spectre d'émission dans différents milieux (en solution liquide, adsorbées encapsulées dans un solide) caractérisent leur interaction avec l'environnement.

III- Spectroscopie de fluorescence

La spectroscopie de fluorescence est l'une des méthodes de détection les plus sensibles, avec plusieurs domaines d'application, notamment en biologie. Elle permet d'obtenir une très haute sensibilité. Elle est basée sur la mesure de l'intensité de la lumière émise par fluorescence par une substance après excitation par des photons du domaine du visible ou du proche ultra violet. Les paramètres les plus souvent utilisés sont : les spectres d'émission et d'excitation, le déplacement de Stokes, l'efficacité de fluorescence (ou rendement quantique), le temps de vie de fluorescence.

Le passage de l'état excité S1 à l'état fondamental S0 se fait avec libération d'un photon d'énergie inférieure E1 donc de longueur d'onde supérieure à celui qui a été absorbé ($\lambda_1 > \lambda_2$).

IV-Principe de la fluorescence

La fluorescence est un phénomène physique dans lequel une molécule absorbe de l'énergie E2 provenant d'une source lumineuse (laser, lampe à vapeur de mercure...). Il y a ainsi passage d'un état fondamental S0 à un état excité S2 avec changement d'orbitale des électrons. Cet état excité S2 a une durée de vie très courte.

Des changements conformationnels font passer la molécule de l'état excité S2 à un état excité plus stable S1: c'est la conversion interne (CI). Le passage de l'état excité S1 à l'état fondamental S0 se fait avec libération d'un photon d'énergie inférieure E1 donc de **longueur d'onde supérieure** à celui qui a été absorbé.

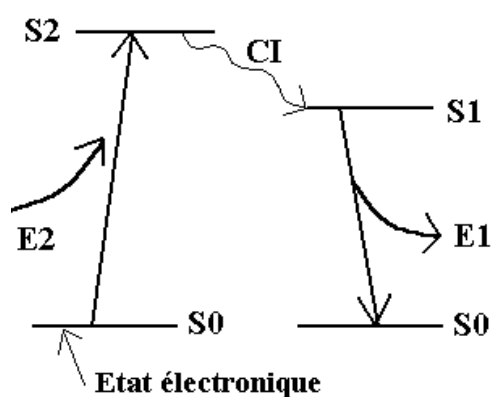


Figure II.1 : Diagramme d'énergie.

Etape 1

Un photon d'énergie $E2 = h\nu_{ex}$, fourni par une source lumineuse externe telle qu'un laser ou une lampe UV, est absorbé par le fluorochrome, permettant le passage à un état excité des doublets électroniques (S2).

Etape 2

Cet état excité dure généralement un temps très limité de l'ordre de la nanoseconde. Pendant ce temps le fluorochrome subit des changements conformationnels et il est sujet à de multiples interactions avec son environnement. L'énergie de (S2) est partiellement dissipée soit sous forme de chaleur ou bien par transfert d'énergie entre les fluorochromes. Le fluorochrome possède donc une énergie interne (S1) plus faible que l'énergie (S2) initiale.

Etape 3

Un photon $E_1 = h\nu_{em}$ est réémis, permettant au fluorochrome de retourner à son état énergétique basal. Du fait de la dissipation d'énergie pendant l'état d'excitation, l'énergie du photon réémis est plus basse et donc la longueur d'onde est plus élevée. La différence d'énergie ($h\nu_{ex} - h\nu_{em}$) représente le shift de Stokes.

V- Chronologie d'une émission de fluorescence

Le phénomène de fluorescence peut être représenté par un diagramme de Jablonski (figure II.2), qui représente les états d'excitations électroniques d'une molécule, les états singlets fondamental S_0 et excité S_1 et S_2 , correspondants aux niveaux d'énergies principaux. Chaque niveau d'énergie est subdivisé en plusieurs niveaux d'énergie vibrationnelles, notés V_0, V_1, V_2, \dots

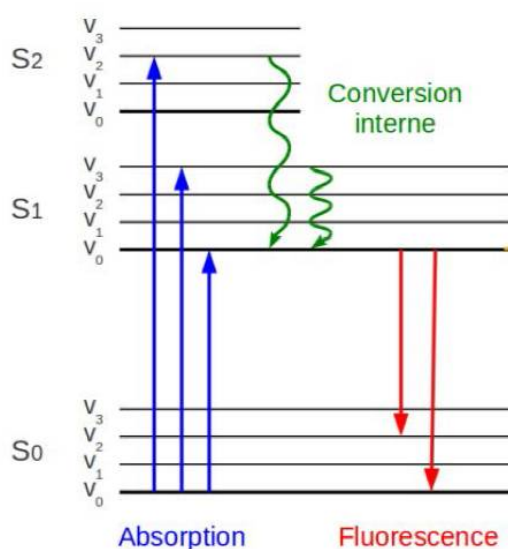


Figure II.2 : Diagramme de Jablonski.

V-1- Absorption de la lumière UV-visible

Après l'absorption d'un photon d'énergie $E=h\nu$, un électron d'une orbitale de niveau d'énergie S_0 effectue une transition vers un état d'énergie supérieur S_2 . La différence entre le niveau d'énergie atteint et l'état basal correspond exactement à l'énergie du photon absorbé E_2 . Les différents états d'énergie étant déterminés pour une molécule donnée, seules certaines transitions sont autorisées, expliquant ainsi la forme du spectre d'absorption. Les transitions vers S_1 et S_2 se font sur des temps de l'ordre de grandeur de 10^{-15} s.

V-2- Conversion interne

Après avoir atteint son état excité $S_x v_y$, l'électron effectue une conversion interne. Il va subir une désexcitation vers $S_1 v_0$ sur un temps de l'ordre de 10^{-12} s. Contrairement aux états S_0 et S_2 qui représentent une différence d'énergie élevée, les états S_1 et S_2 sont énergétiquement assez proches. Cette proximité pourrait entraîner un recouvrement plus au moins important de niveaux vibrationnels de S_1 et S_2 d'énergie équivalente, favorisant une conversion interne rapide.

Les temps très court pendant lesquels l'électron passe d'un niveau d'énergie à un autre n'autorisent aucun mouvement simultané du fluorophore et de son environnement, les transitions sont purement électroniques. En revanche, le temps pendant lequel le fluorophore demeure à l'état excité, il peut se produire un réarrangement des molécules du solvant entourant le fluorophore pour aligner leurs moments dipolaires. L'énergie dissipée par ce réarrangement entraîne une baisse de l'énergie du niveau $S_1 v_0$. Cet effet est d'autant plus marqué que le solvant est polaire. Cela explique les variations, parfois importantes, des spectres d'émission de certains fluorophores en fonction du solvant dans lequel ils sont dissous. Ce phénomène est appelé effet de solvant et est, en partie, responsable du déplacement de Stokes [2].

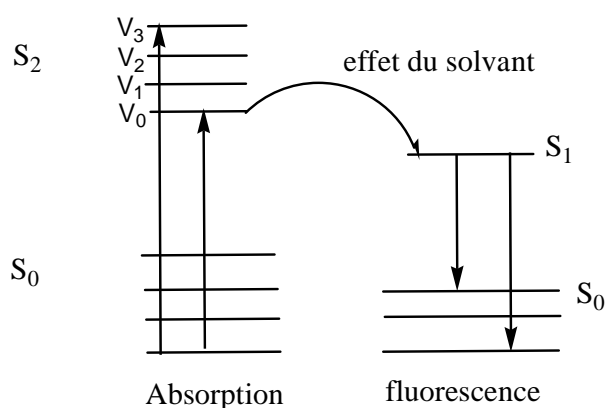


Figure II.3 : Effet du solvant. Perte d'énergie due à la réorientation des moments dipolaires du fluorophore et des molécules de solvant induit une relaxation des états d'énergie

V-3- Emission

A partir du niveau S_1V_0 , le fluorophore émet un photon d'énergie correspondant à la transition S_1V_0 vers S_0V_y . Le temps de vie de fluorescence étant généralement de 10^{-8} - 10^{-9} s, la probabilité d'observer l'émission d'un photon à partir d'un niveau d'énergie supérieur à S_1V_0 est extrêmement faible. Le spectre d'émission ne dépend donc pas à quelques exceptions près de la longueur d'onde d'excitation. Ce phénomène est connu comme la règle de Kasha [3]. Les photons émis sont de plus faible énergie que les photons absorbés.

VI- Caractéristiques des fluorophores

Les fluorophores sont des molécules possédant la propriété d'émettre un photon de longueur d'onde λ_{em} consécutivement à l'absorption d'un photon de longueur d'onde λ_{abs} . Ces composés sont caractérisés par différents paramètres :

VI-1- Absorption

C'est sa capacité d'absorber un photon incident pour atteindre un état excité. L'efficacité de l'absorption est déterminée par le **coefficient d'extinction molaire** ϵ du composé. Il est déterminé à la longueur d'onde maximale du fluorophore. Sa valeur peut constituer un critère pour le choix des sondes. À une intensité lumineuse incidente, plus ϵ est grand, plus la fluorescence sera élevée.

VI-2-Coefficient d'extinction ϵ (ou absorption molaire)

Pour une longueur d'onde donnée, ϵ relie la quantité de lumière absorbée à la concentration du fluorophore en solution ($M^{-1} cm^{-1}$). Cette valeur est comprise entre 5000 et 250000 $M^{-1} cm^{-1}$.

Dans de nombreux cas, l'absorbance suit la loi de Beer-Lambert :

$$A(\lambda) = \log \frac{I_\lambda^o}{I_\lambda} = \epsilon(\lambda).l.C$$

Où $\epsilon(\lambda)$ est le coefficient d'absorption molaire (en $M^{-1} cm^{-1}$), « C » est la concentration (en M) de substance absorbante et « l » est l'épaisseur du milieu absorbant (en cm).

Le coefficient d'absorption molaire, $\epsilon(\lambda)$, exprime l'efficacité avec laquelle une molécule absorbe la lumière dans un solvant donné.

Tableau II.1 : Exemples de coefficients d'absorption molaires

Composé	$\epsilon/L \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$	Composé	$\epsilon/L \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$
Benzène	~ 200	Acridine	~ 12000
Phénol	~ 2000	Biphényle	~ 16000
Carbazole	~ 4200	Biantryle	~ 24000
1-naphtol	~ 5400	Acridine orange	~ 30000
Indole	~ 5500	Pérylène	~ 34000
fluorène	~ 9000	Eosine Y	~ 90000
antracène	~ 10000	Rhodamine B	~ 105000
sulfate de quinine	~ 10000		

Les déplacements des spectres d'absorption sont dus à des effets de substitution sur la molécule ou à une modification d'environnement (par exemple un changement de solvant). Notons qu'un déplacement vers les grandes longueurs d'onde est appelé déplacement bathochrome et un déplacement vers les courtes longueurs d'onde, déplacement hypsochrome. Une augmentation du coefficient d'absorption molaire est appelée effet hyperchrome, l'effet inverse est dit hypochrome.

VI-3- Rendement quantique de la fluorescence

L'efficacité de l'émission de lumière fluorescente pour une molécule donnée est déterminée par le **rendement quantique** ϕ , défini par le rapport entre le nombre de photons de fluorescence émis et le nombre de photons absorbés par la molécule.

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

Le rendement quantique est un nombre sans unité, allant de 0 (non fluorescent) à 1. En pratique il est calculé par rapport à un composé de référence (standard), placé à la même densité optique, par comparaison des aires de réponses du composé et de la référence.

En fait, la mesure directe est difficile à faire et, la plupart du temps on détermine le rendement quantique d'un composé par comparaison avec un échantillon étalon, dont on connaît la valeur du rendement quantique (le sulfate de quinine est souvent utilisé). Pour cela, on mesure, pour l'échantillon X et le standard S (référence), l'absorption A_X et A_S pour une longueur d'onde donnée, ainsi que F_X et F_S pour les deux solutions par intégration de la bande d'émission obtenue.

On obtient alors :

$$\phi_x = \frac{\phi_s \cdot A_s \cdot F_x \cdot n_x^2}{A_x \cdot F_s \cdot n_s^2}$$

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.

Expérimentalement, il est important de mesurer le rendement quantique en dehors de la présence d'atténuateurs bien connus comme les atomes ou ions lourds (I, NO₃⁻, Ce³⁺ ou l'oxygène dissout (qui favorisent le croisement inter système).

Les rendements quantiques peuvent varier en fonction de l'environnement des fluorochromes : pH, concentration, polarité.

Le rendement quantique de fluorescence, bien qu'étant une donnée primordiale pour déterminer la qualité d'un fluorophore, ne reflète pas systématiquement le comportement du fluorophore.

VI-4- Brillance

La brillance B est une valeur qui associe l'absorbance d'un composé à son rendement quantique de fluorescence.

$$B = \varepsilon \cdot \phi_f$$

C'est un paramètre simple qui permet d'effectuer des comparaisons fiables entre plusieurs molécules fluorescentes. C'est également un paramètre qui donne un aperçu de l'intérêt biologique d'un composé pour un marquage fluorescent. Il est généralement reconnu qu'une brillance de 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹ permet une utilisation confortable du fluorophore, du point de vue de l'intensité du signal.

VI-5- Longueurs d'onde d'absorption et d'émission

Le spectre de fluorescence est situé à des longueurs d'ondes plus grandes (ce qui correspond à des énergies plus basse) que le spectre d'absorption en raison de la perte d'énergie par relaxation vibrationnelle dans l'état excité. L'écart (exprimé en nombres d'onde) entre le maximum de première bande d'absorption et le maximum de fluorescence est appelé déplacement de Stokes.

Il est important de souligner que l'émission d'un photon est un processus aussi rapide que l'absorption d'un photon ($\sim 10^{-15}$ s). Cependant, des molécules excitées résident dans l'état S_1 pendant un certain temps (quelques dizaines de picosecondes à quelques centaines de nanosecondes, selon le type de molécule 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 fluorescence décroît exponentiellement avec un temps caractéristique reflétant le temps de séjour moyen (ou durée de vie) des molécules dans l'état excité.

Une attention particulière doit être portée sur l'allure des spectres d'absorption et d'émission, en plus de la détermination de la brillance. Ce point est important surtout si l'on envisage des expérimentations sur un système vivant, sur cellules ou animal entier.

Une cellule, et à fortiori un organe ou un organisme entier, possède nativement de nombreux composés endogènes, dont un certain nombre sont des fluorophores [4]. Trois acides aminés, le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine sont fluorescents. Ils absorbent et émettent dans l'UV (280nm et 348 nm pour le tryptophane, avec une brillance de 800 environ) [4].

D'autres fluorophores sont présents dans le cytoplasme dont les co-facteurs nicotinamides réduits, comme le NADH, qui présente des maximums d'excitation et d'émission à 340 et 435 nm [5]. La flavine mono-nucléotide absorbe à 450nm, émet à 530nm avec une brillance de $3000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [4,6]. Enfin, il est connu que l'ADN absorbe autour de 260 nm avec un ϵ égale à $(7-15) 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [7].

VI-6- Déplacement de stokes

Le déplacement de stokes est la différence entre la position du pic du spectre d'absorption et celle du pic du spectre de fluorescence de la même molécule. La détection d'une espèce fluorescente est d'autant plus facile que le déplacement de stokes est grand. Certains fluorophores présentant un déplacement de stokes faible, comme les rhodamines ou les fluorescéines ($\Delta\lambda \approx 20-30\text{nm}$), ont un comportement parfois problématique dans des expérimentations de marquage fluorescent.

Le déplacement de Stokes est exprimé en nombres d'ondes, $\Delta\bar{\nu} = \bar{\nu}_{\text{ab}} - \bar{\nu}_{\text{em}}$

Ce paramètre important fournit des informations sur les états excités par exemple, quand le moment dipolaire d'une molécule fluorescente est plus grand dans l'état excité que dans l'état fondamental, le déplacement de Stokes augmente avec la polarité du solvant.

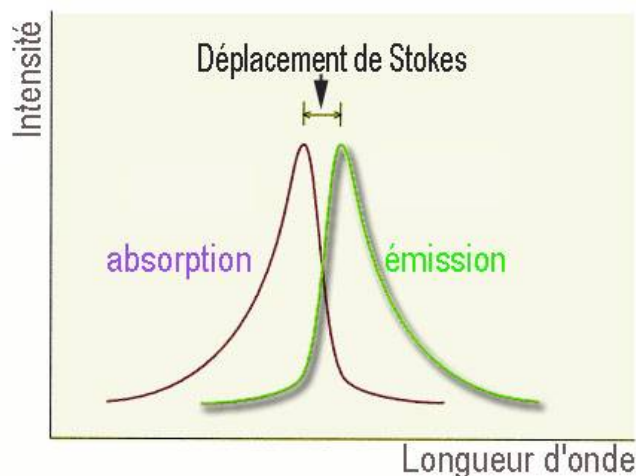


Figure II.4 : Déplacement de stokes

VI-7- Temps de vie de fluorescence τ_f

Le temps ou la durée de vie de fluorescence ou le temps de déclin, 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 τ_f est petit, meilleur sera la sensibilité du fluorochrome.

Le déclin de fluorescence au cours du temps dans une population uniforme de molécule excitées pendant un temps très bref est une fonction exponentielle indépendante de la concentration :

$$I(t) = I_0 e^{-\frac{t}{\tau_f}}$$

$I(t)$ = Intensité de fluorescence mesurée au temps t ;

I_0 = Intensité de fluorescence observée immédiatement après excitation ;

τ_f = Durée de vie du fluorochrome.

VI-8- Stabilité

La stabilité d'un fluorophore est une caractéristique importante. Il doit résister au photo-blanchiment lorsqu'une irradiation prolongée est requise. Il doit également être inerte vis-à-vis de son environnement pour ne pas altérer le signal fluorescent attendu et ne pas modifier son environnement, notamment lors d'imagerie biologique, afin de conserver la viabilité de l'échantillon.

VI-9- Solubilité

La plupart des expérimentations biologiques se déroulent en milieu aqueux. Il est important que le fluorophore ait une solubilité aqueuse suffisante pour atteindre une concentration adéquate avec l'expérimentation envisagée. Or, la plupart des fluorophores organiques sont construits autour d'hétérocycle aromatiques reliés par une chaîne carbonée insaturée ou autour d'un cœur polycyclique aromatique (coumarines, fluorescéine,..) ces cœurs sont fortement lipophiles et présentent de fait une solubilité aqueuse limitée. Des fonctions chimiques ionisées à pH physiologique ont été ajoutées à ces fluorophores afin de les rendre plus hydrophiles comme carboxylates pour la fluorescéine ou sulfates pour les cyanines C_{3,5,7} et les rhodamines.

VI-10- Accessibilité chimique

Un point qui peut sembler secondaire en vue d'une utilisation de fluorophores en biologie est leur accessibilité chimique, c'est-à-dire la possibilité de pouvoir effectuer des modifications sur ces molécules. Ce point est néanmoins très important lorsque l'on envisage de produire une sonde fluorescente, qui porte une fonction réactive vis-à-vis de sa cible. La plupart des sondes commerciales possèdent une fonction ester activée, permettent la formation d'une liaison amide avec une fonction amine présente sur la molécule cible. La possibilité de modifications chimiques peut être recherchée pour modifier les propriétés physico-chimiques des fluorophores(longueurs d'onde, solubilité, pKa...)

VII- Facteurs influençant sur la fluorescence

VII-1-Influence de la température

Quand la température augmente l'intensité augmente donc le quenching dynamique diminue et on diminue la probabilité de cohésion entre les molécules.

En général, une augmentation de température provoque une diminution du rendement quantique de fluorescence et de la durée de vie parce que les processus non radiatifs liés à l'agitation thermique (collisions avec des molécules de solvant, vibrations et rotations intramoléculaires) sont d'autant plus efficaces que la température est élevée.

VII-2- Influence du pH sur la fluorescence

La protonation ou la déprotonation de groupes fonctionnels modifient les fluorophores, soit au niveau de leur rendement quantique, soit au niveau de la forme des spectres d'excitation ou d'émission.

VII-3- Influence de la polarité du solvant

Le moment dipolaire d'une molécule à l'état excité est en général supérieur à celui de la molécule à l'état fondamental. Quand la polarité augmente, l'intensité augmente et la longueur d'onde d'émission diminue. La polarité du solvant influence beaucoup l'émission des molécules polaires, mais peu celle des molécules non polaires.

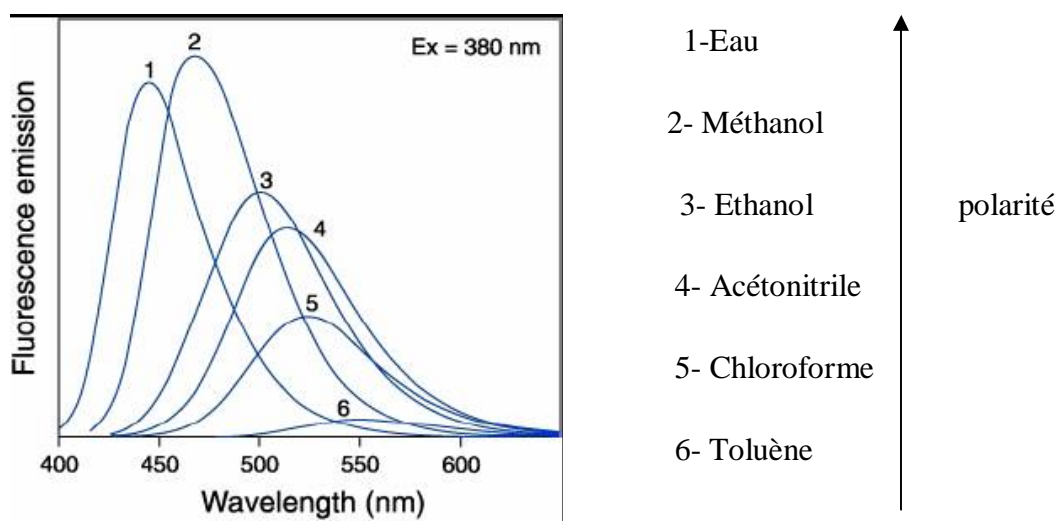


Figure II.5 : Exemple d'émission de fluorescence du 6-bromoacétyl-2-diméthylamino naphthalène.

VII-4- Concentration ou agrégation

La relation entre la concentration et l'intensité de fluorescence correspond graphiquement à une courbe en cloche : la fluorescence passe par un maximum pour une concentration optimale; ainsi à une même intensité de fluorescence correspondent deux concentrations.

Il faut opérer au maximum sur des solutions de concentrations faibles car il y a auto-inhibition de la fluorescence aux fortes concentrations, du fait de l'augmentation du nombre de collision entre les molécules, qui dissipent l'énergie reçue, ou bien du fait de la formation de polymères non fluorescents.

Aux très faibles concentrations, la courbe de fluorescence est incurvée: le domaine de concentration utile est donc relativement étroit : limité vers le haut et vers le bas. L'épaisseur de la solution traversée par la radiation excitatrice doit être faible, car la concentration optimale diminue quand l'épaisseur augmente ; c'est l'effet de filtre interne, dû à l'absorption par la solution de la lumière d'excitation et de la lumière de fluorescence.

VII-5-Extinction de la fluorescence (photo blanchissement)

Lorsque la molécule est à l'état excité, il existe une certaine probabilité pour qu'elle participe à des réactions chimiques (on parle alors de réactions photochimiques), en particulier avec l'oxygène sous forme de radicaux libres. Le fluorochrome perd alors ses propriétés de fluorescence. Autrement dit, quand on excite une solution de molécules fluorescentes, une certaine proportion d'entre elles est détruite à chaque instant et par conséquent l'intensité de fluorescence décroît au cours du temps. Ce phénomène peut être gênant, notamment en microscopie de fluorescence, mais il peut également être mis à profit pour mesurer la mobilité moléculaire par la méthode de redistribution de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) ou de FLIP (Perte de fluorescence au cours d'un photoblanchiment local).

VII-6- Quenching de la fluorescence

En absence de couplage intersystème et de conversion interne, le rendement quantique approche la valeur maximale de 1. Si l'on ajoute, dans la solution contenant le fluorophore, des molécules qui vont entrer en collision avec les molécules fluorescentes ou des molécules capables de former avec elles des complexes qui n'émettent pas de radiation lumineuse, d'autres voies de désexcitation vont pouvoir se produire. Ces deux types de molécules vont jouer le rôle de quenchers de la molécule fluorescente, lors des collisions intermoléculaires. Deux types de quenching sont observés:

- **Quenching dynamique:** le fluorophore à l'état excité est désactivé en subissant un contact avec une autre molécule (« quenseur »).

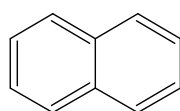
- **Quenching statique:** le fluorophore établit un complexe stable et non fluorescent avec une deuxième molécule.

Dans les deux cas, la valeur du rendement quantique va décroître et la fluorescence sera faible.

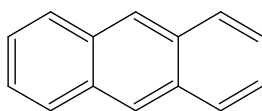
VII-7- Effet de la structure moléculaire sur la fluorescence

A-Extension du système d'électrons π

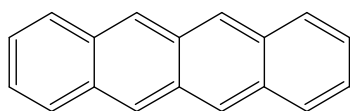
La plus part des composés fluorescents sont aromatiques. Quelques composés aliphatiques saturés sont également fluorescents. D'une façon générale, une extension du système π (c'est-à-dire du degré de conjugaison) s'accompagne du déplacement des spectres d'absorption et de fluorescence vers les grandes longueurs d'onde et d'une augmentation du rendement quantique de fluorescence. Cette règle simple est illustrée par la série d'hydrocarbures aromatiques : le naphthalène, l'anthracène, le naphthacène et le pentacène émettent de la fluorescence respectivement vers l'ultraviolet, le bleu, le vert et le rouge.



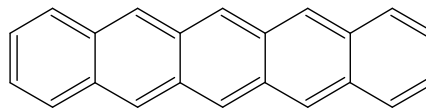
naphthalène



anthracène



naphthacène



pentacène

Les transitions de plus basse énergie des hydrocarbures aromatiques sont du type $\pi-\pi^*$; elles sont caractérisées par des coefficients d'absorption molaires et des rendements quantiques de fluorescence le plus souvent élevés. Quand un hétéroatome est impliqué dans le système π , la transition de plus basse énergie peut être du type $n-\pi^*$. Pour de telle transition, les coefficients d'absorption molaires sont d'un facteur 100 plus petits que ceux des transitions $\pi-\pi^*$. Par conséquent, d'après la relation de Strickler-Berg, la durée de vie radiative τ_r est au moins 100 fois plus longue que celle de la transition $\pi-\pi^*$ de plus basse énergie, c'est-à-dire de l'ordre 10^{-6} S. Une désexcitation radiative aussi lente n'entre donc pas en compétition avec les processus de désexcitation non radiative qui sont ainsi prédominants. C'est la raison pour laquelle le rendement quantique de fluorescence est faible pour les molécules dont le premier état excité est de type $n-\pi^*$. C'est le cas de presque tous les

composés azo et de certains composés comportant des groupes carbonyle ou des azotes hétérocycliques (du type pyridine).

B- Hydrocarbures aromatiques substitués

L'effet des substituants sur les caractéristiques de la fluorescence des hydrocarbures aromatiques est très complexe et toute généralisation doit être faite avec prudence. Quelques tendances peuvent être soulignées.

*La nature ainsi que la position du substituant des hydrocarbures aromatiques peut modifier ces caractéristiques. En général, la présence d'atomes lourds (Br, I...) en tant que substituants d'une molécule aromatique provoque une inhibition de la fluorescence en raison de l'augmentation de la probabilité du passage intersystème, l'effet d'atome lourd peut être faible dans les cas suivants :

- ✓ le rendement quantique de fluorescence est si élevé que la désexcitation par émission de fluorescence domine tous les autres processus de désexcitation ;
- ✓ quand le rendement quantique de fluorescence est si faible que l'augmentation de l'efficacité du passage intersystème est relativement petite.

* En général, la substitution avec des groupes électro donneurs (-OH, -OR, -NH₂, -NHR, -NR₂) provoque une augmentation du coefficient d'absorption molaire et un déplacement bathochrome des spectres d'absorption et de fluorescence. En outre, ces spectres sont souvent larges et peu structurés en comparaison à ceux de l'hydrocarbure aromatique parent (exemple 1- et 2- naphthol comparés au naphthalène).

La présence de paires libres d'électrons sur les atomes d'oxygène et d'azote ne change pas le caractère π - π * des transitions de la molécule parente. Ces paires libres sont en effet directement impliquées dans le système π aromatique, au contraire des paires libres des substituants carbonyles ou des atomes d'azote hétérocycliques. Pour les amines aromatiques et les composés du type phénol, on peut s'attendre à un certain caractère de transfert de charge des transitions, ce que confirme le fait que les spectres de fluorescence sont larges et non structurés.

Si pour des raisons stériques, le groupe -NH₂ est tordu hors du plan du noyau aromatique, le degré de conjugaison diminue, mais les transitions correspondantes restent

différentes des transitions $n-\pi^*$ impliquant les paires libres des groupes carbonyle ou nitro (elles sont en particulier plus intense).

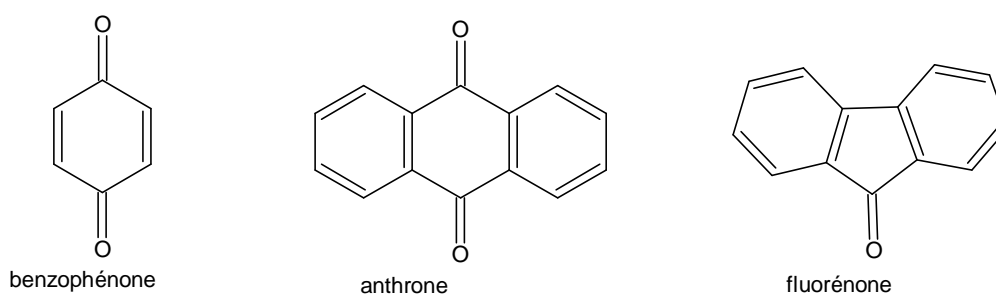
Une non planéité avec le noyau aromatique est également notée avec des substituants –OR, alors qu'un groupe –OH est quasiment coplanaire.

Les caractéristiques de l'absorption et de l'émission des phénols et des amines aromatiques dépendent du pH.

*La substitution avec des groupes électro-accepteur (composés possédant des groupes carbonyle et nitro) rend la fluorescence faible.

Les propriétés de fluorescence des composés aromatiques possédant des groupes carbonyles sont difficiles à prévoir.

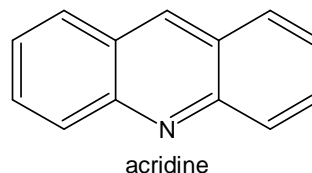
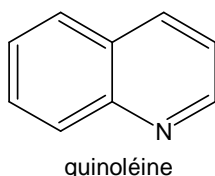
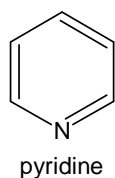
Le premier état excité de nombreux aldéhydes et cétones aromatiques (exemple : la benzophénone, l'anthrone, les 1- et 2-naphtaldéhydes) est du type $n-\pi^*$; ces composés ont de ce fait un rendement quantique de fluorescence faible car la voie privilégiée de désexcitation est le passage intersystème.



Le premier état excité de certains aldéhydes ou cétones aromatiques est du type $\pi-\pi^*$, ce qui leur confère un rendement quantique de fluorescence notable (par exemple : 0.12 pour la fluorénone dans l'éthanol à 77 K et 0.01 à température ordinaire). Cependant, s'il existe un état $n-\pi^*$ dont l'énergie est légèrement supérieur, le rendement quantique de fluorescence dépend fortement de la polarité du solvant. En effet, dans certains solvants, l'énergie de l'état $n-\pi^*$ peut devenir inférieure à celle de l'état $\pi-\pi^*$. Quand la polarité du solvant et son aptitude à former des liaisons à hydrogène augmente, l'énergie de l'état $n-\pi^*$ croît alors que celle de l'état $\pi-\pi^*$ décroît. En conséquence, une fluorescence intense peut être observée dans des solvants polaires et une faible fluorescence dans les solvants non polaires.

C- Composés hétérocycliques

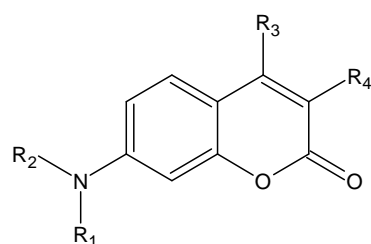
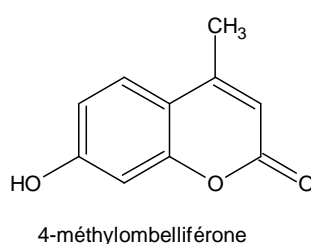
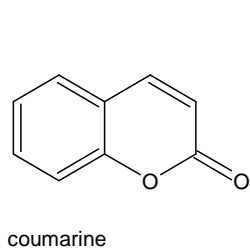
Pour les composés appelés azaarènes possédant un ou plusieurs atomes d'azote hétérocyclique (pyridine, quinoléine, acridine), la transition de plus basse énergie est du type $n-\pi^*$, ce qui explique leur rendement quantique de fluorescence relativement bas.



Cependant, les caractéristiques de fluorescence de ces composés dépendent fortement du solvant. Dans les solvants protiques tels que les alcools, des liaisons hydrogène peuvent se former entre les atomes d'azote et les molécules du solvant. Il en résulte une inversion des états de plus basse énergie $n-\pi^*$ et $\pi-\pi^*$. Le rendement quantique de fluorescence est beaucoup plus élevé que dans les hydrocarbures.

De nombreux fluorophores d'intérêt pratique sont des hétérocycles : coumarines, rhodamines, pyronines, fluorescéines, oxazines, etc. quelques exemples vont être présentés.

La coumarine elle-même a un rendement quantique de fluorescence très faible, mais des substituants appropriés conduisent à des composés émettant dans le bleu-vert (400-550 nm). La 4-méthyl-7-hydroxycoumarine (4-méthylombelliférone) peut être utilisée comme sonde de pH.



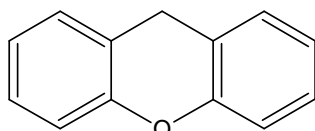
$R_1, R_2 = \text{H, alkyl}$ $R_3 = \text{H, CH}_3, \text{CF}_3\dots$

$R_4 = \text{H, COOH, COOC}_2\text{H}_5\dots$

7-aminocoumarines

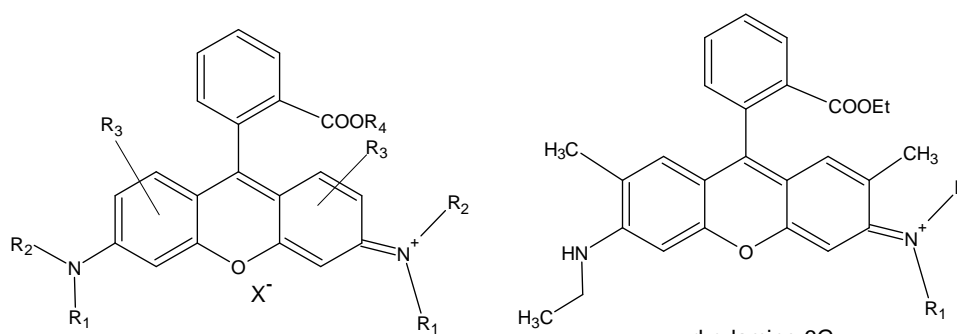
Les 7-aminocoumarines sont particulièrement intéressantes parce qu'elles possèdent un groupe électrodonneurs (groupe amino) conjugué à un groupe électroaccepteurs (groupe carbonyle). Il en résulte un transfert photoinduit.

Les rhodamines et les fluorescéines constituent des familles bien connues de colorants très fluorescents. Ce sont des dérivés du xanthène.



9H-xanthene

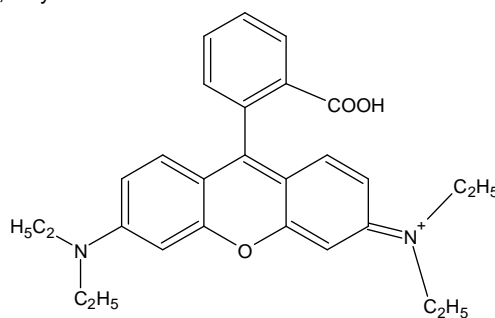
Les rhodamines (rhodamine 6G, rhodamine B) figurent parmi les premiers colorants fluorescents utilisés comme colorants laser. Contrairement aux coumarines (qui sont également des colorants lasers), leurs spectres d'absorption et d'émission sont étroits et le déplacement de Stokes est petit. Ces colorants émettent dans la région 500-700 nm.



rhodamine 6G

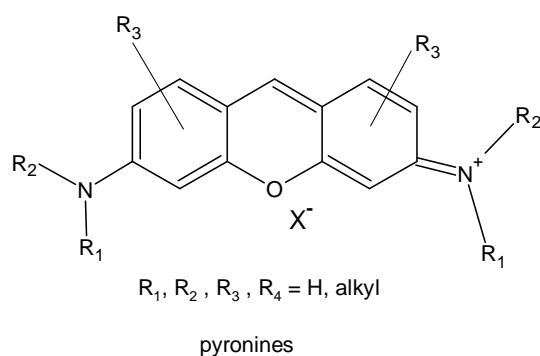
$R_1, R_2, R_3, R_4 = \text{H, alkyl}$

rhodamines

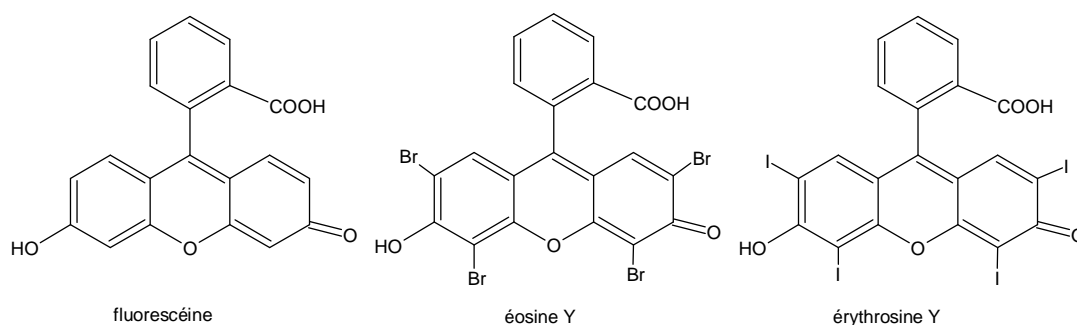


rhodamine B

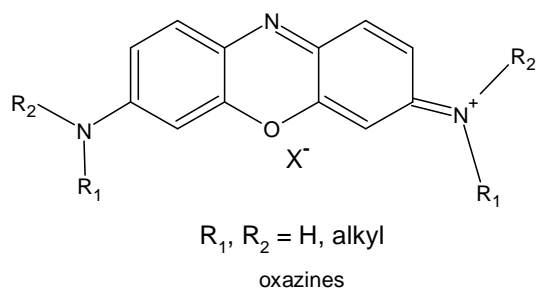
Il est à noter que le groupe carboxyphényle des rhodamines est peu impliqué dans la conjugaison du système d'électrons π puisque son orientation est presque perpendiculaire au plan du noyau xanthénique pour des raisons stériques. Le remplacement de ce groupe par un atome d'hydrogène ne devait donc pas affecter de façon marquée les propriétés photophysiques. De fait les composés résultants, appelés pyronines, présentent des propriétés pratiquement identiques à celles des rhodamines correspondantes : leurs spectres d'absorption et d'émission ne sont déplacés que de 1-3 nm par rapport à ceux des rhodamines, et le déplacement de Stokes est à peine plus petit.



La seconde famille de colorants xanthéniques est constituée de la fluorescéine et de ses dérivés. La fluorescéine elle-même est peu fluorescente en solution dans l'alcool. En revanche, le sel de sodium obtenu par addition de soude émet une fluorescence jaune-verte bien connue, caractéristique du dianion (uranine). La fluorescéine et ses dérivés, par exemple l'éosine Y et l'érythrosine Y, sont connues pour être très sensibles au pH et peuvent donc être utilisées comme sondes de pH.



Lorsqu'on remplace dans les pyronines l'atome de carbone du noyau central, opposé à l'atome d'oxygène) par un atome d'azote, on obtient des oxazines qui sont utilisées comme colorants laser émettant dans la région 600-750 nm.



VIII- Applications de la fluorescence

Les applications de la fluorescence sont très nombreuses. En particulier, 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, biochimie, biologie, médecine, environnement, industrie pharmaceutique, etc. voici La liste des principales applications :

a/- Suivi et dosage sensible, simple et non destructif des composés organiques dans tout milieu transparent (solutions, films,...) et dans les milieux non transparents (hydrocarbures, polluants, médicaments, drogues, etc.) ;

b/- Suivi de sondes fluorescentes dans les milieux d'intérêt biologique :

- ions métalliques, anions, molécules neutres,
- dosage d'anticorps,
- contrôle du sang et des urines (pH, sodium, potassium, chlorure, CO₂),
- puce à ADN;

c/- exploration de la matière inanimée ou vivante à l'aide de sondes fluorescentes : polymères, surfaces solides, solutions de tensioactifs, membranes biologiques, protéines, acides nucléiques ; information sur des paramètres physiques structuraux ou chimiques (polarité, viscosité, ordre moléculaire, pH, concentration d'ions...);

d/- autres applications pratiques:

- lasers à colorants,
- Capteurs optiques chimiques, biocapteurs optiques (optodes),
- lampes fluorescentes,
- marquage de sécurité de documents (ex : billets de banque),
- azurants optiques,
- contrôle non destructif,
- hydrologie,
- criminologie,
- décoration, spectrale, ...etc.

Dans le cadre d'applications biologiques, l'utilisation des marqueurs fluorescents est une technique d'analyse de choix : elle permet la détection et le suivi en temps réel d'espèces d'intérêt biologique :

- ✓ dosage immunologiques et dosages d'ions bioactifs .
- ✓ cinétiques enzymatiques
- ✓ étude des protéines (changement de conformation, sites de liaisons.....)
- ✓ étude d'acides nucléiques (puces à ADN, hybridation,.....)
- ✓ mise en évidence d'interaction protéine-ligand, protéine –acide nucléique
- ✓ étude de membranes biologiques (caractérisation de la bicouche, micro polarité, micro viscosité....)
- ✓ étude de protéome et du génome dans la cellule vivante à l'aide de protéines rapporteurs fluorescentes (les applications de la GFP- Green Fluorescent Protein ont été couronnées par le prix Nobel de chimie en 2008.

Les besoins de notre société dans les domaines de santé, des nouvelles technologies et énergétique nécessitent le développement de nouveau chromophores à structure facilement modulable par des modifications chimiques permettent d'atteindre des propriétés nouvelles. On peut distinguer deux grandes familles de fluophores :

- 1) Composés organiques
- 2) Composés organométalliques

IX- Structures des Chromophores (fluorophores) organiques

La plus part des sondes fluorescentes disponibles pour les applications biologiques et biomédicales sont des molécules organiques, généralement des molécules (poly) hétérocycliques comportant des systèmes d'électrons π délocalisés et des groupements auxochromes (le plus souvent donneurs d'électrons).

Les descriptions de petites molécules fluorescentes sont extrêmement nombreuses dans la littérature. Il est de fait impossible d'effectuer une présentation de tous les marqueurs utilisés.

On présente ici succinctement les grandes familles de fluorophores organiques couramment utilisés comme sondes en imagerie et en biologie. La caractéristique commune à ces fluorophores est la présence de plusieurs cycles aromatiques dans leur structure.

IX-1- Fluorophores polycycliques aromatiques carbonés

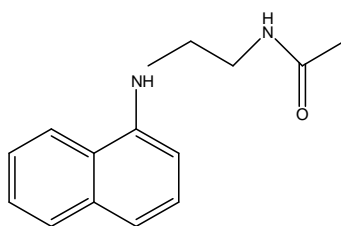


Figure II.6 : 5-(2 Aminoethyl amino) naphthalène-1-sulfonic acide (EDANS)

Une catégorie classique de marqueurs de biomolécules regroupe les dérivés du naphthalène cette famille comprend l'acide 5-(diméthylamino) naphthalène-1-sulfonique (dansyl)[8], ainsi que ses dérivés [9,10]. Ces composés présentent une λ_{ex} d'environ 335 nm, λ_{em} de 520 nm, un ϵ de $6100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et un Φ_{fl} de 0.27 en solution dans l'eau [11].

Des molécules dérivées du pyrène sont également utilisées comme sondes. Ces fluorophores ont des λ_{ex} et λ_{em} de l'ordre de 340 et 375 nm et une brillance d'environ $32000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [12,13].

Des dérivés de l'anthracène ont également été synthétisés et utilisé pour la détection d'anion comme les pyrophosphates [14]. Des structures issues du pérylène ont montré de hauts rendements quantiques en solvants organiques [15], mais leur utilisation semble limitée en solution aqueuse [16].

IX-2- Les quinolines :

Le composé chef de cette classe est la quinine, fluorophore historique qui est toujours utilisé comme standard de fluorescence [17,18].

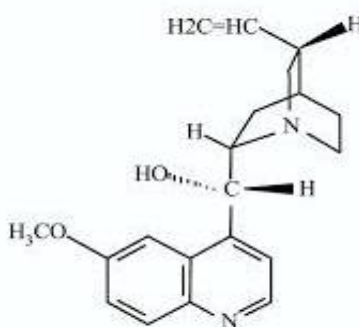


Figure II. 7 : Quinine

IX-3- Les indoles et les imidazoles

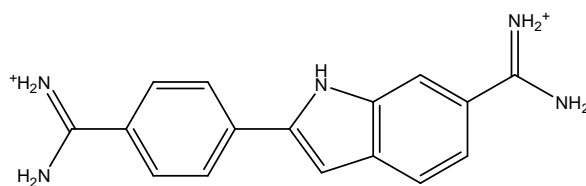


Figure II.8 : 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI)

IX-4- Les Sondes nitrobenzoxadiazoles

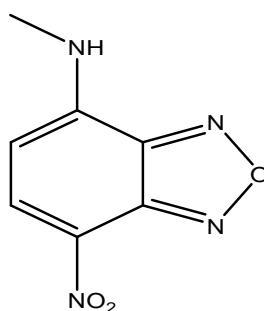


Figure II.9 : Nitrobenzoxadiazole (NBD)

IX-5- Les coumarines

Les coumarines regroupent une large classe de molécules regroupant des substances naturelles, des composés pharmacologiquement actifs et des fluorophores. La substitution de leur position 7 par un hétéroatome (généralement reportés : oxygène ou azote) confère à ses molécules des propriétés d'absorption dans le proche-UV, comme la 7-hydroxy-4-méthylcoumarine (ou 4 méthyl-umbelliférone, la 7-hydroxycoumarine étant communément appelée umbelliférone) présentant des λ_{ex} et λ_{em} de respectivement 360 et 450 nm ainsi qu'une brillance de $11000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{Cm}^{-1}$ environ [19]. Le large déplacement de Stokes (90nm) est du en partie à un changement important de son moment dipolaire à l'état excité, entraînant une perte d'énergie par réorganisation du solvant. Les sondes moléculaires construites autour d'un cœur coumarine représentent d'intéressants marqueurs biomoléculaires. Les positions 3 et 4 du squelette peuvent être relativement facilement substituées afin de fonctionnaliser le fluorophore par différents groupements réactifs [13]. Les propriétés spectrales des dérivés 7-aminocoumarines peuvent être modulées par différents substitutions de l'atome d'azote [20] Enfin, les propriétés chimiques des coumarines (solubilité, pKa..) peuvent être modifiées par

des substitutions sur d'autres positions. La bis-fluorination de l'umbelliférone aux positions 6 et 8 permet d'abaisser son pKa de 8 à 5 [21].

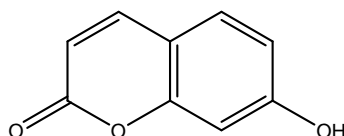


Figure II.10 : 7-hydroxycoumarine

IX-6- Autres fluorophores excités dans l'UV

D'autres composés, absorbent dans l'UV, présentent un intérêt car ils possèdent un déplacement de Stokes remarquable.

Les dérivés de la structure diaryloxazole, comme le cascade Yellow [13,22], sont utilisés comme marqueurs fluorescents. Le cascade Yellow présente un déplacement de Stokes de 149 nm ($\lambda_{ex}=409\text{nm}$ et $\lambda_{em}=558\text{ nm}$) ainsi une brillance de $13000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

IX-6-1- La fluorescéine

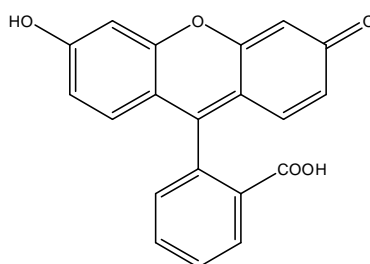
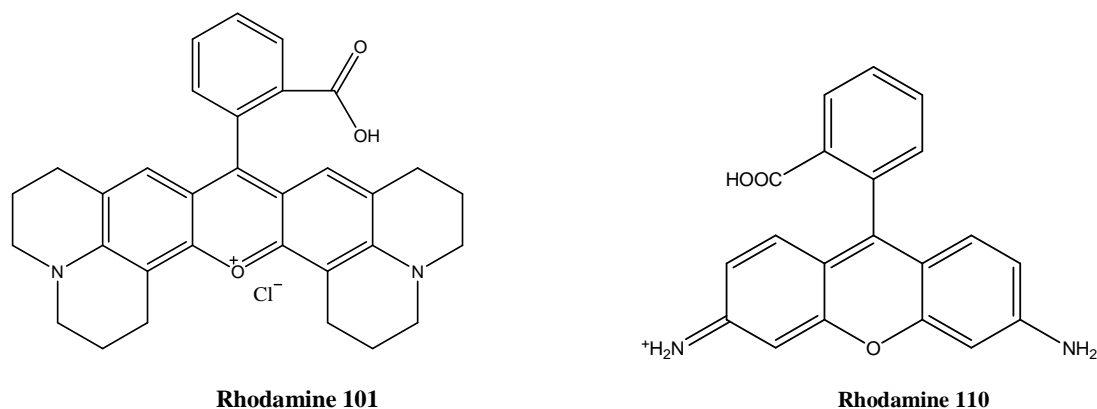


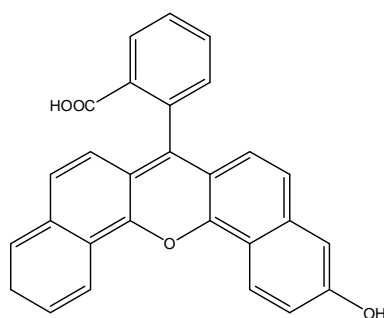
Figure II. 11 : Fluorescéine

La fluorescéine demeure l'un des fluorophores les plus utilisés à l'heure actuelle. Il existe sous de multiples états ioniques. La forme bis anionique (carboxylate et phénate présents simultanément en solution aqueuse basique, le pKa du phénol étant de 6.4) est la forme présentant la fluorescence la plus élevée : $\lambda_{ex}=490\text{ nm}$; $\lambda_{em}=514\text{ nm}$ et affichant une excellente brillance de $88000\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [13,2]. La sensibilité de la fluorescéine aux variations de pH a permis le développement d'indicateurs de pH.

IX-6-2- Les Rhodamines**Figure II. 12** : Rhodamine 101 et 110

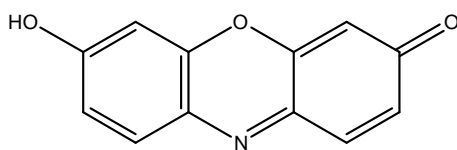
Les rhodamines sont des sondes très largement utilisées. Cette classe de fluorophores présente certaines caractéristiques clés, comme une faible sensibilité au pH et des propriétés de fluorescence modulables par différentes alkylations des anilines.

Le composé le plus simple de la série, la rhodamine 110, présente des caractéristiques de fluorescence analogues à la fluorescéine ($\lambda_{\text{ex}}=496 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}}=517 \text{ nm}$; brillance de $68000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ en solution aqueuse) [23].

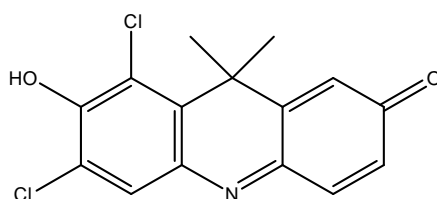
IX-6-3- Les sondes naphtoxanthènes**Figure II.13** : Naphthofluorescéine

Ces sondes dérivent des séries fluorescéines et rhodamine par l'introduction de cycles benzène fusionnés au cœur xanthène. Ces modifications entraînent des sauts bathochromique des spectres d'excitation et d'émission, comme la naphthofluorescéine, montrant des longueurs d'onde supérieures à celles de la fluorescéine (595 nm et 660 nm) en conditions basiques[24].

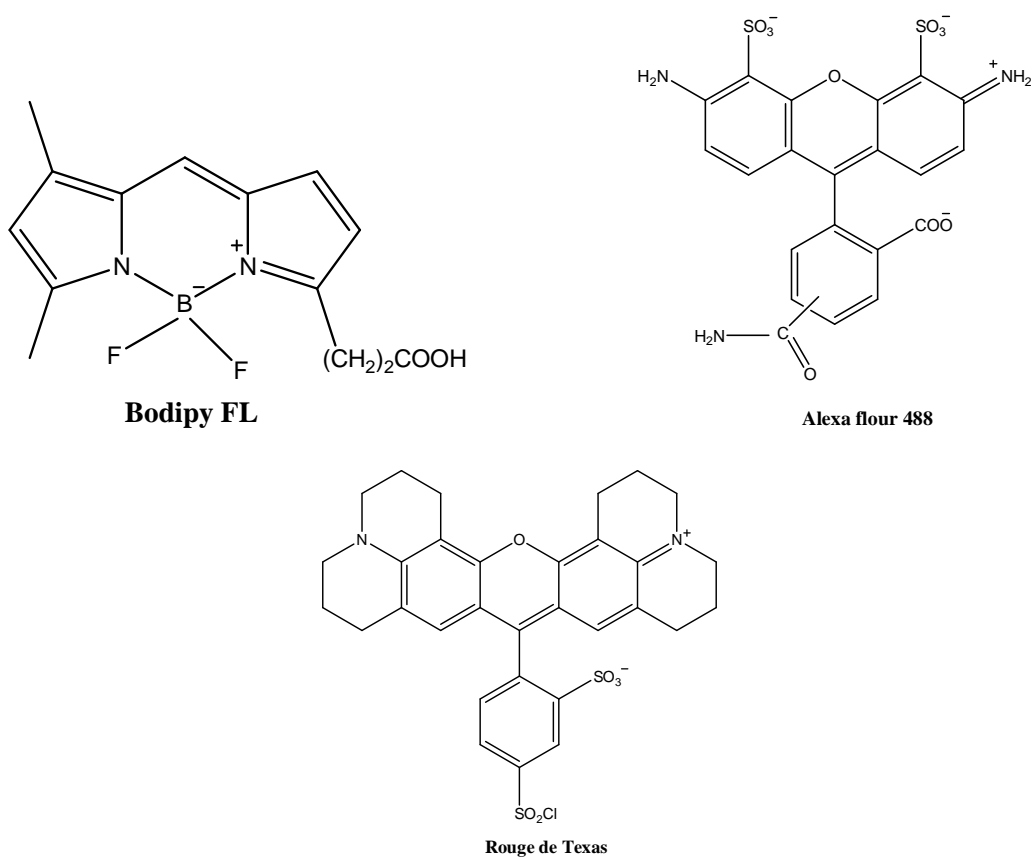
IX-6-4- Les oxazines

**Figure II. 14** : Résorufine

IX-6-5- L'acridine et ses dérivés

**Figure II. 15** : 1, 3-dichloro-7-hydroxy-9,9-diméthyl-2(9H) (DDAO)

D'autres exemples de chromophores sont représentés dans la figure II.16.

**Figure II.16** : Exemple de chromophores organiques

X- Chromophores organométalliques

Les complexes organométalliques (complexes de métaux de transition et complexes d'ions lanthanide) présentent des rendements quantiques d'émission plus faibles que les chromophores organiques mais sont caractérisés par une très longue durée d'émission à température ambiante ($\mu\text{s/ms}$). Quelques exemples sont représentés dans la figure II.17.

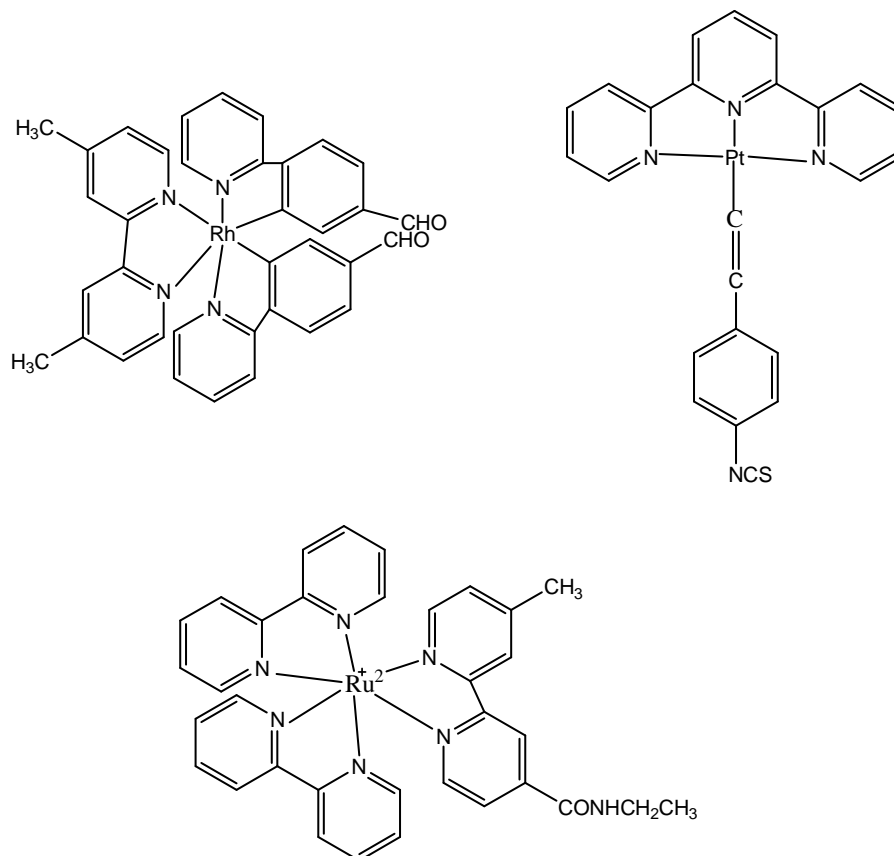


Figure II.17 : Exemples de complexes de chromophores organométalliques

Partie ii
Chapitre ii

Etude par UV/visible et fluorescence des nouvelles molécules coumarin-DHPMs hydrides: propriétés optiques, estimation des moments dipolaires par solvatochromie

I- Introduction

La coumarine et ses dérivés, comme la plupart des hétérocycles, ont stimulé des recherches intéressantes en biologie, en médecine comme anticoagulants [25], en photochimie comme indicateurs de fluorescence et en spectroscopie comme colorants lasers [1]. De nombreuses recherches concernant la fluorescence des dérivés coumarines en solution ont abouti à des résultats intéressants [1,2]. La connaissance des propriétés photophysiques des coumarines est d'un grand intérêt depuis leurs applications importantes dans le domaine du visible comme colorants lasers [26,27].

Les caractéristiques photophysiques intrinsèques des coumarines permettent leur utilisation comme sondes biologiques et chimiques [28], elles ont été explorées dans la détection de protéines, des métaux, de l'ARN, des cellules d'ADN / tumorales [29-33]. En plus les dérivés de la coumarine sont utilisés comme agents sensibilisateurs dans quelques processus photochimiques [27] et en tant qu'indicateurs de pH [34].

Lors de la conception de nouveaux médicaments prototypes, le concept de l'hybridation moléculaire est un outil utile et est basé sur la combinaison de fragments pharmacophores différents de substances bioactives pour produire un nouveau composé hybride avec une affinité et efficacité améliorée [33]. Cette stratégie a pour résultat des composés ayant un profil de sélectivité modifiée, différente et / ou double mode d'action et les effets secondaires indésirables réduits. Musa et coll. ont montré l'application des dérivés de la coumarine dans la pharmacothérapie de cancer du sein en utilisant ce concept [35]. Plus récemment, Sashidhara et coll. [36] ont décrit une molécule hybride coumarine-Monastrol comme agent potentiel spécifique de la tumeur du sein.

L'analyse cytogénétique de la matière tumorale a été grandement améliorée au cours des 30 dernières années par l'application d'une gamme de techniques basées sur la fluorescence [15]. Les techniques optiques fournissent un moyen précis et rapide de détection des régions du cancer. Afin d'obtenir des résultats optimaux du flux de la cytométrie, en

particulier lors de la réalisation des analyses multidimensionnelles, il est essentiel que la combinaison appropriée de fluorochromes soit utilisée. Lors du choix des fluorochromes, il y a un certain nombre de paramètres différents à prendre en compte. Chaque fluorochrome possède des propriétés distinctes et se caractérise par des longueurs d'onde d'excitation et d'émission spécifiques. Tout d'abord, le fluorochrome doit être excité par les lasers disponibles sur l'instrument. D'autre part, les différentes longueurs d'onde d'émission sont lues par des détecteurs ou des tubes photomultiplicateurs et la plage de détection est limitée par des filtres optiques.

Le développement de sondes fluorescentes chimiques est d'un grand intérêt puisqu'elles possèdent une très grande sélectivité et sensibilité envers un large éventail d'analytes cibles. La diversité fonctionnelle des fluorophores permet de viser un grand nombre d'applications.

L'objectif de ce travail est l'étude des propriétés spectroscopiques et l'évaluation des moments dipolaires de trois dérivés de coumarin-3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones récemment synthétisés [38]. Nous avons anticipé à ce que la présence de la 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-one ainsi que les substituants du noyau de coumarine pourrait conduire à des propriétés photophysiques intéressantes et ces composés pourraient ensuite être utilisés comme agents d'extraction des cations ou des agents de signalisation pour la reconnaissance des cations, en tant qu'indicateurs de pH et des sondes fluorescentes.

II- Expérimentale

II-1- Appareillage

Les mesures d'absorbance ont été enregistrées à température ambiante du laboratoire sur un appareil « 6800 UV/Vis. Spectrophotomètre JENWAY » dans des cellules en quartz suprasil Hellma.

Les mesures de fluorescence ont été réalisées sur un fluorimètre JASCO- spectrofluomètre FP-8200.

Les solutions ont été préparées de manière à ce que leur absorbance à la longueur d'onde d'excitation soit inférieure à 1, afin d'éviter tout effet de filtre interne.

Les rendements quantiques de fluorescence se calculent par rapport à une référence adaptée. Les spectres d'absorption de l'échantillon et de la référence (éventuellement dans des solvants différents) sont enregistrés et une longueur d'onde d'excitation est choisie. On enregistre alors dans les mêmes conditions les spectres d'émission de l'échantillon et de la référence, ainsi que le spectre d'émission du solvant. Après soustraction du spectre du solvant, l'aire des spectres de l'échantillon et de la référence est calculée, et le rendement quantique de l'échantillon est déterminé avec la formule suivante:

$$\phi_x = \frac{\phi_s \cdot A_s \cdot F_x \cdot n_x^2}{A_x \cdot F_s \cdot n_s^2}$$

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. La fluorescéine dis sodique ($\Phi = 0.9$) est utilisée comme standard.

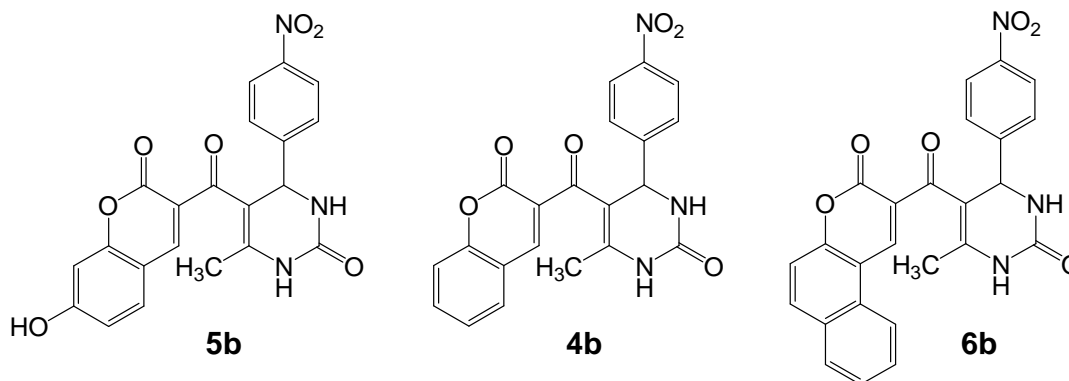
Les solutions ont été préparées de manière à ce que leur absorbance à la longueur d'onde d'excitation soit inférieure à 0.1, afin d'éviter tout effet de filtre interne.

Les solutions n'ont pas été dégazées, l'oxygène n'étant pas connu comme quencher des coumarines.

II-2- Matériels

Le chloroforme, le DMSO, le DMF, L'ACN, le THF et l'acétate d'éthyle utilisés en UV/Visible et fluorescence sont de Sigma Aldrich. L'acétone est celui de Biochem et le dichlorométhane est celui de Fluka.

Les composés choisis à étudier **4b**, **5b** et **6b** sont décrits dans la partie I chapitre II. Ce choix revient à la disposition des produits de départ et la facilité de leur préparation. Ces composés sont insolubles dans l'eau par contre ils montrent une grande solubilité dans plusieurs solvants organiques. Leurs solubilités sont plus grandes dans les solvants organiques polaires.



III- Effet du solvant sur les spectres électroniques d'absorption et d'émission de fluorescence

❖ Spectres d'absorption en U.V/Visible

Les spectres d'absorption des trois composés **4b**, **5b** et **6b** sont réalisés juste après dissolution dans des solvants organiques de différentes polarités et de coefficients diélectriques assez différents. Ils sont réalisés à une concentration de 4×10^{-5} M et à température ambiante du laboratoire.

Les grandeurs des déplacements de Stokes varient entre 8905 et 15381 cm^{-1} . Ces valeurs sont également révélatrices de la transition de transfert de charge (tableau II.2).

Le spectre d'absorption du composé **5b** montre deux bandes d'absorption avec une longueur maximale aux environs 345-353 nm et une autre à 455-461 nm, qui varient en fonction de la polarité du solvant [Figure II.18]. L'intensité de cette dernière augmente dans le DMSO, l'acétonitrile, le DMF et disparaît dans l'acétate d'éthyle, le THF et le dichlorométhane. La bande mineure est associée au groupement hydroxyle du noyau aromatique de la coumarine et peut être attribuée au transfert de charge qui se produit entre le groupe donneur d'électrons (le groupe hydroxyle) et le pôle électro-attracteur constitué par les groupes carbonyles, qui renforcent la force électro-attracteur sur ce côté de cette molécule (Fig II.30).

Pour les composés **4b** et **6b** une seule bande a été observée dans tous les solvants autour de 280-292 nm et 375-403 nm, respectivement (figure II.19 et II.20).

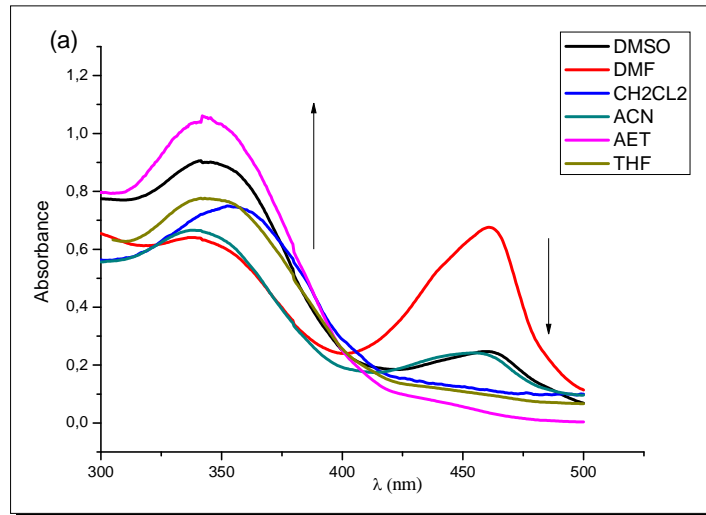


Figure II.18 : Spectre UV/Vis du Composé **5b** dans des différents solvants

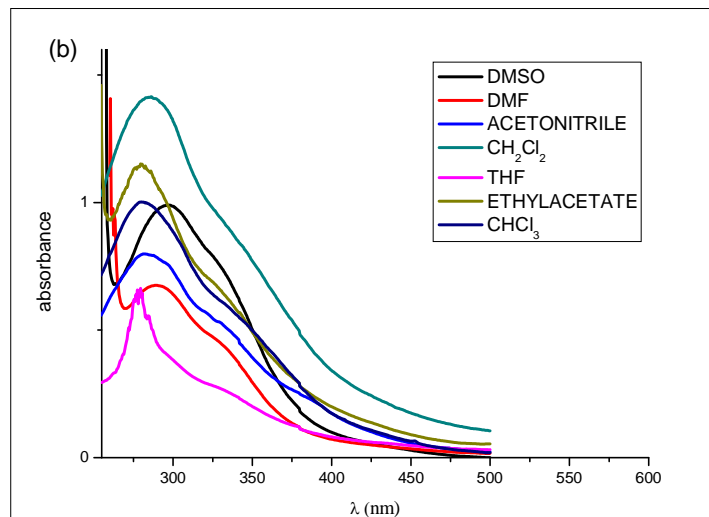


Figure II.19 : Spectre UV/Vis du Composé **4b** dans différents solvants

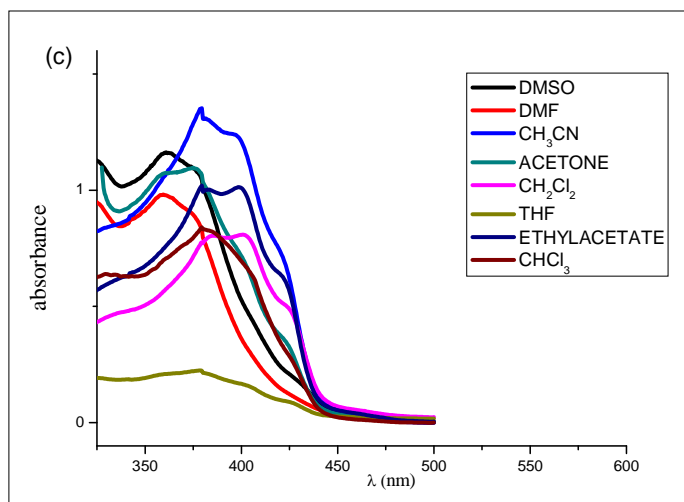


Figure II.20 : Spectre UV/Vis du Composé **6b** dans des différents solvants

Tableau II.2 : Caractéristiques spectroscopiques et photophysiques des composés **4b**, **5b** et **6b** dans différents solvants à $4.10^{-5}M$

Composé	Solvant	λ_{abs} (nm)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	$\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f$ (cm ⁻¹)	$\Phi_f \times 10^2$
5b	DMSO	345	290/460	498	8905	9.25
	ACN	343	290	496	8993	7.69
	DMF	344	290	494	8949	9.61
	Acetone	342	290	496	9078	3.94
	Ethyl acetate	339	290	493	9214	5.30
	THF	339	290	493	9214	7.65
	CH ₂ Cl ₂	340	290	494	9169	-
4b	DMSO	292	300	506	14484	10.06
	ACN	288	300	496	14561	22.39
	DMF	290	300	498	14402	21.46
	Acetone	285	300	494	14845	5.28
	Ethyl acetate	280	300	492	15389	10.06
	THF	279	-	-	-	-
	CH ₂ Cl ₂	286	300	496	14804	8.91
CHCl ₃	282	300	498	15381	16.15	
6b	DMSO	379	360	470	5109	9.64
	ACN	390	360	465	4136	9.64
	DMF	375	360	455	4689	12.33
	Acetone	378	360	462	4810	12.46
	Ethyl acetate	399	360	461	3371	8.64
	THF	401	-	-	-	-
	CH ₂ Cl ₂	400	360	465	3495	11.88
CHCl ₃	403	360	460	3075	17.28	

λ_{abs} : longueur d'onde d'absorption ; λ_{ex} : longueur d'onde d'excitation; λ_{em} : longueur d'onde d'émission ; $\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f$: déplacement de Stokes; Φ_f : rendement quantique de la fluorescence.

❖ Spectres d'émission de fluorescences

La fluorescence des trois composés dans différents solvants est observée à la température ambiante du laboratoire et à 4.10^{-5} M. Les rendements quantiques de fluorescence sont calculés par rapport à une référence adaptée, dans notre cas la fluoescéine dissodique ($\Phi = 0,9$) est prise comme référence. Pour tous les composés, la forme et la position des spectres d'émission sont indépendants de la longueur d'onde d'excitation, ce qui confirme qu'une seule espèce émet dans chaque solution et montre un seul pic (figure II.21, 22 et 23).

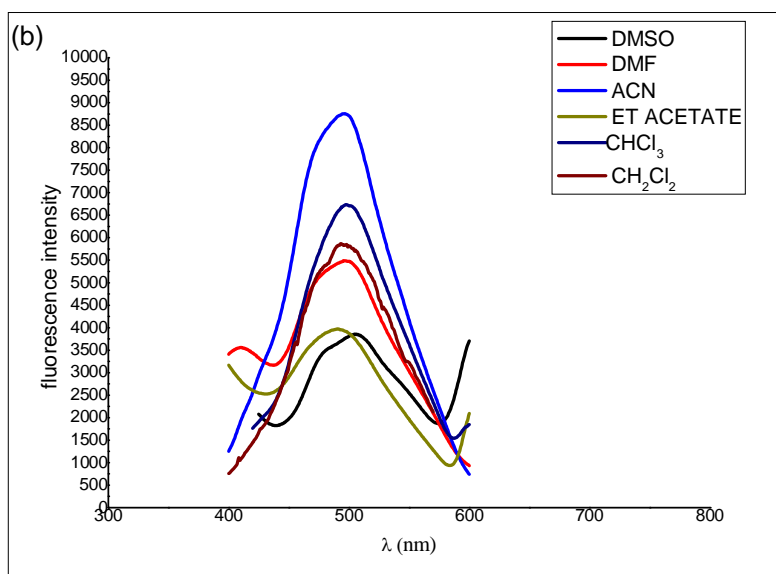


Figure II.21: Spectre d'émission du composé **4b** dans différents solvants

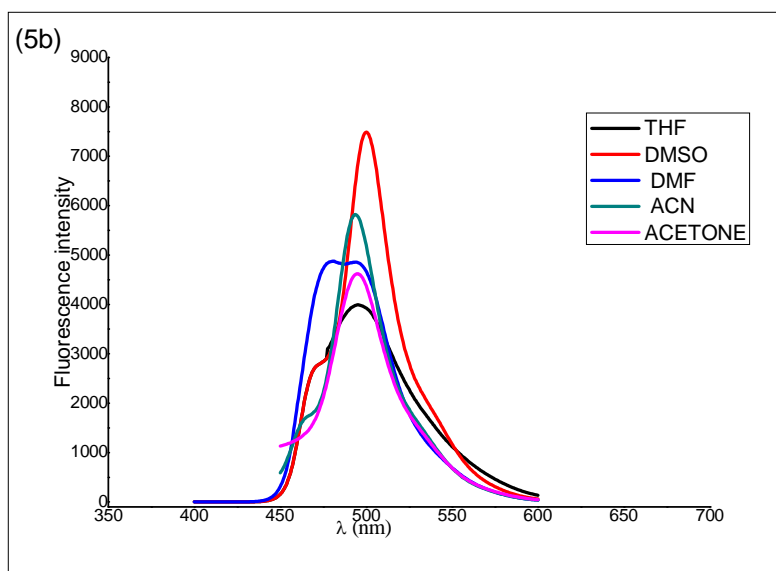


Figure II.22: Spectre d'émission du composé **5b** dans différents solvants

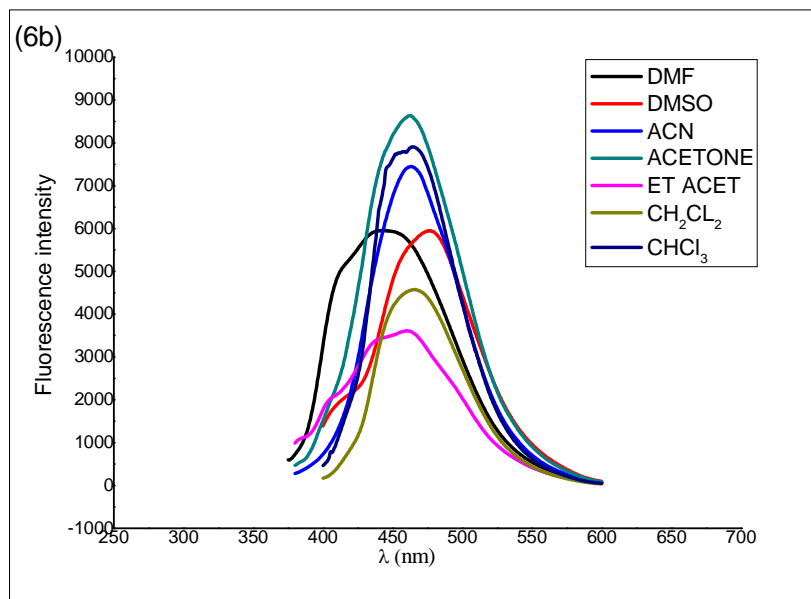


Figure II.23: Spectre d'émission du composé **6b** dans différents solvants

Les spectres d'émission ont subi un décalage fort vers le bleu quand la polarité du solvant augmente. Le pic passe de 497 nm dans le DMSO à 494 nm dans le chloroforme pour **5b** et de 505 nm dans le DMSO à 498 nm dans le chloroforme pour **4b**. Pour le composé **6b** les spectres d'émission ont montré une bande de longueur d'onde 470 nm dans DMSO et 460 nm dans chloroforme (Fig II.21, II.22 et II.23).

Cependant de fortes variations ont été trouvées dans la forme des spectres selon le solvant utilisé. Pour tous les composés, l'intensité du pic a augmenté avec la polarité du solvant. Un déplacement bathochrome a été observée pour tous les composés et associée à une augmentation de la polarité du solvant causé par une différence significative dans la distribution de charge à l'état fondamental et à l'état excité induite par une interaction forte avec des solvants polaires à l'état excité. En outre, le décalage faible dans les spectres d'absorption électroniques comparés aux spectres d'émission de fluorescence indique que ces composés sont moins polarisés par les solvants polaires dans l'état fondamental que dans l'état excité. En outre, l'analyse des effets de solvation montre que les différents solvants de polarités différentes ont des conséquences sur les spectres de fluorescence, alors que, dans les spectres UV-Vis, la nature polaire aprotique semble être le facteur le plus important dans les phénomènes d'absorption. En effet, les figures II.18, II.19 et II.20 montrent que le DMSO et le DMF provoque l'augmentation de l'absorption. Tandis que, dans l'émission de fluorescence (figure II.21, II.22 et II.23), le DMSO exalte les phénomènes d'absorption et le DMF

provoque l'effet inverse. Ces comportements accentuent le rôle de la liaison d'hydrogène et les substituants, dans la génération des interactions spécifiques entre le soluté et le solvant, puisque les paramètres Kamlet-Taft de ces solvants montrent que le DMSO et le DMF sont accepteurs d'une forte liaison hydrogène. Ces considérations sont confirmées lors de l'observation des spectres d'émission de fluorescence.

Une augmentation de la polarité du solvant associée à l'évolution bathochrome du maximum d'absorption (λ_{absmax}) indique que ces bandes principales correspondent à une transition électronique $\pi-\pi^*$ de ces composés. Les procédés TCI (transfert de charge intramoléculaire) sont connus pour être stabilisés dans les solvants avec une plus grande constante diélectrique conduisant à un décalage des deux maximums, λ_{max} de l'absorbance et λ_{max} de l'émission [39].

En effet, dans le DMSO les coumarine-DPMs **4b**, **5b** et **6b** présentaient les plus grands décalages bathochromes, résultant de ce transfert des TCI. La stabilisation des TCI dans les coumarines a été corrélée à la capacité des solvants polaires forts à stabiliser leur état singulet excité [40,41].

Enfin, l'ampleur des déplacements de Stokes est aussi indicative de la TCI. Une grande amplitude de déplacement de Stokes indique que la géométrie à l'état excité pourrait être différente de celle de l'état fondamental associé à une variation du moment dipolaire lors de l'excitation (tableau II.2) et il est raisonnable de supposer des interactions spécifiques impliquant les groupes carbonyles et les molécules du solvant [42].

❖ Variation de la longueur d'onde d'absorption et d'émission en fonction du coefficient diélectrique des solvants

Les Figues. II. 24 (a-c) illustrent la variation de λ_{abs} en fonction des valeurs du coefficient diélectrique des solvants (ϵ) pour les composés **4b**, **5b** et **6b**. Ces Figures, montrent une bonne corrélation et une bonne linéarité entre le changement de ϵ du solvant et la longueur d'onde d'absorption et qu'avec l'augmentation des valeurs de ϵ , le spectre est déplacé vers les plus longues longueurs d'onde pour **4b** et **5b**. Dans le cas de **6b**, λ_{absmax} obtenue dans les solvants polaires aprotiques (DMSO, ACN et DMF), sont inférieures par rapport à celles obtenues dans les solvants moins polaires.

Cela pourrait être dû à la formation d'une forte liaison hydrogène entre le composé et les molécules des solvants. Cette linéarité n'est pas beaucoup observée avec les longueurs d'ondes d'émission (Figures II. 25 (a-c)).

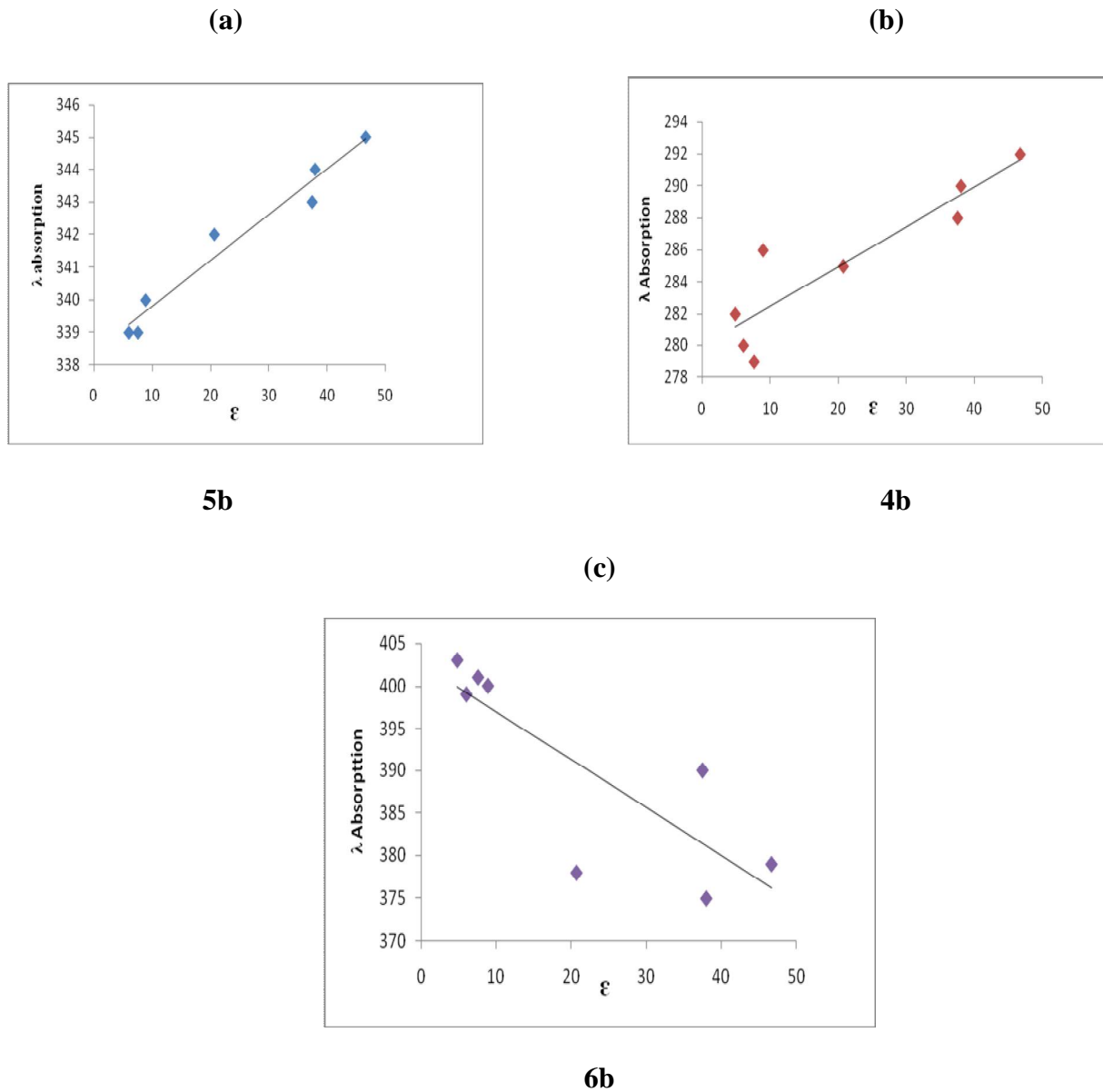


Figure II. 24 : (a-c) Longueur d'onde d'absorption en fonction du coefficient diélectrique des solvants

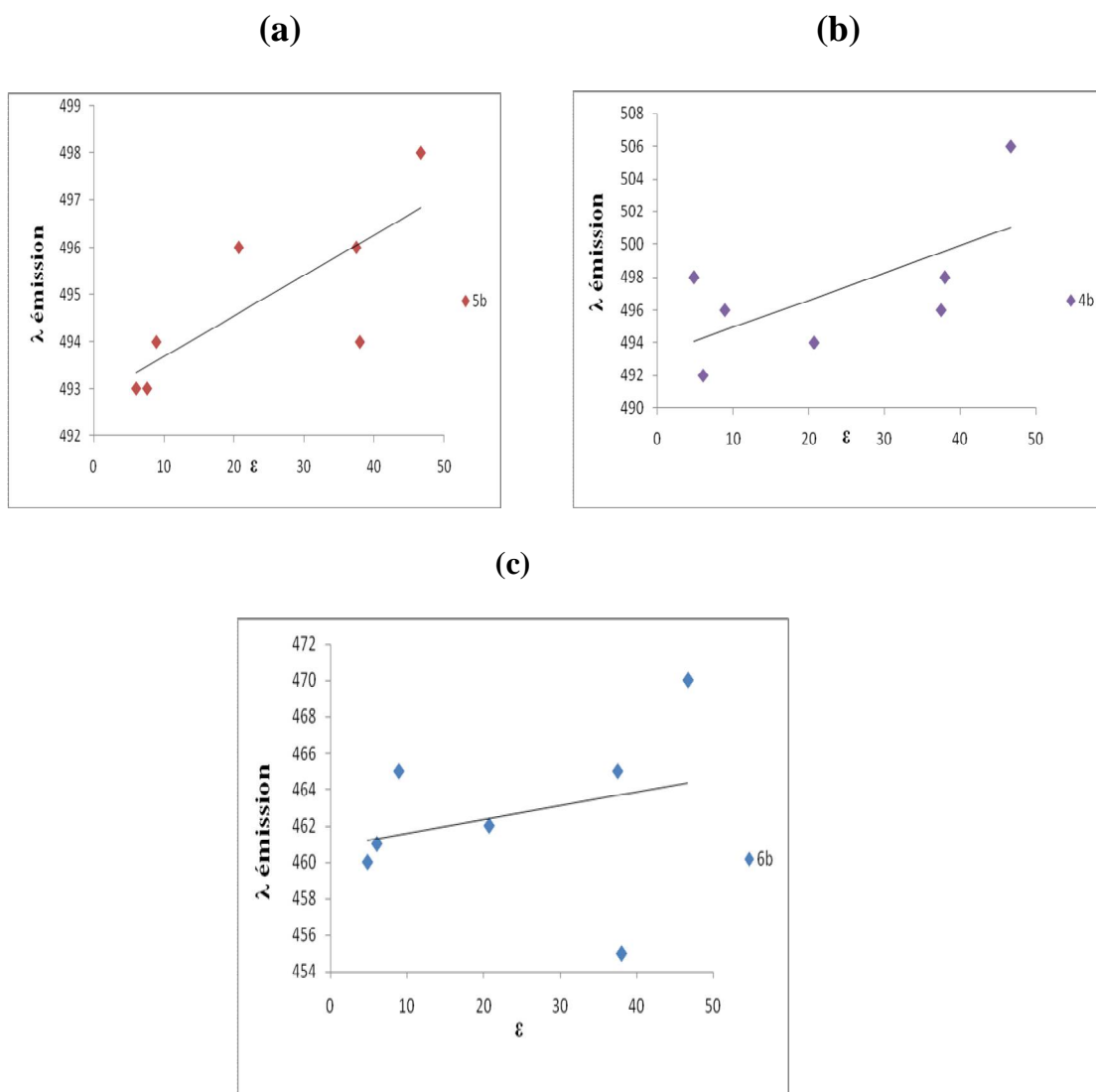


Figure II. 25 : (a-c) Longueur d'onde d'émission en fonction du coefficient diélectrique des solvants

❖ Rendements quantiques de la fluorescence

Le rendement quantique de fluorescence Φ_f a été déterminé par excitation à λ_{ex} des composés (Tableau II.2) et ils s'étendent entre $3,94 \times 10^{-2}$ à $22,39 \times 10^{-2}$. Cependant, de manière inattendue, dans le DMSO, le DMF et l'ACN, les coumarine-DPMs **4b**, **5b** et **6b** ont montré une augmentation de Φ_f . Nous nous attendions à un Φ_f réduite dans un solvant plus polaire qui permettraient de mieux stabiliser la TCI. Ce phénomène inverse pourrait être expliquée par une réduction de la torsion des liaisons simples impliqués dans le transfert de charge dans l'état excité pour certains solvants spécifiques, comme décrit pour d'autres coumarines [40].

Dans tous les solvants, les rendements quantiques de **5b** ont été réduits par rapport à ceux des **4b** et **6b**. Cependant, les composés **4b** et **6b** sont plus fluorescents que **5b**

L'augmentation des rendements quantiques dans DMSO, DMF et ACN en plus d'un bon déplacement de Stokes d'environ 200 nm pour nos coumarine-DPMs **4b**, **5b**, **6b** dans ces milieux, et le processus de TCI rend ces composés un bon point de départ de nouvelles sondes chimiques et biologiques.

❖ Brillance

La brillance est proportionnelle à ϵ et Φ_f . Est un paramètre simple qui permet d'effectuer des comparaisons entre plusieurs molécules fluorescentes. C'est également un paramètre qui donne un aperçu de l'intérêt biologique d'un composé pour du marquage fluorescent. Il est généralement reconnu qu'une brillance d'au moins égale à $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ permet une utilisation confortable du fluorophore, du point de vue de l'intensité du signal [1].

Le composé **4b** présente de bonnes valeurs de brillance dans tous les solvants et la valeur la plus grande est obtenu dans l'ACN de l'ordre $4036 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Le composé **5b** donnent une bonne brillance uniquement dans le DMSO et le DMF. Le composé **6b** donne de bonnes valeurs dans tous les solvants sauf le chloroforme qui donne une valeur faible. D'après ces résultats on peut conclure que les produits **4b**, **5b** et **6b** peuvent être utilisés ultérieurement dans le domaine biologique comme sonde fluorescente.

Tableau II. 3 : La Brillance des composés **4-6b**

Composé	Solvant	$\epsilon \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)}$	$\Phi_f \times 10^{-2}$	B
5b	DMSO	19437,5	09.25	1978
	ACN	4037,5	07.69	310
	DMF	12092,5	09.61	1162
	Ethyl acetate	9300,0	05.30	493
	THF	2442,5	07.65	187
4b	DMSO	24497,5	10.06	2464
	ACN	18027,5	22.39	4036
	DMF	15802,5	21.46	3391
	Ethyl acetate	23217,5	10.06	2336
	CH ₂ Cl ₂	32572,5	08.91	2902
	CHCl ₃	22240	16.15	3592
6b	DMSO	29007,5	09.64	2796
	ACN	26500	09.64	2555
	DMF	24387,5	12.33	3007
	Acetone	26787,5	12.46	3337

	Ethyl acetate	19052,5	08.64	1646
	CH ₂ Cl ₂	14147,5	11.88	1680
	CHCl ₃	17550	17.28	303

IV- Estimation des moments dipolaires de l'état excité et de l'état fondamental

L'effet du solvant sur les propriétés d'absorption et de fluorescence des composés organiques a fait l'objet de nombreux travaux intéressants [12]. L'excitation d'une molécule par absorption de photons provoque une redistribution des charges qui induit à 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. Le moment dipolaire de l'état excité des molécules des composés fluorescents, détermine également l'énergie d'émission en fonction de la polarité moyenne.

Les méthodes actuellement disponibles pour l'estimation des moments dipolaires à l'état excité simples 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 [14] et le dichroïsme électriques [16] sont généralement considérées comme étant très précis, mais leur utilisation est limitée car cela nécessite un équipement très sensible, en effet les études réalisées dans ce domaine ont jusqu'ici été pratiquement limitées à des molécules simples.

Le procédé solvatochromique est basé sur le déplacement des maximums de l'absorption UV/Visible et de la fluorescence dans des solvants de polarités différentes. IL a été montré que dans des conditions appropriées, la méthode solvatochromique donne des résultats assez satisfaisants. 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 large expérience et des études théoriques sur les moments dipolaires à l'état fondamental et à l'état excité d'une variété de composés organiques fluorescents tels que la coumarine [11-14].

Le moment dipolaire de la molécule à l'état excité, est déterminé par l'effet d'un champ électrique (interne ou externe) à la position de la bande spectrale. L'influence du solvant sur le maximum de la bande d'absorption et de fluorescence est utilisée pour estimer les moments dipolaires à l'état d'excitation de molécules différentes. Deux méthodes selon l'effet interne de champ électrique (solvatochromism) ont été utilisées dans la recherche actuelle.

❖ Méthode I

La dépendance du solvant sur le maximum de la bande d'absorption et de fluorescence est employée pour estimer le moment dipolaire de l'état excité de différentes molécules. Les équations [éq. (1) et (2)] qui donnent les meilleurs résultats dans le changement des moments dipolaires d'une molécule excitée ont été suggérées par A. Kawski et P. Bojarski [42,43]:

La différence $\bar{\nu}_{abs} - \bar{\nu}_{em}$:

$$\bar{\nu}_{abs} - \bar{\nu}_{em} = S_1 f(\epsilon, n) + const \quad \text{Eq. (1)}$$

Et la somme $\bar{\nu}_{abs} + \bar{\nu}_{em}$:

$$\bar{\nu}_{abs} + \bar{\nu}_{em} = -S_2 \Phi(\epsilon, n) + const \quad \text{Eq. (2)}$$

Où

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

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

Dans ces équations, $\bar{\nu}_{abs}$ et $\bar{\nu}_{em}$ sont les maximums d'absorption et d'émission (cm^{-1}), respectivement, n et ϵ sont l'indice de réfraction et la constante diélectrique des solvants, respectivement.

L'expression des paramètres $f(\epsilon, n)$ et $\Phi(\epsilon, n)$ sont donnés par A. Kawski et coll [42]:

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

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

À partir des Eqs. (1) et (2) l'expression des pentes S_1 et S_2 sont données par:

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

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

μ_g et μ_e sont les moment dipolaires à l'état fondamental et à l'état excité respectivement

h et c sont la constante de Planck et la célérité de la lumière respectivement

a_0 est le rayon moléculaire donné par l'équation de Suppan [44,45]: $a_0 = (3M / 4\pi\delta N)^{1/3}$,

où : δ est la densité moléculaire, M est la masse molaire et N c'est le nombre d'Avogadro

Les moments dipolaires sont calculés par les équations 9-11 suivantes :

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

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

Ou en divisant l'Eq. (10) par l'Eq. (9)

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

Les pentes S_1 et S_2 sont déterminées graphiquement en traçant $\bar{\nu}_{abs} - \bar{\nu}_{em}$ et $\bar{\nu}_{abs} + \bar{\nu}_{em}$ en fonction de $f(\varepsilon, n)$ et $\Phi(\varepsilon, n)$ respectivement, pour différents solvants.

Les déplacements de Stokes ont été calculés à partir des spectres d'absorption et d'émission (tableau II.2). Les changements sur les pics d'émission avec le changement de polarité des solvants sont plus marqués que celles des pics d'absorption. Cela indique que $\Delta\mu$ est positif, ce qui signifie que le moment dipolaire à l'état excité de la molécule augmente.

Le tableau II. 4 résume les valeurs des propriétés des solvants et des paramètres de polarité calculés $f(\varepsilon, n)$ et $\Phi(\varepsilon, n)$.

Tableau II. 4 : Caractéristiques spectroscopiques et photophysiques de **4b**, **5b**, **6b** dans différents solvants.

Composé	Solvant	$\bar{\nu}_a$ (cm ⁻¹)	$\bar{\nu}_f$ (cm ⁻¹)	$\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f$ (cm ⁻¹)	$\bar{\nu}_a + \bar{\nu}_f$ (cm ⁻¹)
5b	DMSO	28985	20080	8905	49066
	ACN	29154	20161	8993	49316
	DMF	29070	20121	8949	49190
	Acetone	29240	20161	9078	49401
	Ethyl acetate	29498	20284	9214	49782
	THF	29498	20284	9214	49782
	CH ₂ Cl ₂	29412	20243	9169	49655
4b	DMSO	34246	19763	14484	54009
	ACN	34722	20161	14561	54883
	DMF	34483	20080	14403	54563
	Acetone	35088	20243	14845	55331
	Ethyl acetate	35714	20325	15389	56036
	CH ₂ Cl ₂	34965	20161	14804	55126
	CHCl ₃	35461	20080	15381	55541
6b	DMSO	26385	21276	5109	47661
	ACN	25641	21505	4136	47146
	DMF	26667	21978	4689	48645
	Acetone	26455	21645	4810	48100
	Ethyl acetate	25063	21692	3371	46755
	CH ₂ Cl ₂	25000	21505	3495	46505
	CHCl ₃	24814	21739	3075	46553

Tableau II. 5 : Résumé des valeurs des propriétés des solvants et des paramètres de polarité calculées $f(\varepsilon, n)$, $\Phi(\varepsilon, n)$ et E_T^N des solvants

Solvants	μ	ε	n	$f(\varepsilon, n)$	$\Phi(\varepsilon, n)$	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
THF	1.75	7.58	1.4072	0.549	0.551	0.207
Ethyl acetate	1.88	6.02	1.3720	0.489	0.996	0.228
Acetone	2.88	20.70	1.3586	0.790	1.279	0.355
ACN	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

La figure II.26 montre le graphique de $(\bar{v}_a - \bar{v}_f)$ en fonction de $f(\epsilon, n)$, et la figure II.27 montre le graphique de $(\bar{v}_a + \bar{v}_f)$ en fonction de $\Phi(\epsilon, n)$. Les pentes ont été ensuite obtenues à partir de ces graphiques.

Les coefficients de corrélation, les pentes et les ordonnées à l'origine sont indiqués dans le tableau II.6.

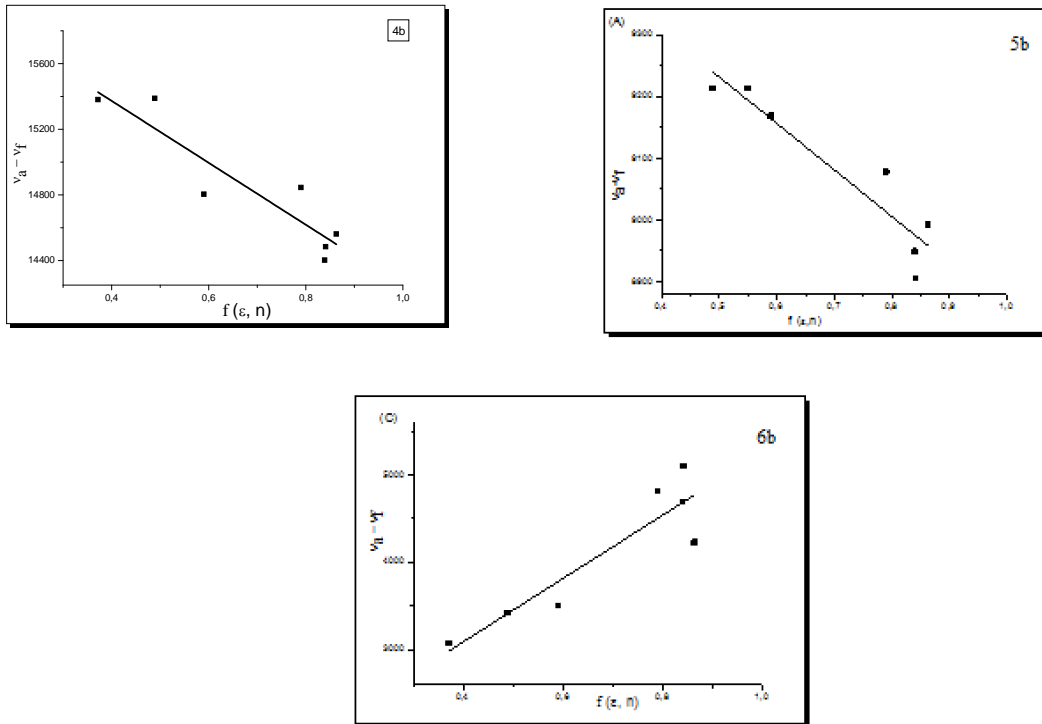
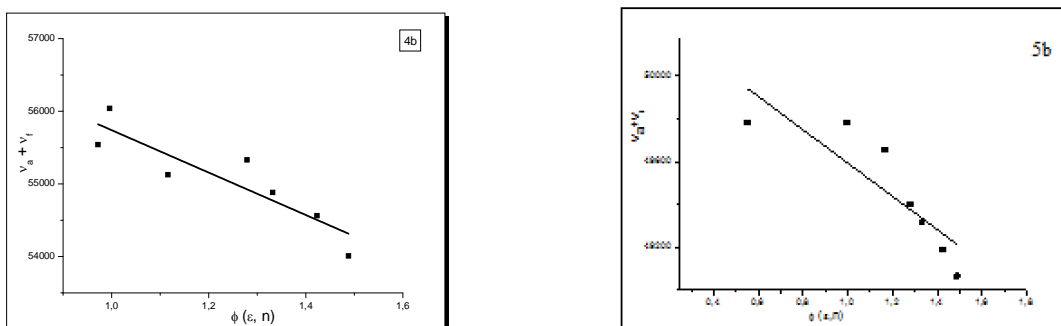


Figure II.26: Les variations de Stokes en fonction de $f(\epsilon, n)$ en utilisant l'équation (1) dans différents solvants: **4b**, **5b** et **6b**



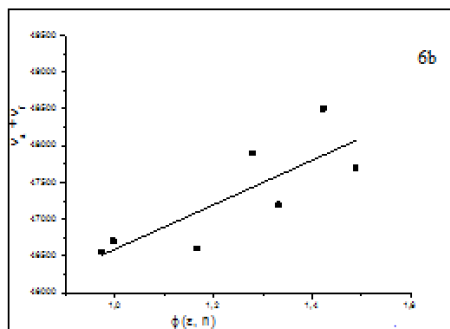


Figure II. 27 : Variation de la somme arithmétique des déplacements Stokes en fonction du $\Phi(\varepsilon, n)$ en utilisant l'équation (2) dans différents solvants des composés **4b**, **5b**, **6b**

❖ Méthode II

La dépendance de la polarisation et la liaison d'hydrogène ont été corrélés avec la polarité microscopique du solvant E_T^N qui est une mesure empirique basée sur le comportement solvatochromique des colorants de bétaine comme corps dissous. La base théorique pour la corrélation du décalage spectral avec E_T^N a été développée par Ravi et coll. [46] selon l'équation (12) :

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

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

Où $\Delta\mu_b = 9D$ et $a_b = 6.2 \text{ \AA}$ sont le changement du moment dipolaire de l'excitation et du rayon du colorant bétaine; $\Delta\mu$ et a_0 sont les valeurs correspondantes de la molécule dissoute dans le solvant à étudier. E_T^N est défini par l'équation (14), en utilisant l'eau ($E_T^N = 1$) et le tétraméthylsilane ($E_T^N = 0$) comme solvants de référence et les valeurs obtenues sont données dans le tableau II.3.

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

Le changement du moment dipolaire ($\Delta\mu$) peut être déterminé par l'équation (15) :

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

D'où S_3 est déterminées graphiquement en traçant $\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f$ en fonction de la polarité microscopique du solvant (E_T^N) en employant l'équation (12) pour différents solvants (Figure

II. 11). La valeur de la pente, de l'ordonnée à l'origine et du facteur de corrélation sont donnés dans le tableau II.6. Les résultats obtenus par les deux méthodes montrent un bon facteur de corrélation ce qui confirme l'évolution et la variation du moment dipolaire en fonction de la polarité du solvant.

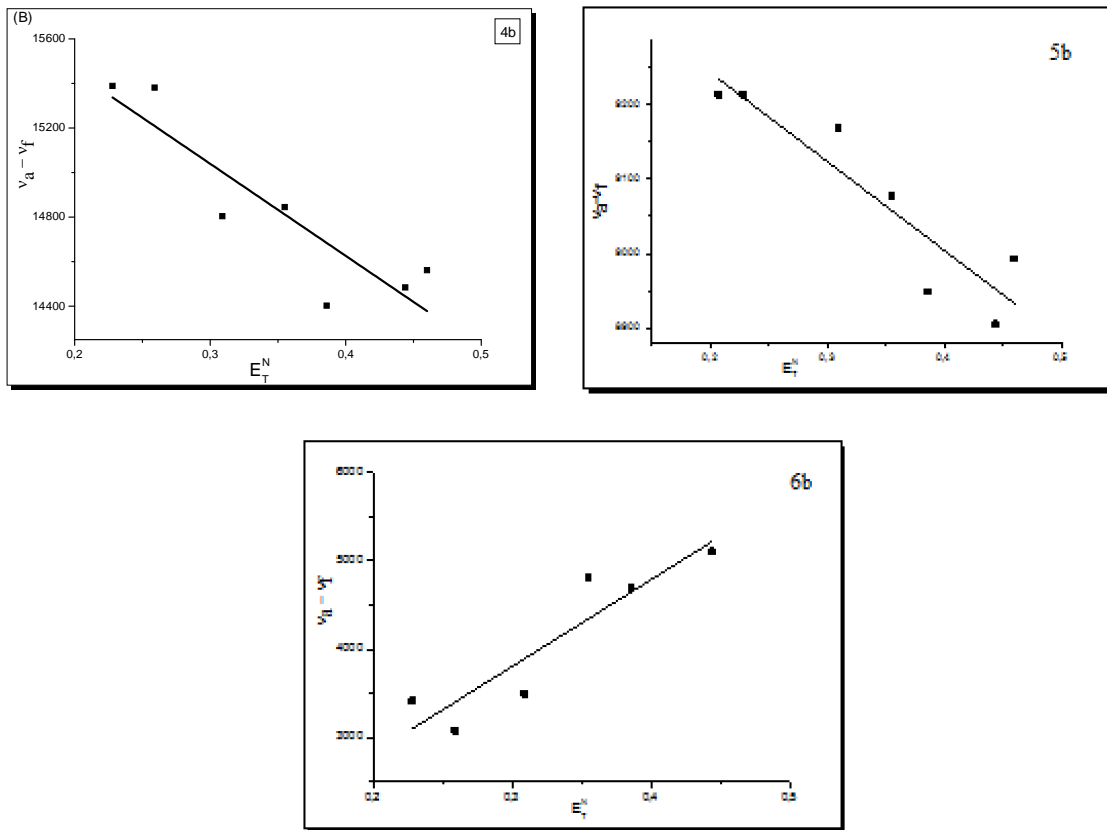


Figure II.28 : Les variations de $\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f$ en fonction de (E_T^N) (Eq. 12)

L'ensemble des résultats calculés par la méthode I et II sont représentés dans le tableau II.6 et II.7. Les valeurs des moments dipolaires de l'état fondamental et de l'état excité et du rapport $(\frac{\mu_e}{\mu_g})$ de la molécule a été estimée à partir des équations (9-11) et sont reportés dans le tableau 6. En outre, la variation du moment dipolaire a été calculée à partir des valeurs estimées de μ_g et μ_e pour la méthode 1 et par l'équation 15 pour la méthode 2 et les résultats sont représentés dans le tableau II.7.

Tableau II.6 : Traitement statistique des corrélations des déplacements spectraux des solvants de **4b**, **5b** et **6b**

Composé	Pente	Ordonnée à l'origine (cm ⁻¹)	Coefficient de Corrélation	Nombre de données
Eq. (1) corrélation				
5b	-754.19468	9609.07997	0.94	7
4b	-1887.1776	16127.75109	0.92	7
6b	3018.44193	1638.87628	0.91	7
Eq. (2) corrélation				
5b	-777.56346	50370.74787	0.87	7
4b	-2919.20397	58659.23848	0.90	7
6b	3626.4352	43576.19523	0.81	7
Eq. (12) corrélation				
5b	-1195.72397	9482.65494	0.92	7
4b	-4133.40614	16279.37777	0.90	7
6b	9827.72125	854.54737	0.92	7

Tableau II.7 : Rayon moléculaire, moment dipolaire de l'état fondamental, de l'état excité et la variation du moment dipolaire (en Debye, D)

Composés	Rayons (Å ^o)	μ_g (D) ^a	μ_e (D) ^b	$\Delta\mu$ (D) ^c	μ_e/μ_g ^d	$\Delta\mu$ (D) ^e
5b	4.812	0.49	3.217	3.168	6.565	3.466
4b	4.821	1.457	6.785	5.328	4.657	3.731
6b	5.008	0.549	6.004	5.455	10.936	6.076

Debye = 3.33564×10^{-30} C.m = 10^{-18} esu C.m.

^(a) Moment dipolaire expérimentale de l'état fondamental calculé à partir de l'Eq (9).

^(b) Moment dipolaire expérimentale de l'état excité calculé à partir de l'Eq. (10).

^(c) le moment dipolaire calculé à partir de la différence entre μ_g et μ_e

^d Rapport de μ_e et μ_g calculé à partir de l'Eq. (11)

^e changement du moment dipolaire calculé d'après le paramètre du polarité microscopique du solvant (E_T^N) Eq. (15).

Les moments dipolaires de tous les composés coumarine-DHPMs **4b**, **5b** et **6b** étaient plus élevés dans l'état excité comparés à l'état fondamental. Le moment dipolaire change avec la nature du substituant présenté sur la structure de la coumarine. Nous avons observé un accord juste dans le changement de moment dipolaire ($\Delta\mu$) du **4b**, **5b** et **6b** confirmant que

ces dérivés sont plus polaires dans leur état excité-singlet que dans leur état fondamental. Ceci est dû à une meilleure stabilisation sous excitation qui est compatible avec l'analyse des décalages de Stokes. Après examen des résultats, il apparaît que la présence du processus de transfert de charge intramoléculaire qui se produit lors de la photo-excitation est non seulement due à la polarité du solvant, mais est également fortement régie par la capacité de liaison hydrogène en ce qui concerne les effets solvatochromes de DMF et le DMSO qui sont accepteurs forts de liaison hydrogène.

Les valeurs élevées du μ_e et du μ_g et la variation du moment dipolaire pour tous les composés **4b**, **5b** et **6b** peuvent être compris en termes de leurs structures de résonance possibles, comme illustré sur les figures II.10, 11 et 12. Le fragment DHPM dans **4b**, **5b** et **6b** ne produit pas un changement considérable de la mobilité des électrons π . Lors de l'excitation le groupe carbonyle devient un donneur d'électrons fort. Le groupe hydroxyle contribue mieux à la résonance de la mobilité des électrons π . Ceci explique la valeur la plus élevée du moment dipolaire dans les deux états excités pendant le processus de transfert de charge; le groupe -OH peut devenir plus polaire par rapport à l'état S_0 .

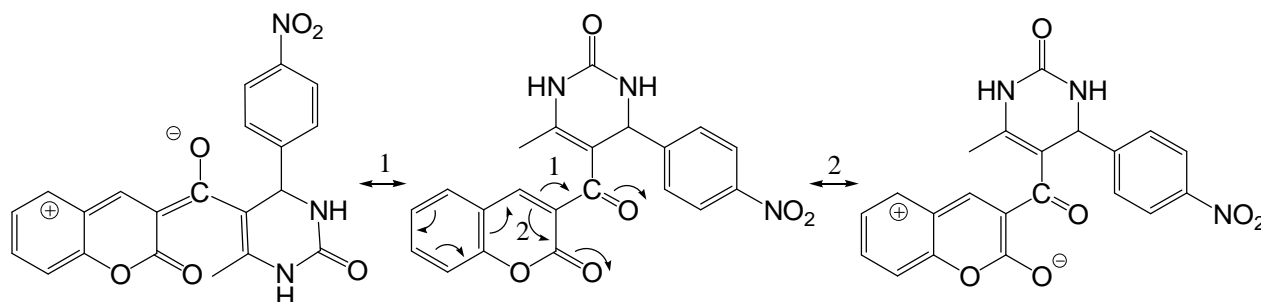


Figure II.29: Les résonances possibles de la structure de **4b**

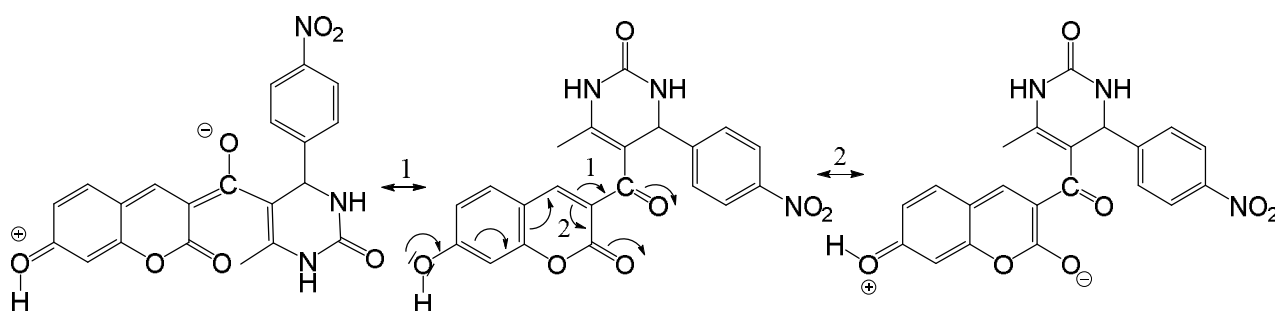


Figure II.30: Les résonances possibles de la structure de **5b**

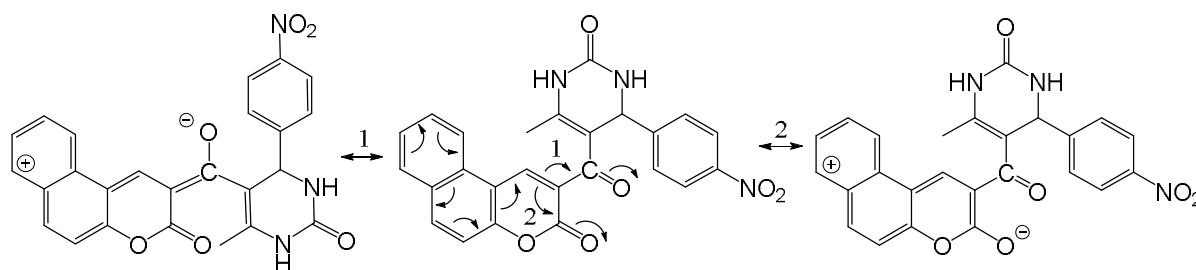
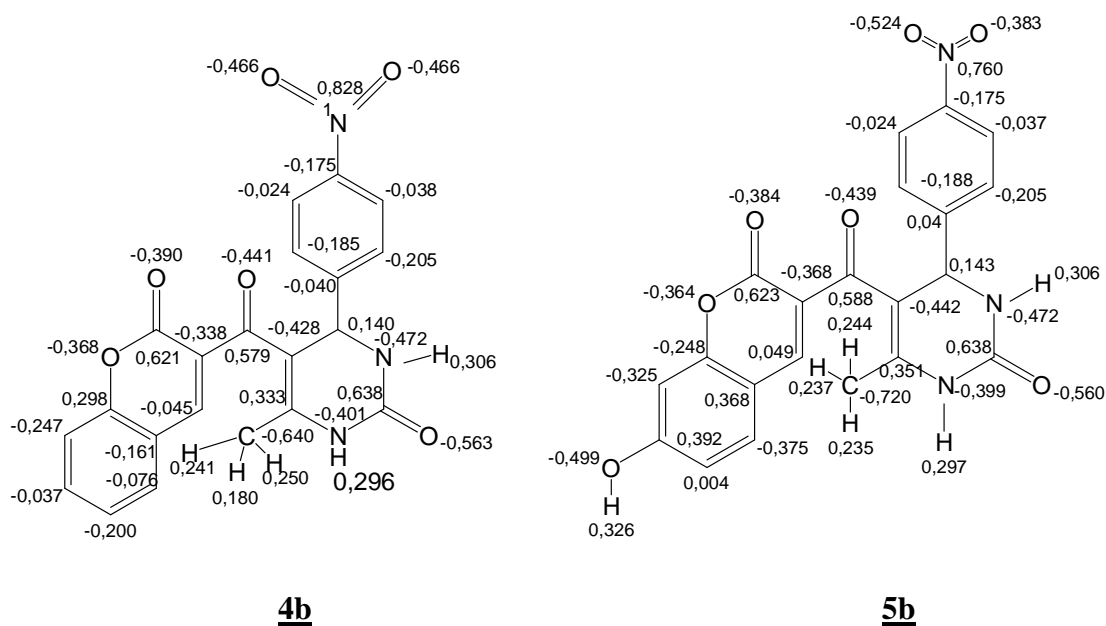
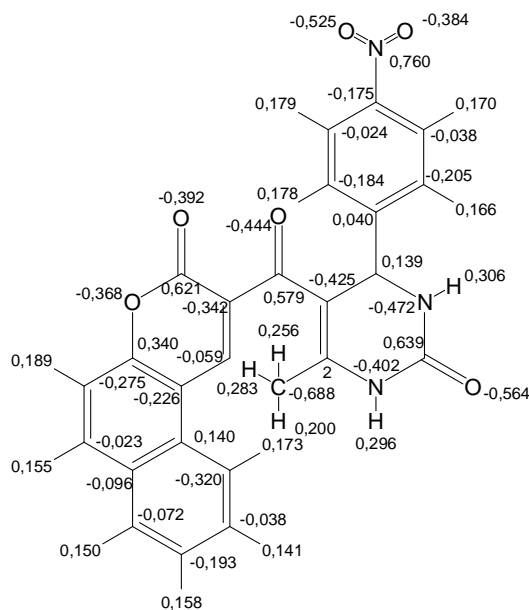


Figure II.31: Les résonances possibles de la structure de **6b**

V- Calculs semi-empiriques de charges

Les calculs semi-empiriques des charges de Mulliken en utilisant la méthode semi-empirique Hamiltonienne PM6 Gaussian 09W [49], montrent que les atomes d'oxygène du pôle électro-attracteur (carbonyles de la coumarine) sont plus négatifs dans le cas de la molécule **6b** et **4b** que dans **5b**. Cela explique l'approche du solvant polaire et l'augmentation du moment dipolaire à l'état excité pour **6b** et **4b** plus que **5b**.



**6b****Figure II.31** : Charges de Mulliken calculées avec PM6-Gaussian 09W

Cette partie à fait l'objet d'une publication dans le journal of Molecular liquids [48]

VI- Conclusion

L'effet du solvant sur les spectres d'absorption et d'émission des trois coumarine-3,4-dihydropyrimidinones **4b**, **5b** et **6b** est décrit. Un déplacement bathochrome est observé lors de l'augmentation de la polarité du solvant. Les changements dans les pics d'émission avec des changements de polarité du solvant sont plus prononcés que ceux des pics d'absorption qui indiquent de la hausse des moments dipolaires dans l'état excité que dans l'état fondamental.

Sur la base de ces résultats, nous pouvons conclure qu'un transfert de charge intramoléculaire se déroule dans l'état singulet excité, ce qui entraîne une amélioration de la polarité.

Nous avons constaté que les molécules possèdent des valeurs du moment dipolaire dans l'état excité plus élevées par rapport à l'état fondamental et le moment dipolaire de **4b** et **6b** sont plus élevés que celui de **5b**. Ceci pourrait être attribué à l'effet de résonance électronique intense de groupe carbonyle dans l'état singulet excité. Les interactions entre les systèmes π et le chromophore $C = O$ conduit à une forte délocalisation de l'état excité qui rend les molécules beaucoup plus polaires, conduisant ainsi à des valeurs supérieures de moments dipolaires.

La même chose est vraie pour l'effet mésomère de la fonction hydroxyle qui montre le même effet donneur. En outre, les moments dipolaires μ_g et μ_e étaient plus grands pour **4b** qui présente un petit rayon Onsager calculé par ChemOffice. Les valeurs mesurées de μ_g et μ_e pour les trois composés diffèrent les uns des autres, ce qui peut être dû à des différences structurelles entre eux.

Coumarine-DPMs **4b**, **5b** et **6b** sont caractérisés par un bon rendement quantique de fluorescence, même dans un milieu apolaire, comme indiqué dans la littérature [17] pour les coumarines. Ces composés hybrides pourraient être utilisés pour une nouvelle génération de sondes fluorescentes, combinant les excellentes propriétés optiques des coumarine-DHPMs hybrides avec la simplicité de leur synthèse.

Références Bibliographiques

- [1] Chamas Zein El Abidine: chromophores pentacycliques azotés fluorescents: Nouvelle Cascade Diastéréosélective Pallado- catalysée et Exploration de leurs propriétés biologiques. these de doctorat, Université de Lorraine 2012 .
- [2] Lakowicz, J. R. "Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3 rd Edition, Springer, New York, 2006.
- [3] Kasha, M., Characterization of Electronic Transitions in Complex Molecules; Discuss. Faraday Soc.1950, Vol 9, pages 14.
- [4] Lavis, L. D.; Raines, R. T. Bright Ideas for Chemical Biology, ACS Chem. Biol.,2008, Vol 3, page 142.
- [5] Weber, G. "Intramolecular Transfer of Electronic Energy in Dihydrodiphosphopyridine Nucleotide."; Nature, 1957, Vol 180, page1409.
- [6] Whitby, L.G. A New Method for Preparing Flavin-Adenine Dinucleotide , Biochem. J., 1953, Vol 54, page 437.
- [7] Cavaluzzi, M.J.; Borer, P.N. "Revised UV Extinction Coefficients for Nucleoside-5'-Monophosphates and Unpaired DNA and RNA." ; Nucleic Acids Res.2004, Vol 32, page 13.
- [8] Weber, G. "Polarization of the Fluorescence of Macromolecules II. Fluorescent Conjugates of Ovalbumin and Bovine Serum Albumin, Biochem. J., 1952, Vol 51.
- [9] Daniel, E.; Weber, G. Cooperative Effects in binding by Bovine Serum Albumin. i. The Binding of 1-Anilino-8-Naphthalenesulfonate. Fluorimetric Titrations, Biochemistry ,1966, Vol 5, pages 1893.
- [10] Weber, G.; Farris, F. J., Synthesis and Spectral Properties of a Hydrophobic Fluorescent Probe: 6-Propionyl-2-(Dimethylamino) Naphthalene, Biochemistry, 1979, Vol 18, pages 3075.
- [11] Hudson, E. N.; Weber, G." Synthesis and Characterization of Two Fluorescent Sulfhydryl Reagents." Biochemistry 1973, Vol 12, pages 4154.
- [12] Karpovich, D.S.; Blanchard, G. J. "Relating the Polarity-Dependent Fluorescence Response of Pyrene to Vibronic Coupling. Achieving a Fundamental Understanding of the Py Polarity Scale". J. Phys. Chem. 1995, Vol 99, pages 3951.
- [13] Haugland, R. P; Spence, M. T. Z.; Johnson, I. D.; Basey, A. "The Handbook: a Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies. Vol.10th Ed..Molecular Probes." ; Eugene, OR, 2005.

- [14] Gunnlaugsson, T.; Glynn, M.; Tocci, G. M. ; Kruger, P.E. ; Pfeffer, F.M. "Action Recognition and Sensing in Organic and Aqueous Media Using Luminescent and Colorimetric .Sensors." ;Coord. Chem. Rev. 2006, Vol 250, page 3094.
- [15] Süßmeier, F.; Langhals, H. ." Novel Fluorescence Labels: the synthesis of Perylene - 3,4,9-Tricarboxylic Imide." ; Eur. J. Org. Chem 2001, pages 607.
- [16] Kohl, C; Weil, T.; Qu, J. ; Müllen, K. "Towards Highly Fluorescent and Water-Soluble Perylene Dyes." ; Chem. Eur. J. 2004, Vol 10, pages 5297.
- [17] Eaton, D. F. "Reference Materials for Florescent Measurement. Pure Appl. Chem.1988, Vol 60, pages 1107-1114.
- [18] Schulman, S. G.; Threatte, R. M.; Capomacchia, A. C.; Paul, W. L. "Fluorescence of 6-Methoxyquinoline, Quinine, and Aqueous Media." J. Pharm. Sci. 1994, Vol 63, pages 876.
- [19] Sun, W.C.; Gee, K. R. ; Haugland, R. P. "Synthesis of Novel Fluorinated Coumarins: Excellent UV-Light Excitable Fluorescent Dyes." ; Bioorg. Med. Chem. Lett. 1998, Vol 8, pages 3107.
- [20] Grandberg, I.I.; Denisov, L.K.; Popova, O.A. "7-Aminocoumarins." ; Chem. Heterocycl. Compd. (N.Y) **1987**, Vol 23, pages117.
- [21] Puliti, D. " Sondes Fluorogéniques Pour la Détection et l'étude de la Dynamique de protéines Cellulaires. " Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, France, **2010**.
- [22] Anderson, M. T. ; Baumgarth, N.; Haugland, R. P.; Gerstein, R. M.; Tjioe, T.; Herzenberg, L.A.; " Paris of Violet-Light-Excited Fluorochromes for Flow Cytometric Analysis." ; Cytometry **1988**, Vol 33, pages 435-444.
- [23] Lavis, L. D.; Chao, T. Y.; Raines, R. T. "Fluorogenic Label for Biomolecular Imaging. ACS Chem. Biol. 2006, Vol 1, pages 252.
- [24] Lee, L. G.; Berry, G. M.; Chen, C.H." Vita Blue: a New 633-Nm Excitable Fluorescent Dye for Cell Analysis." Cytometry **1989**, Vol 10, pages 151.
- [25] L. Wu, X. Wang, W. Xu, F. Farzaneh, R. Xu The structure and pharmacological functions of coumarins and their derivatives Curr. Med. Chem., 2009, Vol164,pages 236.
- [26] Aberloa T.L., Aberloa I.L., Journal of luminescence.,1996,Vol 68, pages 149.
- [27] Giri.R, Spectrochimica Acta,1992,Vol 48, page 843.
- [28] Felipe Vitorio, Thiago Moreira Pereira, Rosane Nora Castro,Guilherme Pereira Guedes, Cedric Stephan Graebin and Arthur Eugen Kummerle : Synthesis and mechanism of novel fluorescent coumarin–dihydropyrimidinone dyads obtained by the Biginelli multicomponent reaction, Royal Society of Chemistry, 2015.

- [29] Aoife L., O'Kenedy R. Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. *Curr. Pharm. Design.*; 2004, Vol 10 ; pages 3797-3811.
- [30] Khan I., Kulkari M.V., Gopal M., Shahabuddin., Synthesis and biological evaluation of novel angularly fused polycyclic coumarins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2005, Vol 15: pages 3584-3587.
- [31] Olimpo, G., Osvaldo, Y., Antonio G., Mena, N., Marco, T. Synthesis of Coumarin Derivatives as Fluorescent probes for membrane and cell dynamics studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, Vol 76, pages 79-86.
- [32] Z. Yang, J. Cao, Y. He, J. H. Yang, T. Kim, X. Peng, J. S. Kim, *Chem. Soc. Rev.* 2014, Vol43, pages 4563.
- [33] P. Pallavicini, V. Amendola, C. Massera, E. Munduma, A. Taglietti, *Chem. Commun.* 2002, pages 2452.
- [34] K. V. Sashidhara, M. Kumar, R. Sonkar, B. S. Singh, A. K. Khanna, G. Bhatia, *J. Med. Chem.* 2012, Vol 55, pages 2769.
- [35] M. A. Musa, J. S. Cooperwood, M. O. Khan, *Curr. Med. Chem.* 2008, Vol 15, pages 2664-2679.
- [36] K. V. Sashidhara, S. R. Avula, K. Sharma, G. R. Palnati, S. R. Bathula, *Eur. J. Med. Chem.* 2013, Vol 60 , pages 120.
- [37] P. Dahiya, M. Kumbhakar, T. Mukherjee, H. Pal, *Chem. Phys. Lett.* 2005, Vol 414 pages 148.
- [38] Amina Benazzouz , Malika Makhoulfi-Chebli, Baya Boutemour-Kheddis, Artur m. S. Silva et Maamar Hamdi , A facile synthesis of new coumarin-3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones/thiones dyads, *tetrahedron*, June 2015, Vol 71, Pages 3890.
- [39] A. S. Satpati, M. Kumbhakar, S. Nath, H. Pal, *Photochem. Photobiol.* 2009, Vol 85 page 119.
- [40] D. Panda, A. Datta, *J. Chem. Phys.* 2006, Vol 125 page 4513.
- [41] M. Cigàn, J. Donovalová, V. Szöcs, J. Gaspar, K. Jakusová, A. Gaplovsky, *J. Phys. Chem. A* .2013, Vol 117 , pages 4870.
- [42] Kawski A.: *Progress in Photochemistry and Photophysics*, J.R. Rabek (Ed.), CRC, New York, 1992, pages 1.
- [43] Kawski A., Bojarski P., *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2011, Vol 82 pages 527–528.

- [44] P. Suppan and N. Ghoneim, Solvatochromism, the Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1997.
- [45] P. Suppan, Chem. Phys. Lett. 1983, Vol 94, page 272.
- [46] Ravi M., Soujanya T., Samanta A., Radhakrishnan T. P., J. Chem. Soc., 1995, Vol 91, pages 2739.
- [47] R. D. Dennington, T.A. Keith, J.M. Millam, Gaussian 09W and GausView 5.0.8. Semichem 2000.
- [48] Amina Benazzouz, Malika Makhloufi-Chebli, Safouane M. Hamdi, Baya Boutemour-Kheddis, Artur M.S. Silva, Maamar Hamdi : Study of novel fluorescent coumarin-3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones dyads. Estimation of ground- and excited-state dipole moments from a solvatochromic shift, Journal of Molecular Liquids, 2016, Vol 219, pages 173.
- [49] Gaussian 09W.

Partie iii

Evaluation de l'activité biologique des molécules hybrides coumarin-3,4-dihydropyrimidinones

A- Activité antioxydante

I- Introduction

De nos jours, il existe un intérêt croissant vis-à-vis de la biologie des radicaux libres. Ce n'est pas seulement dû à leur rôle dans des phénomènes aigus tels que le traumatisme ou l'ischémie, mais aussi à leur implication dans de nombreuses pathologies chroniques associées au vieillissement tels que le cancer, les maladies cardiovasculaires et inflammatoires ainsi la dégénérescence du système immunitaire [1].

L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydoréduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. Bien que les réactions d'oxydation soient nécessaires à la vie, elles peuvent aussi produire des radicaux libres qui entraînent des réactions en chaîne destructrices. Les radicaux libres sont générés naturellement au cours du métabolisme normal de l'oxygène in vivo en très faible quantité mais peuvent être libérés suite à un stress oxydatif [2].

En effet, les antioxydants font l'objet de nombreuses recherches et une nouvelle haleine vers l'exploitation des métabolites secondaires généralement et les polyphénols particulièrement tant dans la santé et vis-à-vis des maladies pernicieuses (cancer) que dans l'industrie agro-alimentaire. Ces composés qui sont représentés par la famille des Flavonoïdes, Coumarines, Xanthonnes et les Acides hydroxycinamiques sont largement recherchés pour leurs propriétés biologiques: antioxydantes, anti-inflammatoires, antiallergiques et anti-carcinogènes. Notons que l'efficacité puissante de ces substances à stopper les réactions radicalaires en neutralisant les radicaux libres est due principalement à leurs structures phénoliques avec la présence des groupements hydroxyyles.

II- Composés phénoliques

Selon leurs caractéristiques structurales, ils se répartissent en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions

hydroxyles (OH). Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000.

Ils sont divisés en plusieurs catégories: anthocyanes, coumarines, lignanes, flavonoïdes, tannins, quinones, acides phénols (ou acides phénoliques), xanthones et autres phloroglucinols (ou benzène-1,3,5-triol) où les flavonoïdes représentent le groupe le plus commun et largement distribué. Les polyphénols forment un très vaste ensemble de substances chimiques, ils peuvent être classifiés selon le nombre et l'arrangement de leurs atomes de carbones [1, 2].

III- Stress oxydatif

Le stress oxydatif est le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs. Il correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire. La production des ERO est normale pour tous les organismes vivants et ne constitue pas en soi une situation de stress oxydant. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense contre les radicaux libres (ERO), la cellule dispose d'un système de détoxification comprenant des enzymes comme les superoxydes dismutases, les catalases, la glutathion peroxydase, la glutathion réductase et de petites molécules telles que la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes, certains polyphénols Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydant ou par suite d'une surproduction des radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé « stress oxydant » [2].

IV- Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules portant un électron non apparié. Cette propriété rend ces éléments très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se réappairer, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne [4].

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux libres primaires, qui dérivent directement de l'oxygène. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires (radical

peroxyde $\text{ROO}\bullet$, radical alkoxyde $\text{RO}\bullet$), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule [5].

L'ensemble des radicaux libres primaires est souvent appelé "espèces réactives de l'oxygène". Cette appellation n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit : radical superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$, radical hydroxyle $\text{OH}\bullet$, monoxyde d'azote $\text{NO}\bullet$, mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante : l'oxygène singulet O_2 , peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , peroxyde nitrite ONOO^- .

La formation de radicaux libres dans l'organisme est constante et indissociable de la vie dans une atmosphère oxydante, mais les excès dépendent de facteurs extérieurs [2]:

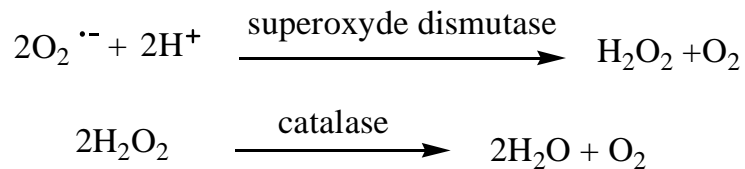
- ✚ Ils sont produits par divers mécanismes physiologiques afin de détruire des bactéries au sein des cellules phagocytaires ou pour réguler des fonctions cellulaires létales telles que la mort cellulaire programmée.
- ✚ Le contact entre l'oxygène et certaines protéines du système respiratoire, induit une production d'anions superoxydes nécessaire pour le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale.
- ✚ L'inflammation est une source importante de radicaux oxygénés produits directement par des cellules phagocytaires activées.
- ✚ Des sources importantes de radicaux libres sont les mécanismes de cycles redox qui produisent l'oxydation des molécules comme les quinones dans l'organisme.
- ✚ L'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libres selon divers mécanismes, c'est également le cas des antibiotiques et des anticancéreux.
- ✚ L'infection au virus d'immunodéficience humaine (VIH) a pour effet d'accroître la production des radicaux libres dans l'organisme.
- ✚ Certaines maladies génétiques causent une surproduction de radicaux libres ou une efficacité réduite du système de défense. Une surproduction de radicaux libres a été observée lors des maladies d'Alzheimer et de Parkinson.

V- Les antioxydants

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques d'ERO. Notre organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente de radicaux libres et on distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule.

V-1- Les antioxydants primaires

La cellule est pourvue d'enzymes antioxydants qui sont des systèmes de défense très efficaces. Cette ligne de défense est constituée de superoxyde dismutase (SOD), de catalase et de peroxydase (glutathion et ascorbate) [6, 2]. Ces enzymes antioxydants permettent l'élimination des radicaux libres primaires, selon les réactions suivantes :



De ce fait elles préviennent la formation de radicaux libres organiques à partir des lipides membranaires notamment et contribuent donc à la protection des membranes de la peroxydation lipidique [4].

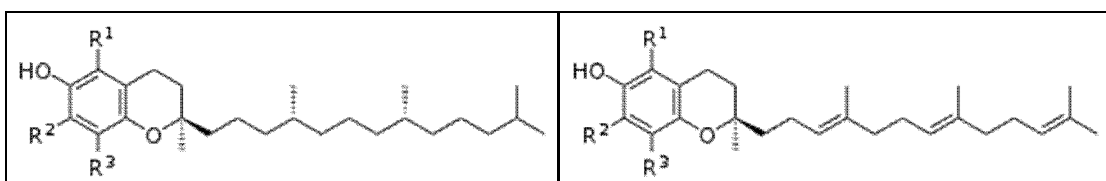
V-2- Les antioxydants secondaires

Ce sont des molécules exogènes. Contrairement aux enzymes antioxydants, une molécule d'antioxydant piège un seul radical libre. Pour pouvoir fonctionner à nouveau, cette molécule d'antioxydant doit donc être régénérée par d'autres systèmes [4].

Plusieurs substances pouvant agir en tant qu'antioxydants *in vivo* ont été proposés. Elles incluent: la vitamine E (tocophérols et des tocotriénols), l'acide ascorbique, le β -carotène, les flavonoïdes, les composés phénoliques,...etc [7].

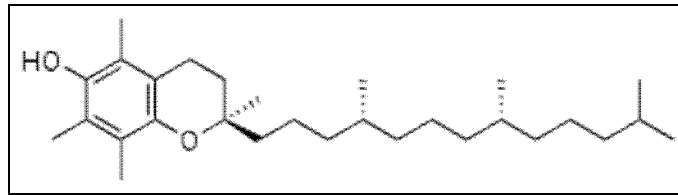
- **La vitamine E:** capable d'une part de piéger chimiquement l'oxygène singulet en s'oxydant en quinone, d'autre part, de réagir avec le radical hydroxyle.

La forme biologiquement la plus active est l' α -tocophérol, la plus abondante dans l'alimentation étant le γ -tocophérol. Ces molécules sont présentes en grande quantité dans les huiles végétales.

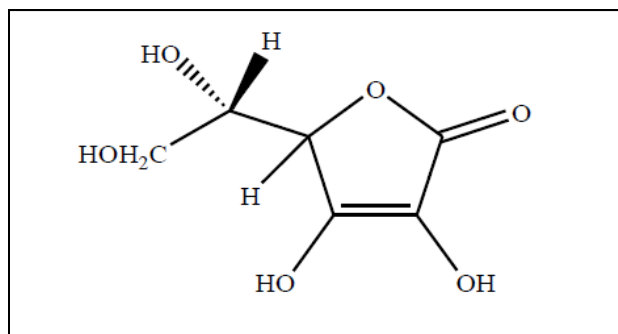


Tocophérols

Tocotriénols

 **α -tocophérol****Figure III. 1: Structure des tocophérols et des tocotriénols constituant la vitamine E**

- La vitamine C:** La vitamine C ou acide ascorbique est une vitamine hydrosoluble, sensible à la chaleur, aux ultraviolets et à l'oxygène. Après ingestion, elle passe rapidement dans le sang puis diffuse de façon variable dans tous les tissus. Un apport quotidien minimal d'origine alimentaire est donc nécessaire, celui-ci provient essentiellement des fruits et légumes frais. La vitamine C est nécessaire pour de nombreuses fonctions physiologiques de la biologie humaine. C'est un piègeur très efficace des anions superoxydes, du peroxyde d'hydrogène et de l'oxygène singulet.

**Figure III.2 Acide L-Ascorbique**

- Les Caroténoïdes:** leur rôle protecteur dans les systèmes biologiques implique la désactivation d'espèces électroniquement activées telles l'oxygène singulet et la désactivation d'espèces chimiques réactive telles les radicaux peroxydes ROO• et alkyles R•, qui peuvent être générés à l'intérieur des cellules et occasionner des dommages oxydatifs.
- Le Zinc:** joue un rôle antioxydant indirect en assurant la stabilisation de la Cu-Zn-SOD (superoxyde dismutases), cependant il possède d'autres propriétés antioxydantes dont le mécanisme précis est encore incomplètement connu.
- Le Sélénium:** joue un rôle dans la protection des cellules et de leurs constituants contre l'attaque radicalaire, le maintien de l'intégrité membranaire réduit la probabilité de propagation de lésions oxydative à des biomolécules [3].

VI- Mécanisme d'action d'un anti-oxydant

Les principaux mécanismes d'activité antioxydante sont [8] :

- le piégeage direct des EOR ;
- l'inhibition des enzymes impliquées dans le stress oxydant et la chélation des traces métalliques responsables de la production des EOR ;
- protection des systèmes de défense antioxydants

Les antioxydants sont classés selon leur mode d'action : éliminateurs de radicaux libres, chélateurs d'ions métalliques, piègeurs d'oxygène dans des systèmes fermés.

VII- Mesure de l'activité antioxydante

Il existe une multitude de tests pour la mesure de l'activité antioxydante d'un composé. Les plus utilisés sont représentés dans le tableau III.1.

Tableau III.1 : Les méthodes les plus utilisées pour mesurer l'activité antioxydante

Méthode	Réaction	Réf
Méthode FRAP (Ferric Reducing Power)	Réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}) évalue le pouvoir réducteur des composés, la lecture se fait à 700 nm	[9,10]
Méthode DPPH	Réduction du radical libre stable de 2,2-diphénylpicrylhydrazyle (DPPH), la lecture se fait à 515-518 nm selon le solvant utilisé.	[8,11]
Méthode ABTS	Le sel ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2-azino bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) perd un électron pour former un radical cation ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) de couleur sombre en solution. En présence de l'agent antioxydant, le radical ainsi formé est réduit pour donner ABTS^+ , ce qui entraîne la décoloration de la solution. La lecture se fait à 734 nm.	[10]
Méthode PPM (PhosphoMolybdate)	L'hydrogène et l'électron sont transférés vers le complexe oxydant (PPM).	[8]

VII-1- Réaction entre le radical libre DPPH et l'antioxydant

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (ou α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle) noté DPPH fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant [10]. Ce composé est disponible commercialement sous forme d'un radical stable à l'état solide. Il possède un électron non apparié sur un atome d'azote, caractérisé par son spectre d'absorption UV-visible à une longueur d'onde d'absorption en solution alcoolique à 515nm-518nm. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration, due à une recombinaison des radicaux DPPH, mesurable par spectrophotométrie UV-vis à 515-518 nm. Il réagit par arrachement d'un H à un antioxydant pour donner le 2,2-diphénylhydrazine (DPPH-H) (Figure III.3).

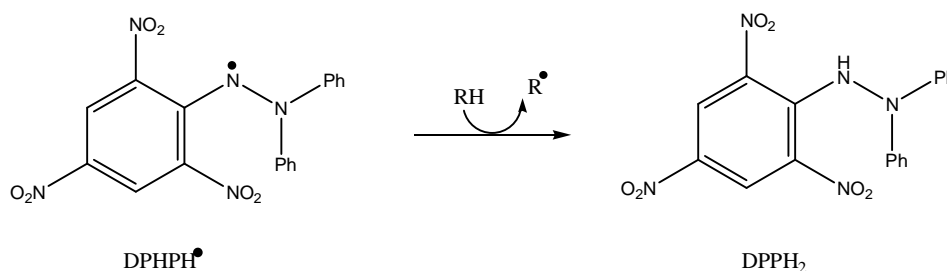


Figure III. 3 : Structure du radical DPPH[•] et produit de réduction DPPH₂

Ce test, largement utilisé, est rapide et facile à réaliser; il permet de comparer un grand nombre de composés. De plus, contrairement aux autres tests, les conditions utilisées (solvants organiques et faible température) évitent l'auto-oxydation des molécules testées. Le composé à doser est ajouté à une solution de DPPH[•] (méthanol ou éthanol). La solution est placée à l'obscurité, ensuite la réaction de transfert d'hydrogène de l'antioxydant vers le DPPH[•] est suivie par spectroscopie UV-visible en enregistrant la décroissance de la bande d'absorption du DPPH[•].

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante, deux approches sont appliquées :

- ✓ d'une part, la détermination de la réduction relative du radical DPPH à un temps de référence ou la détermination de la quantité d'antioxydant nécessaire pour réduire 50 % de DPPH (CE50%).
- ✓ et d'autre part, le suivi de la cinétique de la réduction [10,11].

Dans la première approche, l'activité est définie par l'indice de la réduction de l'activité anti-radicalaire en pourcentage % RSA (Radical Scavenger Activity), où l'absorbance du mélange réactionnel qui contient le radical libre DPPH[•] et l'échantillon de l'antioxydant (solution AX) est reliée avec l'absorbance du mélange sans aucun antioxydant (solution témoin AB ou Blanc contenant que le radical DPPH) à un temps t :

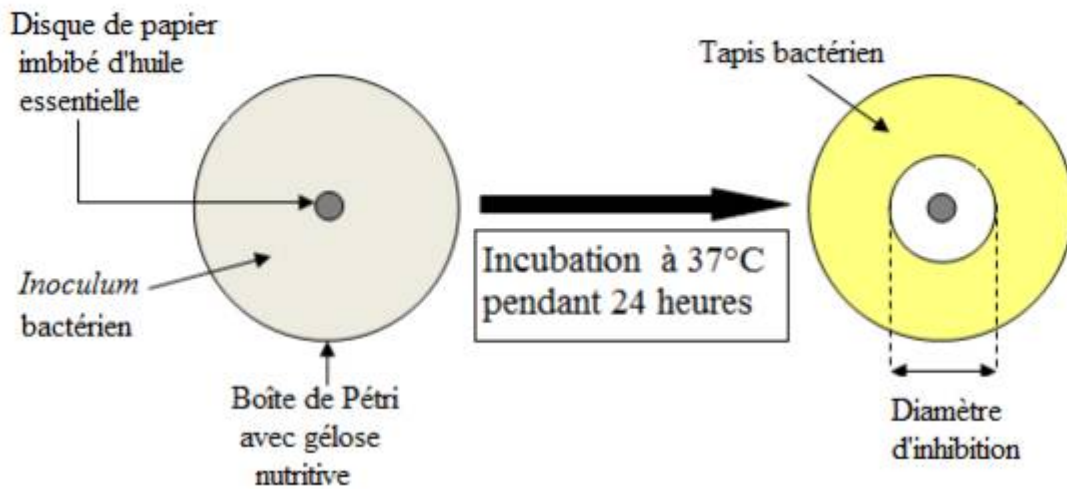
$$\% \text{ CR} = \left[\frac{\text{Abs AB} - \text{Abs AX}(t)}{\text{Abs AB}} \right] \times 100$$

Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence, comme l'acide ascorbique (vitamine C), les antioxydants synthétiques BHT (butyl-hydroxy-toluène) ou le Trolox® (acide-6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique), dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E [11].

Les résultats peuvent être exprimés en pourcentage de réduction de DPPH[•], pour une concentration en antioxydant donnée et un temps donné. L'EC50 ou IC50 (concentration en antioxydant nécessaire pour réduire de 50 % la concentration initiale en DPPH[•]) calculée pour chaque antioxydant permet de les classer entre eux. Plus l'EC50 est petite, plus la molécule est antioxydante.

B- Activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion par disque permet d'évaluer l'activité antibactérienne d'une substance. Bien qu'elle soit reconnue comme fiable et reproductible, elle est surtout utilisée en étape préliminaire à des études plus approfondies, car elle permet d'accéder à des résultats essentiellement qualitatifs. La technique utilisée est une modification de la méthode de Hayes et Markovic (2002). Elle consiste à déposer un disque stérile, imbibé de la molécule à tester solubilisé dans un solvant approprié, sur un tapis bactérien au tout début de sa croissance et de mesurer la zone où les bactéries n'ont pas pu se développer. Le diamètre d'inhibition, qui traduit l'activité antibactérienne des molécules, est ainsi déterminé.



II- Technique d'étude in-vitro du pouvoir antimicrobien

L'examen des données bibliographiques fait apparaître la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne. Selon la souche microbienne, les composés testés et l'application choisie, divers milieux de culture peuvent être mis en œuvre, plusieurs méthodes sont exploitées, en plus de la méthode de diffusion sur disque on peut citer deux méthodes :

- ❖ **Méthode de puits** : C'est une méthode fondée par Tagg et Mc Given [17], en 1971 (Figure III.4).

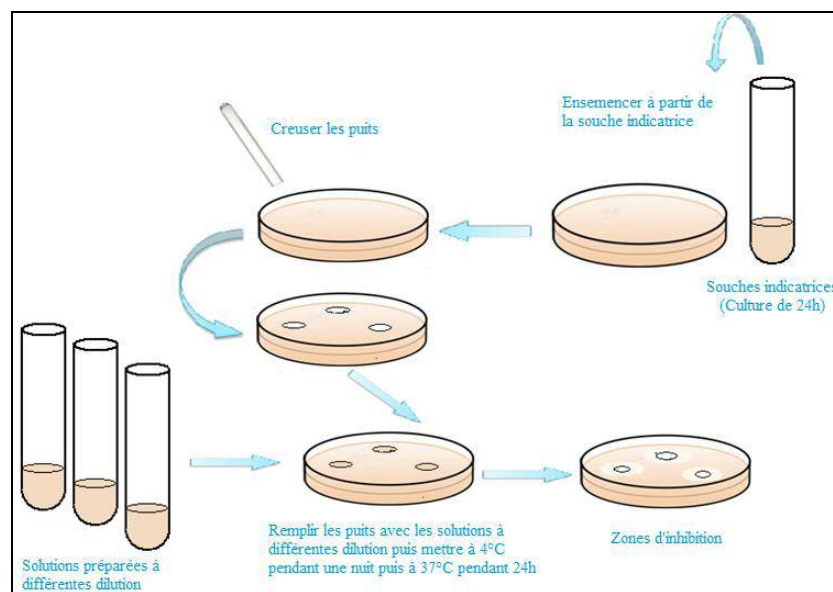


Figure III.4 : Méthode de puits

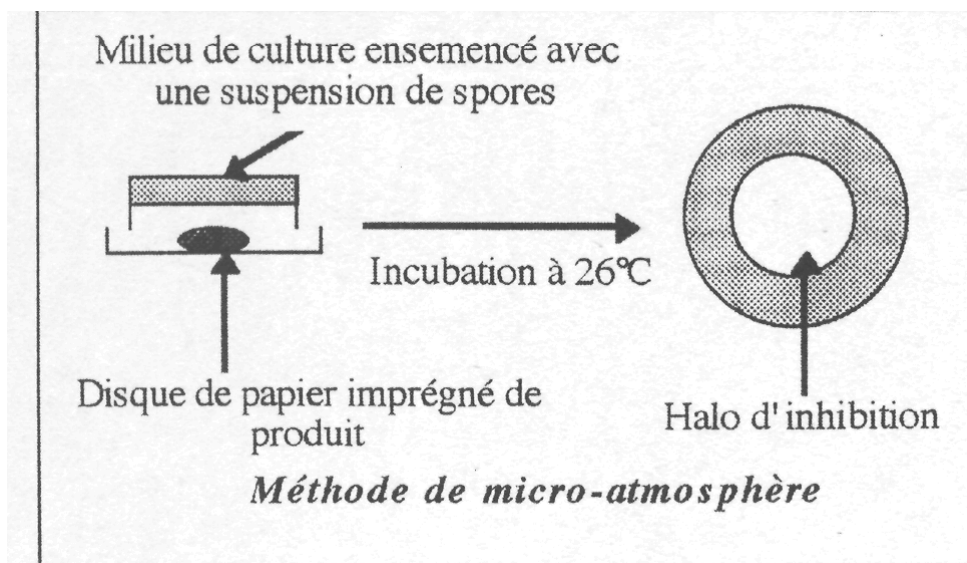
❖ **Méthode des micros-atmosphères:**

Figure III.5 : Méthode des micros atmosphères.

Dans cette méthode les boîtes de Pétri contenant un milieu de culture nutritif gélose sont préalablement ensemencées avec différentes souches. On les met à incuber en position inversé après avoir posé au milieu du couvercle, un disque de papier imbibé des produits volatils à analyser. L'extrait s'évapore progressivement dans l'atmosphère de la boîte et la phase volatile peut ainsi exercer son effet inhibiteur sur les spores. La lecture des résultats est effectuée après 24H d'incubation à 26°C. L'efficacité du produit est estimée par la mesure du diamètre des zones d'inhibition (en mm) qui se forment au-dessus des disques de papier.

III-Activité de la coumarine et quelques molécules hybrides :

Les propriétés antibactériennes des coumarines ont été identifiées pour la première fois en 1945 par Goth et autres, ils ont fait une recherche par la méthode de diffusion de disque avec le dicoumarol et c'est avéré qu'il empêche la croissance de plusieurs bactéries [18]. Dadák et Hodak [19] ont suggéré que les coumarines ont une activité antibactérienne sélectivement contre les micro-organismes à Gram-positifs.

Melliou et autres [20] ont étudié l'activité antibactérienne des pyranocoumarines en utilisant la méthode de diffusion de disque sur l'agar. Leur étude a évalué l'activité antibactérienne de 26 dérivés de pyranocoumarine et constaté qu'ils ont un large spectre d'activité. Une étude des dérivés de coumarine substitués sur l'anneau de la pyrone a indiqué

que les dérivés 3-carboxyles ont une activité significative, avec des concentrations inhibitrices minimum dans la gamme 25-200 $\mu\text{g/mL}$ contre 14 des 15 micro-organismes examinés [21].

Le nombre de bactéries résistantes augmente, et en particulier le Gram-positif *Staphylococcus aureus*. Les capacités de *S.aureus* à développer la résistance pratiquement à tous les antibiotiques est un énorme souci. Quelques antibiotiques avec de la coumarine dans le squelette, ont une activité contre ces bactéries multi résistantes. Le plus actif de ces derniers est Novobiocine isolé à partir de *Streptomyces niveus*, qui est principalement en activité contre les bactéries Gram positives. Ces antibiotiques de coumarine sont les inhibiteurs efficaces de la réplique d'ADN [22].

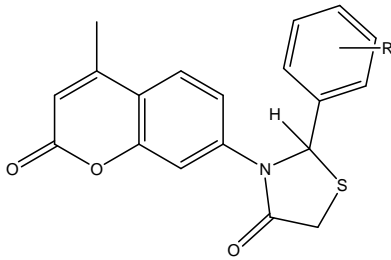
L'importance des coumarines qui est dû à leurs propriétés antibactériennes, et la présence de triazole tels que le fluconazole, et le voriconazole a incité Shi et autres à développer l'hybride coumarine-triazole ayant l'activité antimicrobienne contre les bactéries Gram-positives, et Gram- négatives aussi bien que quelques mycètes. L'hybride résultant de ces composés montrent une activité antimicrobienne plus grande comparable à une référence telles que l'enoxacin, chloromycin.

Un anneau de thiazolidine, qui est un composant important de pénicilline est apposé à la coumarine pour produire du phenylthiazolidinyl 7-(2-substitué) - benzopyran-2-ones **H5**. Ces composés ont une activité antimicrobienne comparable au ciprofloxacine. Le remplacement de l'anneau phénylique avec du furfuranne diminue l'activité [23]. Les hybrides de coumarine-sulfonamide **H6** montrent une activité antimicrobienne significative contre tous les Gram-positifs et Gram-négatives, dans la plupart des cas équivalent au ciprofloxacine.

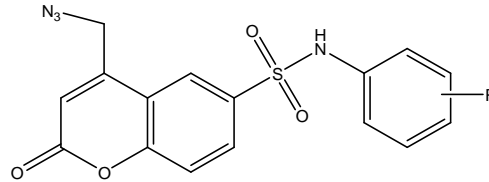
Les hybrides de coumarine-pyrazole **H7** aussi bien que les bis-coumarines lié par l'intermédiaire des éthers d'hydroxyle **H8** ont également une activité antimicrobienne in vitro efficace contre les bactéries Gram-positives, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, et les Gram-négatives salmonelles, à la concentration de 1 mg/ml. Les bis-coumarines empêchent la croissance bactérienne avec un plus grand pouvoir par rapport aux dérivés de l'hybride coumarine-pyrazole.

Les 3,4-Dihydropyrimidinones, connus sous le nom de composés de Biginelli constitue une famille d'hétérocycles importante en chimie organique synthétique, qui possèdent divers propriétés thérapeutique et pharmacologiques, y compris antivirale, activités antitumorales, anti-bactériennes et anti-inflammatoires [24,25].

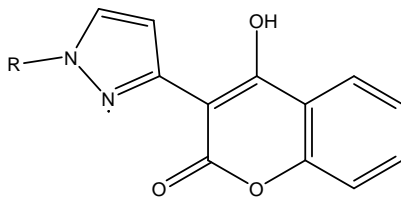
Dû à l'éventail large d'activités pharmacologiques et biologiques, la synthèse de ces composés hybrides est devenue un défi important dans les années en cours.

**H5**

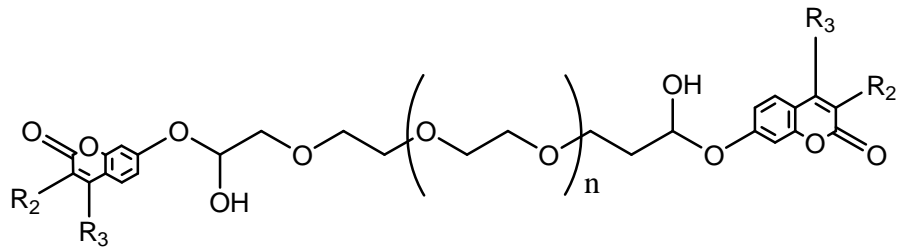
Phenylthiazolidinyl 7-(2-substituted)
- benzopyran-2-ones

**H6**

Hybrides de coumarine-sulfonamide

**H7**

Hybride coumarine-pyrazole

**H8**

bis-coumarines lié par des éthers d'hydroxyle

Figure III.6: molécules hybrides à activité antibactérienne

Partie expérimentale

I- Evaluation de l'activité antioxydante

I-1- Principe

L'activité antioxydante exprime la capacité de réduction des radicaux libres. Dans notre étude, elle a été évaluée *in vitro* par la méthode de DPPH, qui consiste à utiliser un radical stable, le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl ($C_{18}H_{12}N_5O_6$), dans l'éthanol [12].

La réduction du DPPH[•] est contrôlée en mesurant l'absorbance des solutions éthanoliques mères des molécules hybrides coumarin-dihydropyrimidinones testées de concentration $5 \times 10^{-2} M$ ainsi que sur une gamme de concentrations ($1,75 \times 10^{-2} M$, $6,12 \times 10^{-3} M$, $2,14 \times 10^{-3} M$), à une longueur d'onde d'absorption 515nm caractéristique du DPPH.

Le pourcentage de capture du radical (%CR) peut être calculé à partir de la relation ci-dessous :

$$\% \text{ CR} = \left[\frac{\text{Abs AB} - \text{Abs AX}(t)}{\text{Abs AB}} \right] \times 100 \quad (1)$$

% CR : le pourcentage de capture du radical DPPH[•]

AB : l'absorbance du blanc (t = 0 min), le blanc est composé de 1 ml d'éthanol et 20 µl le DMSO

AX : l'absorbance de la solution du produit testé (t = 60 min).

I-2- Mode opératoire

La solution de DPPH a été préparée en solubilisant 4 mg de DPPH dans 100 ml d'éthanol. Le blanc a été préparé à partir de 1 ml de la solution du DPPH et 20 µl de DMSO. Une solution éthanolique (1 ml) du radical DPPH[•] est mélangée directement dans une cuve UV en plastique avec une solution de l'échantillon à évaluer dissous dans le DMSO (20 µl), agitée et maintenue à température ambiante et dans l'obscurité avant la mesure de l'absorbance par spectrophotométrie (Spectrophotomètre MD-1105) à 515nm. Les mesures sont prises après 60 minutes.

Les molécules coumarin-dihydropyrimidinones testées **5b**, **7** et **8** sont présentées dans la figure III.7.

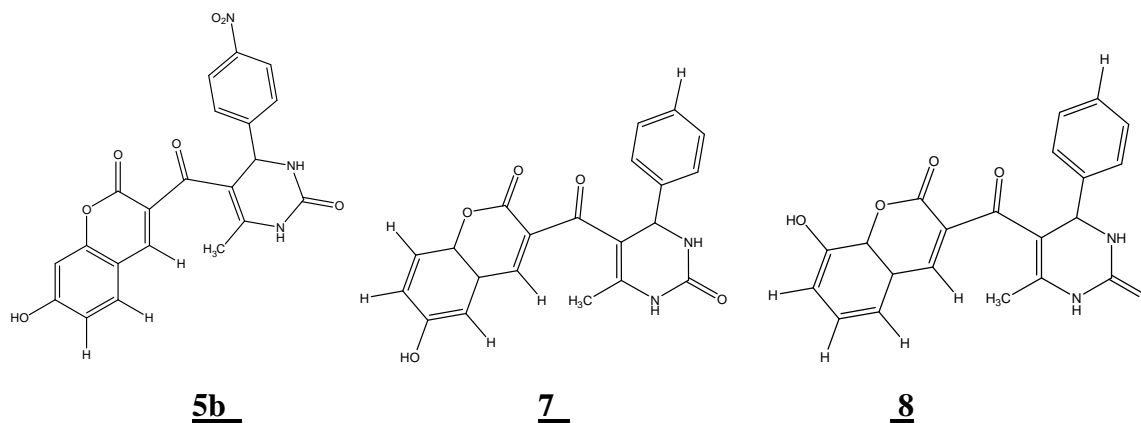


Figure III.7: Molécules hybrides coumarin-dihydropyrimidonones

I-3- Résultats

Le DPPH sous sa forme radicalaire absorbe à 515 nm, après sa réduction par l'antioxydant, l'absorption diminue et la coloration bleue violette de la solution initiale disparaît, la forme réduite confère à la solution une coloration jaune pâle.

Cette coloration dépend de la nature, la concentration, et la puissance de la substance anti-radicalaire. La figure III.8 représente l'absorbance des produits testés ainsi que la référence utilisé l'acide Ascorbique en fonction de la concentration,

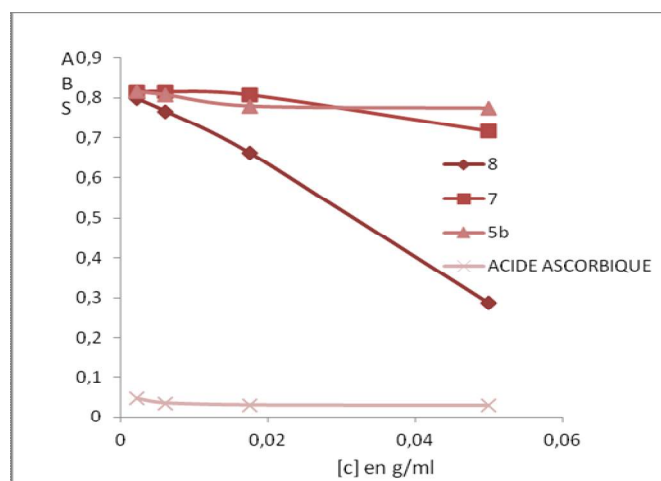


Figure III.8: Absorbance en fonction de la Concentration [C]

Les pourcentages de capture du radical DPPH (% CR) ont été calculés par la relation 1. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau III.2.

Tableau III.2. Activité antioxydante (%) évaluée par le radical DPPH des coumarin-dihydropyrimidinones

Produit [C] g/ml	%CR			
	8	7	5b	Acide Ascorbique
C0=0,05	65%	13%	6%	96,6%
C1=0,175	20%	2%	3%	96,4%
C2=0,00612	7%	1%	2%	95,8%
C3=0,00214	3%	1%	1%	94,4%

Comme figurant dans ce tableau, les composés **5b** et **7** ont manifesté une faible activité antioxydante pour une concentration de 5×10^{-2} g/ml comparée à celle de l'acide ascorbique alors que le composé **8** est doté d'une forte activité antioxydante qui est de 65%.

Généralement, le pouvoir antioxydant est tributaire à la mobilité de l'atome d'hydrogène. En présence d'un radical libre DPPH•, l'atome H est transféré sur ce dernier et il va se transformer en une molécule stable DPPH-H, ceci provoque une diminution de la concentration du radical libre.

Les coumarines font partie des polyphénols et l'addition d'un second OH sur le cycle aromatique augmente fortement l'activité antioxydante quand le second OH est en ortho ou para du premier : Ortho=para > méta, un troisième OH sur le cycle renforce également le caractère antioxydant [13]. Ce qui est en accord avec nos résultats en effet l'activité antioxydante est élevée quand le OH est en position ortho par rapport à la fonction ester de la 2-pyrone.

I-4- Détermination de la CE50 ou IC50

La concentration efficace (CE50) est inversement liée à la capacité antioxydante d'un composé, car elle exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%. Plus la valeur de CE50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande [8]. La concentration inhibitrice minimale (IC50) est estimée par extrapolation à % CR = 50% en traçant la courbe % CR en fonction de la concentration ou bien en utilisant la formule de la droite % CR en fonction de la [C], $y = a [C] + b$, où **a** est la pente de cette droite et **b** représente le pourcentage de capture pour [C]=0. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau III.3.

Tableau III.3 : Les valeurs des IC50% des composés **5b**, **7** et **8**

Produit	IC 50%
5b	0,49
7	0,19
8	0,039

Les figures III.8 et III.9 représentent le % CR en fonction de la [C] pour les différents produits testés et l'acide Ascorbique.

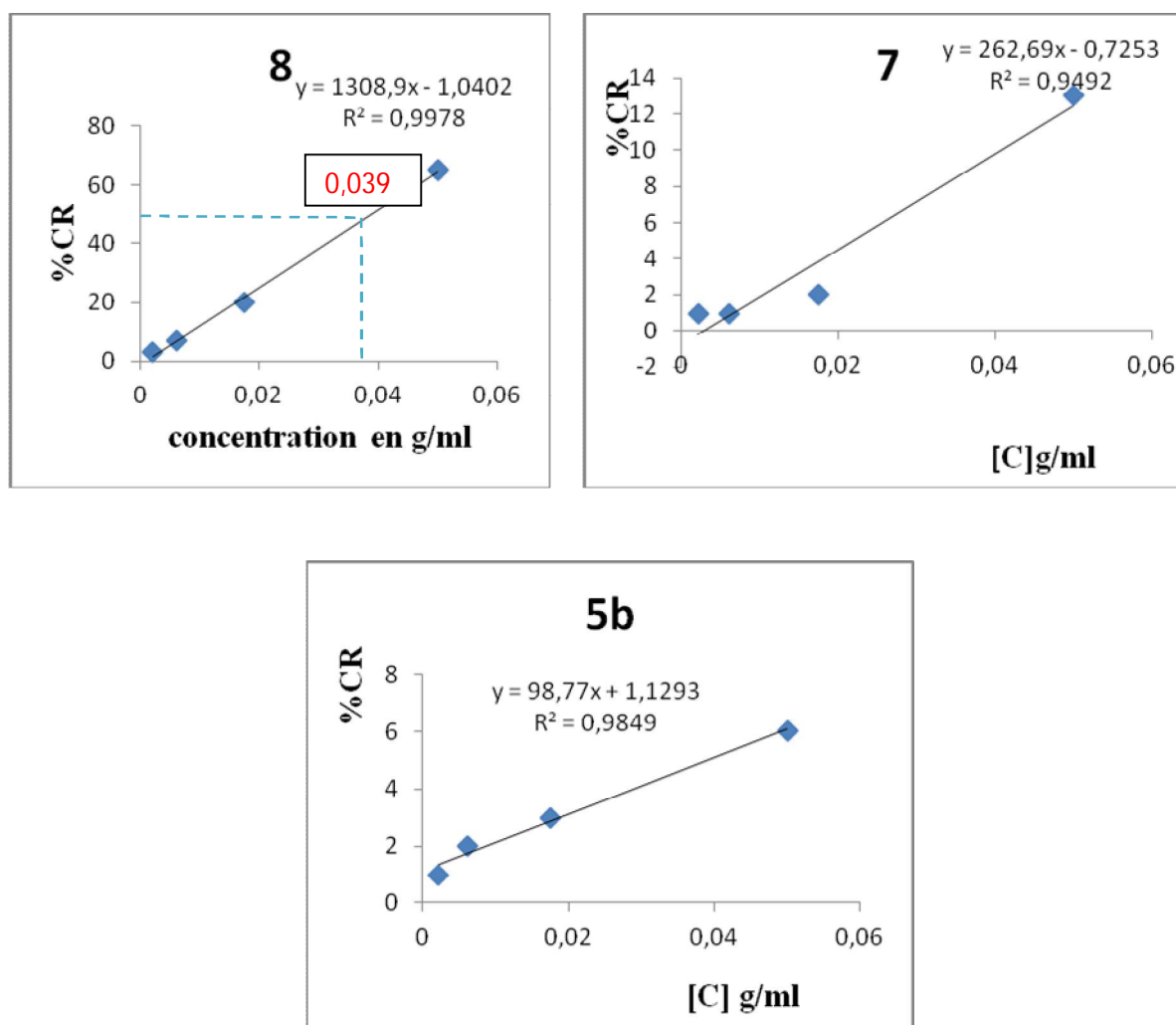


Figure III.8 : Pourcentage de capture du radicale DPPH de 5b, 7 et 8 en fonction de la concentration [C]

II- Evaluation de l'activité antibactérienne

II-1- Origine et choix des souches bactériennes utilisées

Trois souches bactériennes de collection sont choisies pour l'évaluation de l'activité antibactérienne des produits synthétisés. Elles sont généralement impliquées dans différentes pathologies infectieuses : il s'agit d'*Escherichia.coli* ATCC 25922, de *Staphylococcus-aureus* ATCC 25923 et de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

❖ *Escherichia coli*

Autrement appelé colibacille ou E.coli : c'est une bactérie à Gram négatif, commensal du tube digestif de l'homme et de l'animal, de forme non sporulée, de type aérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 µm, alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 µm. E. coli représente la bactérie la plus impliquée dans les infections aiguës d'appareil urinaire, elle provoque également les diarrhées d'été, diarrhée infantile et les intoxications alimentaires [26].

❖ *Staphylococcus aureus (S.aureus)*

Ce sont des cocci Gram positif avec un diamètre de 0,5 à 1,5 µm, de forme non sporulée, qui tendent à se grouper en paires, petites chaînes, elles sont habituellement non capsulée, ou possédant des capsules limitées, elles sont anaérobies facultatives. *Staphylococcus aureus* représente l'agent commun des infections postopératoires de blessures, endocardite aiguë, intoxication alimentaire [27].

❖ *Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa)*

Ce sont des bacilles Gram négatif, de forme non sporulée, elles sont aérobies, mobiles grâce à la présence de 1 à 2 flagelles, ce type de bactérie synthétise des pigments ;le pyocyanine : bleue phénazine, pyoverdine: jaune vert, il s'agit de bactéries résistantes pour plusieurs antibiotiques [26]. *Pseudomonas aeruginosa* est responsable de 16% des cas de pneumonie nosocomiale, 12% des infections urinaires, 8 % des infections suites aux blessures chirurgicales [28].

II-2- test d'activité antibactérienne

A- Préparation de l'inoculum

Les souches bactériennes sont ensemencées dans la gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 18 h, pour optimiser leur croissance. On racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester.

La standardisation de la suspension à 10^6 UFC/ml, est réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 625 nm. On admet qu'une densité Optique (DO) de 0.08 à 0.10 à une concentration de 10^7 à 10^8 germes/ml. 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.

B- Ensemencement et dépôt des disques

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes Pétri préalablement préparés en ajoutant de la gélose Muller-Hinton, un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne. 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. Les disques sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile, puis sur chaque disque on met 20µl de l'échantillon à tester.

De même des disques contenant l'antibiotique Ciprofon comme témoin positif, et le DMSO comme témoin négatif ont été déposés.

Les échantillons à tester ont été dissous dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) pure pour préparer les différentes concentrations avec des dilutions successives au demi, sachant que la concentration de la solution mère de chaque extrait est de 5mg/ml.

L'eau distillée, le milieu de culture, les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes et les disques en papier Wattman enrobés dans du papier aluminium ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

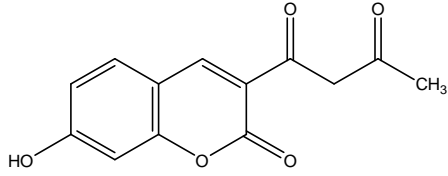
C- Incubation

Les boîtes de pétri sont ensuite fermées et laissées à T° ambiante pendant 30 min et mise à l'étuve à la T° de 37°C pendant 24H. l'activité antibactérienne de nos produits est estimée en

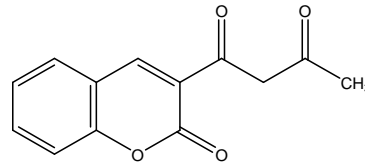
terme de diamètres de la zone d'inhibition autour des disques contenant les produits à testés.

d- Produits utilisés

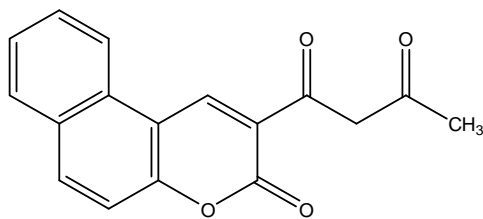
Les produits testés sont représentés dans la figure suivante :



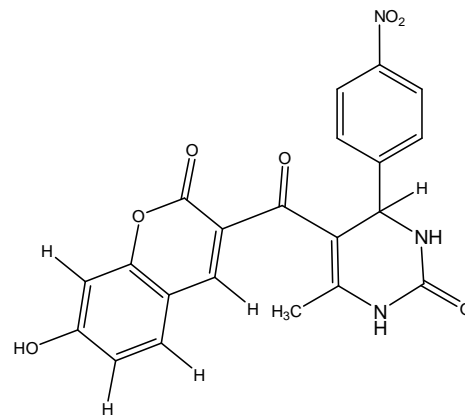
1b



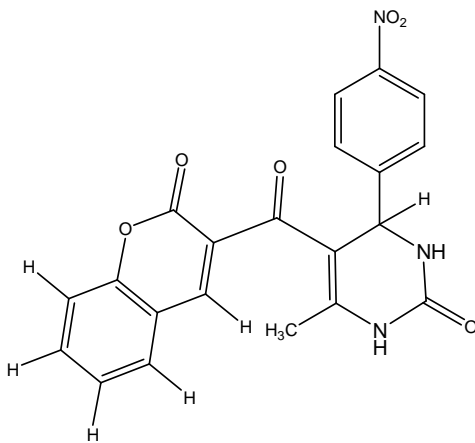
1a



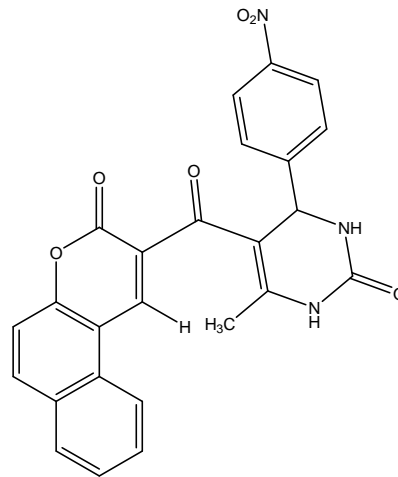
1c



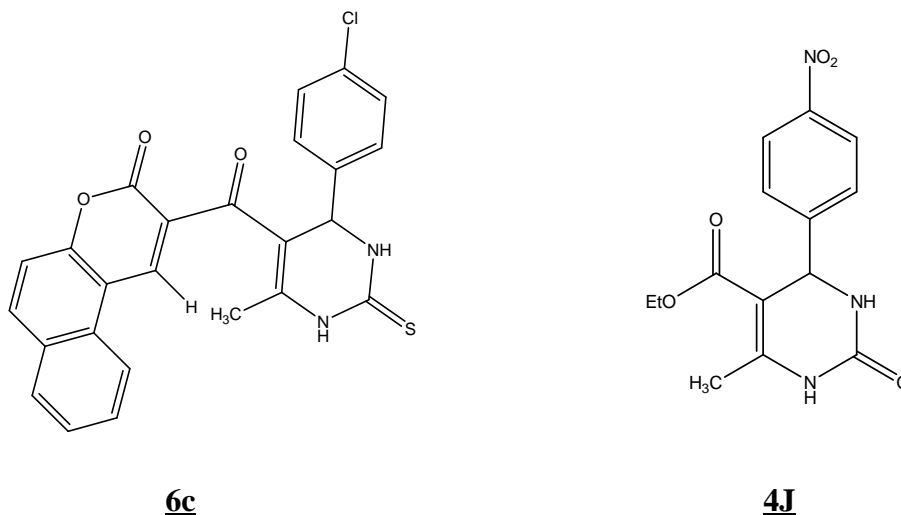
5b



4b



6b

**Figure III.10 : Structures des produits testés****II-3- Résultats et discussion**

La méthode de diffusion des disques nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien des molécules de 3-acétoacétylcoumarine **1a** et deux de ses dérivés **1b**, **1c**, de la 3,4-dihydropyrimidinone **4J** et des molécules hybrides coumarin-3,4-dihydropyrimidinones synthétisées récemment au laboratoire **4b**, **5b** et **6b** [29].

Les tests antimicrobiens sont réalisés d'abord avec les 3-acétoacétylcoumarines **1a-c**, la 3,4-dihydropyrimidinone et **4J** sur les trois différentes bactéries, en faisant dissoudre 5mg de chaque produit à tester dans 1ml de DMSO pure. Les résultats des zones d'inhibition sont indiqués dans le tableau III.4

Tableau III.4 : Diamètres (mm) des zones d'inhibition

Molécules testées	Zone d'inhibition (mm)		
	<i>E.coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S.aureus</i>
1b	7	5	11
1a	8	7	8
1c	5	5	5
4J	9	8	10
Cipro	30	31	25
DMSO	5	5	5

Les molécules **1a** et **4J**, ont montré une activité antibactérienne vis-à-vis des trois souches dont les zones d'inhibition varient entre 7 et 11 mm. Le composé **1b** est inactif vis à vis de *P.aeruginosa* et exerce une activité contre l'*E.coli* et *S.aureus*.

Le composé **1c** n'a aucune activité vis-à-vis des 3 souches testés. Aucune zone d'inhibition n'a été observée pour le solvant DMSO.

En effet une activité plus importante a été observé sur la souche de *S.aureus* par rapport à *E.coli* et *P.aeruginosa*. Les bactéries à Gram négatif montrent des zones d'inhibitions inférieures à celles observées chez les bactéries à Gram positif.

II-3-1- Activité des molécules hybrides synthétisées

Les tests antimicrobiens sont réalisés aussi sur les molécules hybrides coumarin-3,4-dihydropyrimidinones **4b**, **5b** et **6b**. Les zones d'inhibitions enregistrées sont données dans le tableau III.5.

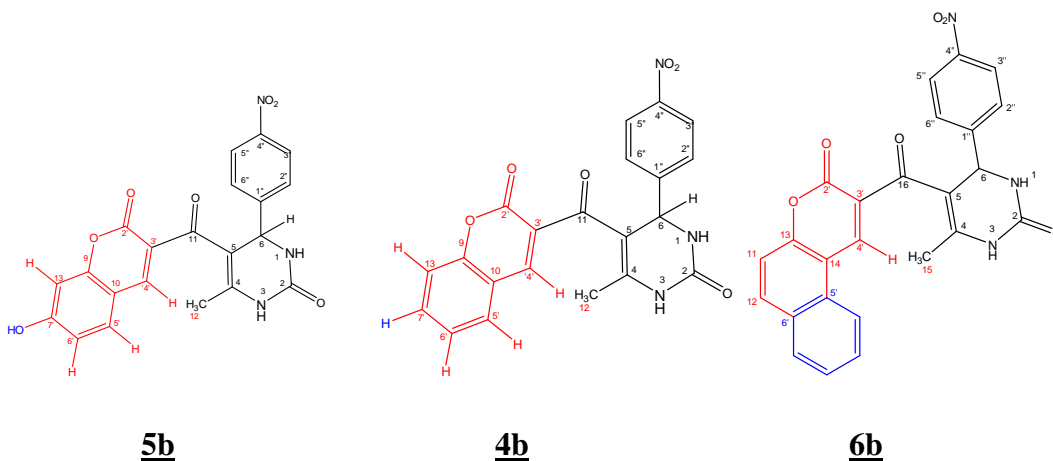


Tableau III.5 : Diamètres des zones d'inhibition des molécules hybrides coumarin-3,4-dihydropyrimidines **4b**, **5b** et **6b**

Molécule	Zone d'inhibition (mm)		
	<i>E.coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S.aureus</i>
<u>5b</u>	9	8	11
<u>4b</u>	8	7	8
<u>6b</u>	7	5	5
DMSO	5	5	5

Les résultats obtenus montrent que les molécules hybrides **4b** et **5b** présentent une activité inhibitrice moyenne sur les trois souches. Pour le **5b** les zones d'inhibitions ont légèrement augmenté par rapport à **1b**, donc la fusion des deux composés a légèrement

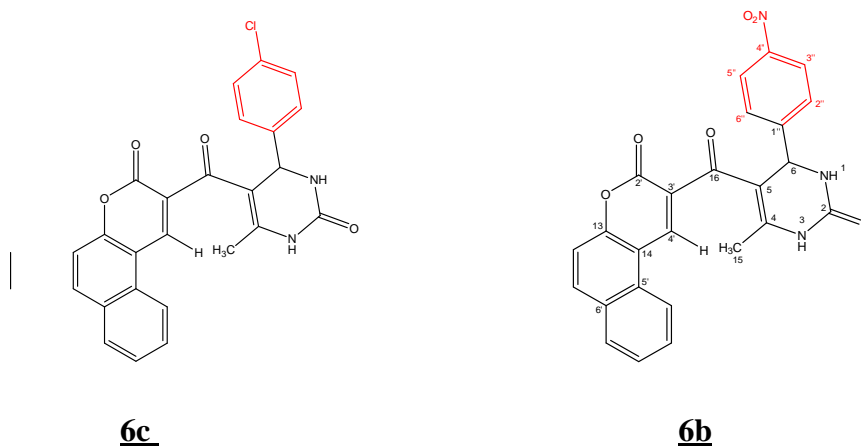
augmenté l'activité antibactérienne. Par contre le composé **4b**, les diamètres sont restés les mêmes que **1a** à l'exception de *P.aeruginosa* qui a augmenté de 5mm à 7mm. Pour le composé **6b**, la zone d'inhibition est observée uniquement dans le cas d'*E. coli* et aucune inhibition n'est observée pour *P.aeruginosa* et le *S. Aureus*.

L'activité du composé **5b** est dû probablement à la présence du groupement hydroxyle (OH) substitué sur le noyau benzénique de la coumarine qui peut être source de radicaux libres stables qui rentre dans le cycle redox en présence de l'oxygène de l'air, peut provoquer la déstabilisation des lysosomes et la diminution du potentiel membranaire mitochondrial [30].

La fusion de deux structures dérivant de deux composés différents possédant une activité antibactérienne n'influe pas toujours sur l'activité antibactérienne du produit final. la fusion ne diminue pas l'activité et ne l'accroît pas, les deux produits fusionnés n'exercent pas en synergie.

II-3-2- Influence de la nature du substituant lié à la 3,4-dihydropyrimidinone sur l'activité antibactérienne

Une étude antibactérienne sur l'influence du groupement lié au noyau benzénique de la DHPM a été réalisée sur deux composés contenant deux groupements électrodonneur par effet mésomère (Cl) composé **6c** et électroattracteur (NO₂) composé **6b**.



Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau III.7

Tableau III.7 : Diamètres (mm) des zones d'inhibition des molécules **6c** et **6b**

Molécule	Zone d'inhibition (mm)		
	E.coli	PSA	Staph
6b	7	5	5
6c	9	8	10

D'après ces résultats les diamètres des zones inhibitrices dans le cas du composé **6c** sont plus grandes que celles du composé **6b**, cela peut être expliqué par la présence d'un halogène qui est le chlore et qui augmente l'activité du composé **6c**. La substitution de 4-NO₂ par le 4-Cl confère au composé **6c** une certaine activité antimicrobienne. Donc les groupements électrodonneurs par effets mésomère augmentent l'activité antimicrobienne d'une molécule.

II-3-3- Comparaison de l'activité antimicrobienne des molécules hybrides synthétisés et le mélange des molécules non fusionnées

Un mélange des deux molécules constituant les hybrides a été testé sur les souches précédentes les résultats obtenus sont donnés dans le tableau III.8 suivant :

Tableau III.8 : Diamètres (mm) des zones d'inhibition des molécules hybrides synthétisés et le mélange des molécules non fusionnées

	Zone d'inhibition		
	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.aureus</i>
5b	9	8	11
4b	8	7	8
6b	7	5	5
M1 = 1a+4J	10	9	7
M2= 1b+4J	10	9	8
M3= 1c+4J	9	10	12

L'activité des mélanges **M1** et **M2** a augmenté légèrement par rapport à **4b** et **5b**, le mélange **M3** a manifesté une activité antibactérienne vis à vis des trois souches alors que le fusionnement des deux noyaux pour donner le **6b** était inactif. Ces résultats sont aussi représentés en histogramme dans la figure III.11.

l'activité antibactérienne est meilleure quand les 2 produits sont mélangés en quantité équimolaire que lorsque les deux structures sont fusionnées (molécules hybrides).

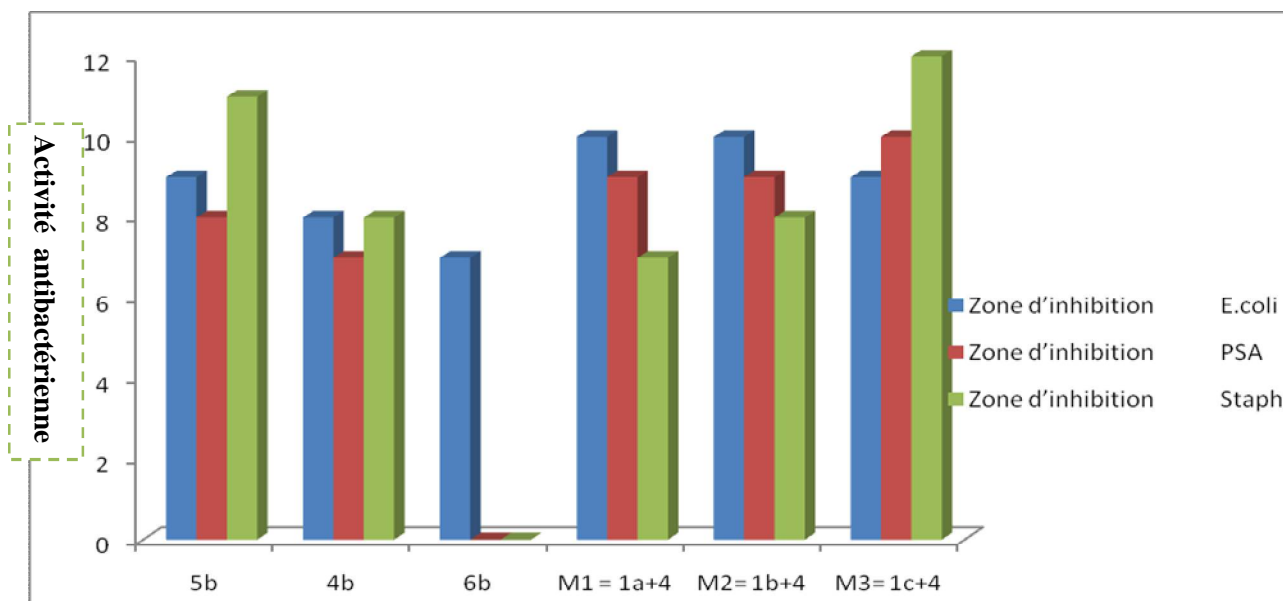


Figure III.11 : Résultats de l'activité antibactérienne des produits synthétisés hybrides et le mélange des molécules non fusionnées.

Les résultats obtenus de ces tests préliminaires montre que la meilleure Zone d'inhibition est attribuée au produit **4b** et **5b** pour cela une étude de la concentration minimale inhibitrice (CMI) du composé **4b** et **5b** est réalisée.

II-3-4- Détermination des concentrations minimales inhibitrices

La CMI est la plus petite concentration nécessaire pour inhiber la croissance d'une bactérie. Pour déterminer la CMI d'une molécule, on teste des concentrations croissantes d'antibiotique vis à vis d'un germe. La méthode classique se fait par dilution en milieu liquide.

On met dans chaque tube une même quantité connue de bactérie, et on ajoute des quantités croissantes d'antibiotique. Au bout de 18 heures si le tube est trouble, c'est que la bactérie s'est multipliée, le premier tube clair nous donne la CMI.

Pour déterminer la CMI des molécules **4b** et **5b** testées, nous avons procédé à des dilutions à partir de la concentration initiale (5mg/ml). Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau III.9 :

Tableau III.9 : CMI des composés **4b** et **5b**

Composé	CMI (mg/ml)		
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S.aureus</i>
5b	0,312	5	1,25
4b	0,625	2,5	1,25

L'étude de la CMI a été réalisée par la technique de CMI sur milieu liquide, les résultats des CMI obtenus ne semblent pas être en corrélation avec ceux de la méthode de diffusion en milieu solide. Ainsi les valeurs intéressantes de la CMI du produit **5b** vis-à-vis d'*E.coli* qui est de l'ordre de 0,312 mg/ml, et de 1,25mg/ml pour *S.aureus* comparé aux zones d'inhibition moyenne observée par la méthode des disques or que la meilleure zone d'inhibition est enregistrée pour le *S.aureus* par la méthode de confrontation sur milieu solide et aucune CMI n'a été signalée pour le *P.aeruginosa* montre que l'inhibition est meilleure en milieu liquide.

Pour le produit **4b** les zones d'inhibition d'*E.coli* et *S.aureus* sont les mêmes par contre la CMI est plus marquée pour l'*E.coli* qui est de l'ordre de 0,625g/ml et de 1,25g/ml pour *S.aureus*, une CMI de 2,5g/ml est obtenu pour le *P.aeruginosa*.

D'après ces résultats l'activité antibactérienne des produits synthétisés **5b** et **4b** est plus marquée dans le milieu liquide que dans le milieu solide du à une meilleure diffusion du produit.

III- Conclusion

Nous nous sommes intéressés à évaluer l'activité antibactérienne des molécules hybrides et le mélange équimolaire des molécules non fusionnées constituant ces molécules hybrides.

La technique de diffusion sur disques, nous a permis de mettre en évidence que :

- ✚ les molécules hybrides **4b**, **5b** présentent une activité inhibitrice vis à vis des trois souches , le composé **6b**, exerce une activité vis à vis d'*E. coli*.
- ✚ l'activité antibactérienne est meilleure quand les deux produits sont mélangés en quantités équimolaires que lorsque les deux structures sont fusionnées.

L'étude de la concentration minimale d'inhibition nous a permis de révéler des CMI intéressantes pour les produits **5b** et **4b** vis-à-vis d'*E. coli* de l'ordre de 0,312g/ml et 0,625g/ml respectivement.

L'évaluation de l'activité antioxydante a révélé une forte activité antioxydante pour le composé **8**.

Références Bibliographiques

- [1] Guinebert E., Durand P., Prost M., Grinand R. and Bernigault R. Mesure de la résistance aux radicaux libres. Sixièmes Journées de la Recherche Avicole, 2005; 554.
- [2] Delattre J., Beaudeau J,L et Bonnefont Rousselot. D : Radicaux libres et stress oxydant, Aspect biologiques et pathologiques. Edition Tec & Doc, Lavoisier, 2005.
- [3] (a)Hamzaoui N., Extraction et analyse d'huiles essentielles d'*Armoise blanche* Algérienne. Magister, U.S.T.H.B, 2004.
- (b)Hamzaoui N., Etude de la composition chimique de l'*Artemisia Herba-Alba* poussant en Algérie. Thèse de Doctorat U.S.T.H.B. 2010.
- [4] Dacosta Y. Les phytonutriments bioactifs : 669 références bibliographiques. Ed. Yves Dacosta, Paris, 2003.
- [5] Belyagoubi. Benhammou Nabila. Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Doctorat en Biologie. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen, 2011.
- [6] Favier, A. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 2003,108.
- [7] Kohen R. and Nyska A. Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol. Path.*, 2002, Vol 30, page 620.
- [8] Kebbab Ryma : Etude du pouvoir antioxydant des polyphénols issus des margines d'olives de la variété Chamlal : Evaluation de l'activité avant et après déglycosylation. Thèse de magister UMMTO,2014.
- [9] Pulido R., BravoL.,and Saura-Calixto F. Antioxydant activity of dietary polyphenol as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem.*, 2000, Vol 48 , pages 3396-402 .
- [10] Popovici C., Ilonka S., Bartek T Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*, 2009, Vol 4,pages25-39.
- [11] PORTES, E.,: Synthèse et études de tétrahydrocurcuminoïdes : propriétés photochimiques et antioxydantes, applications à la préservation de matériaux d'origine naturelle. Thèse Doctorat, Université de BORDEAUX I, 2008.

- [12] Livermore D., M. β -lactamase mediated resistance: past, present and future, *J. Infect. Dis. Soc.*, 1995, Vol 6, pages 75-83.
- [13] Aberoumand A. Deokule S.S :Comparaison of phenolic compounds of some edible plants of iran and india. *Pakistan J of Nutr* , 2008, Vol 7, page 582.
- [14] Lozniewski A., Rabaud C., Résistance bactérienne aux antibiotiques, Fiches conseils pour la prévention du risque infectieux–Infections associées aux soins, CCLIN, Sud-Est, Nancy, 2010, page 4 .
- [15] Toty A A., Guessennnd N., Bahi C., Kra A. M., Otokore D. A.1et Dosso M., : Évaluation in-vitro de l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de l'écorce de tronc de *Harungana madagascariensis* sur la croissance de souches multi-résistantes .*Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 2013 ,Vol 82, pages 12.
- [16] Bhunia A. K., Johnson M. C. et Ray B., Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J., of applied Bacteriology*, 1988, Vol 65, pages 261.
- [17] Tagg J.R. et McGiven A.R., Assay system for bactériocins. *Appl EnvironMicrobiol.*, 1971, Vol 21, page 943.
- [18] Goth A., The antibacterial properties of dicoumarol. *Science*, 1945.
- [19] Dadák V, Hodak K. Some relations between the structure and the antibacterial activity of natural coumarins. *Experientia*, 1966, Vol 9, pages 22.
- [20] Melliou E, Magiatis P, Mitaku S, Skaltosounis A-L, Chinou E, Chinou I. Natural and synthetic 2,2-dimethylpyranocoumarins. *J Nat Prod.*, 2005, Vol 68, page 78.
- [21] Kawase M, Varu B, Shah A, Motohashi M, Tani S, Saito S, et al. Antimicrobial activity of new coumarins. *Arzneimittelforschung*, 2001, Vol 51, page 67.
- [22] Smyth, T.; Ramachandran, V. N.; Smyth, W. F. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2009, Vol 33, page 421.
- [23] Ronad, P. M.; Noolvi, M. N.; Sapkal, S.; Dharbhamulla, S.; Maddi, V. S. *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, Vol 45, page 85.
- [24] (a) Kappe, C.O., Recent advances in the Biginelli dihydropyrimidine synthesis. New tricks from an old dog. *Acc. Chem. Res.*, 2000, Vol 33, page 879.
- (b) Kappe, C.O., Biologically active dihydropyrimidones of the Biginelli-type – a literature survey. *Eur. J. Med. Chem.*, 2000, Vol 35, page 1043.
- [25] Kappe, C.O., Falsone, S.F., Polyphosphate ester-mediated synthesis of dihydropyrimidines improved conditions for the Biginelli reaction. *Synlett* .1998, Vol 7, page 718.

- [26] Percival SL., Microbiology of waterborne diseases.Ed., Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston, 2004, page 480.
- [27] Dworkin MM and Falkow S. Proteobacteria : Gamma subclass. Ed. Springer, New York, NY, 2006, page 1248.
- [28] Van Delden C. and Iglewski B. H.,Cell-to-cell signaling and Pseudomonas aeruginosa infections. *Emerg. Infect. Dis.*, 1998, Vol 4, pages 551.
- [29] Benazzouz A., Makhloufi-Chebli M., Khatir-Hamdi N., Boutemour-Kheddis B., Silva A. M. S., Hamdi M., Tetrahedron 2015 ,Vol 71 , page 3890.
- [30] Benabdallah Mohammed: Préparation et etude de la réactivité de quelques dérivés de Naphtoquinones en vue de leurs application biologiques potentielles. Thèse de Doctorat ,Université de Telemcen, 2012.

ConCl usion Général e

Conclusion générale

Dans ce travail nous avons montré que la réaction à trois composants des dérivés 3-acétoacétylcoumarines **1a-e**, des dérivés du benzaldéhydes substitués en para **2a-e**, et de l'urée / thiourée **3**, catalysée par l'acide sulfurique fournit une entrée d'un pot simple pour la synthèse avec de très bon rendements d'une série de nouveaux 4-aryl-6-méthyl-5-(2-oxo-2*H*-chromène-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones / thiones **4a-e**, **5a-d**, **6a-d**, **7**, et **8**. Le mécanisme de la réaction de Biginelli ainsi que la structure des synthons utilisés suggère la formation possible de deux composés de type dihydropyrimidinones / thiones. Cependant, avec l'élucidation des produits obtenus, nous avons montré que la cyclisation est produite au niveau du carbone du carbonyle le plus électrophile.

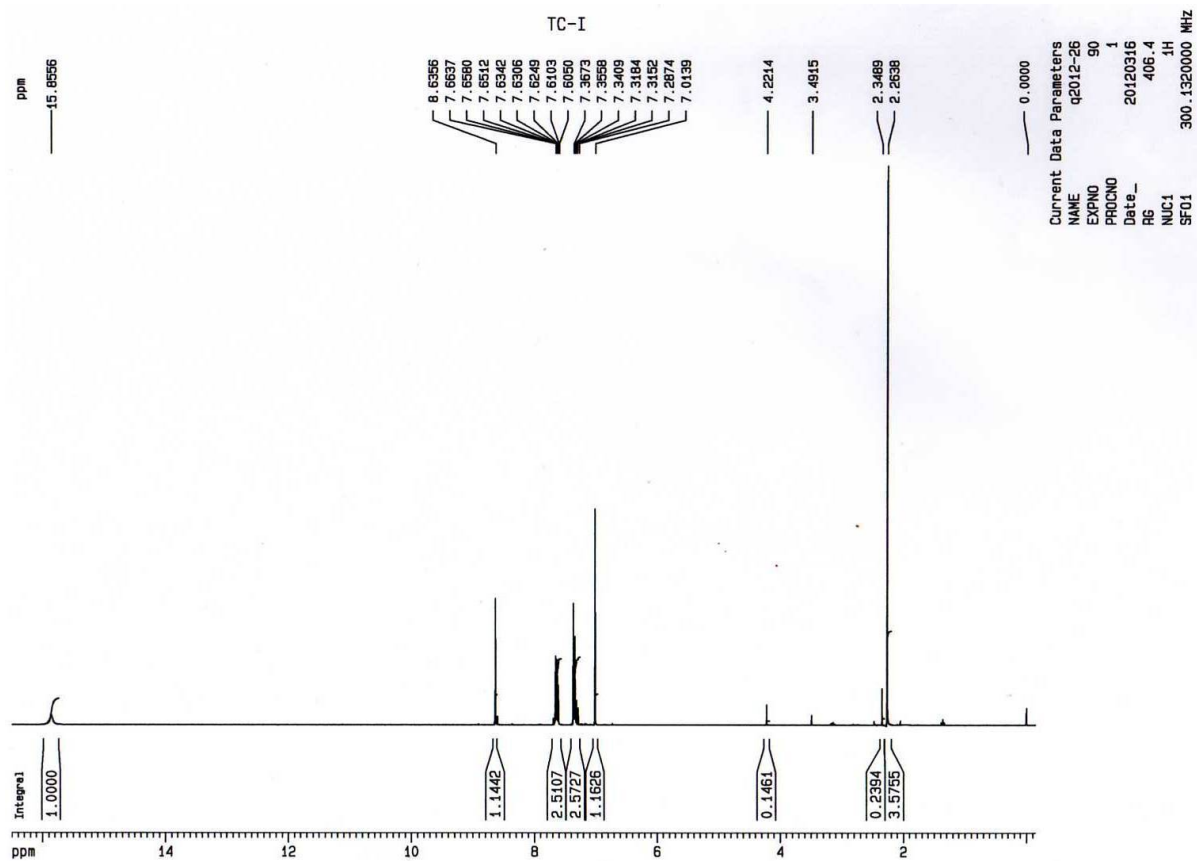
L'étude des propriétés spectroscopiques et l'évaluation des moments dipolaires de trois dérivés de la coumarin-3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones nous a permis de conclure qu'un déplacement bathochrome est observé lors de l'augmentation de la polarité du solvant. Nous avons constaté que les molécules possèdent des valeurs du moment dipolaire dans l'état excité plus élevées par rapport à l'état fondamental. Ces coumarine-DHPMs sont caractérisées par un bon rendement quantique de fluorescence et une bonne brillance, ces composés hybrides pourraient être des blocs de construction pour une nouvelle génération de sondes fluorescentes dans le domaine biologique, combinant les excellentes propriétés optiques des coumarin-DHPMs hybrides avec la simplicité de leur synthèse.

L'évaluation de l'activité biologique nous a permis de trouver une activité antibactérienne modérée de nos produits vis-à-vis des souches testées, par contre nous avons obtenue une forte activité antioxydante pour le composé **8**.

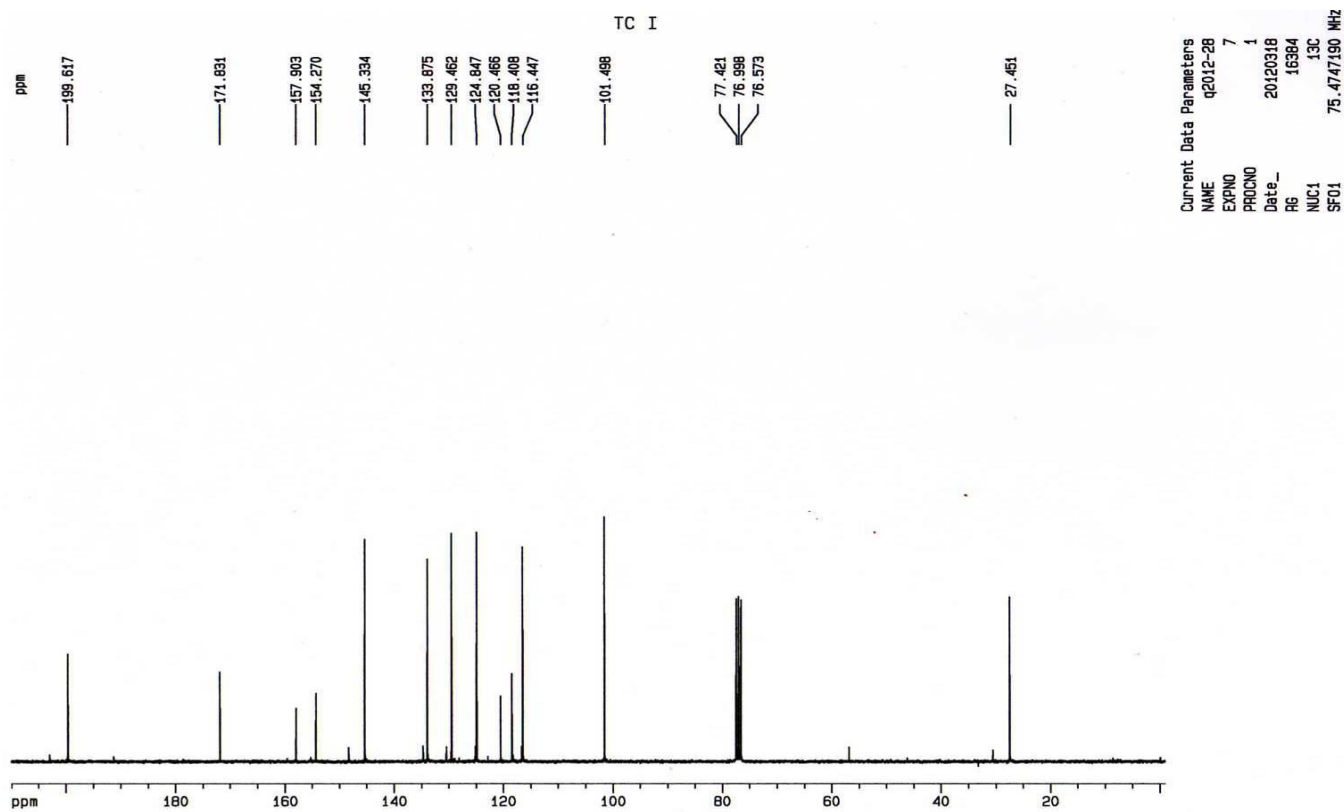
Et comme perspective de notre travail :

- Trouver d'autres catalyseurs non toxiques pour l'environnement et recyclable pour la synthèse de ces molécules et aussi rechercher d'autres composés hétérocycliques possédant des activités biologiques.
- Approfondir l'étude biologique de nos produits : testé d'autre souches bactériennes et d'autres microorganismes ainsi que d'autres activités biologiques.

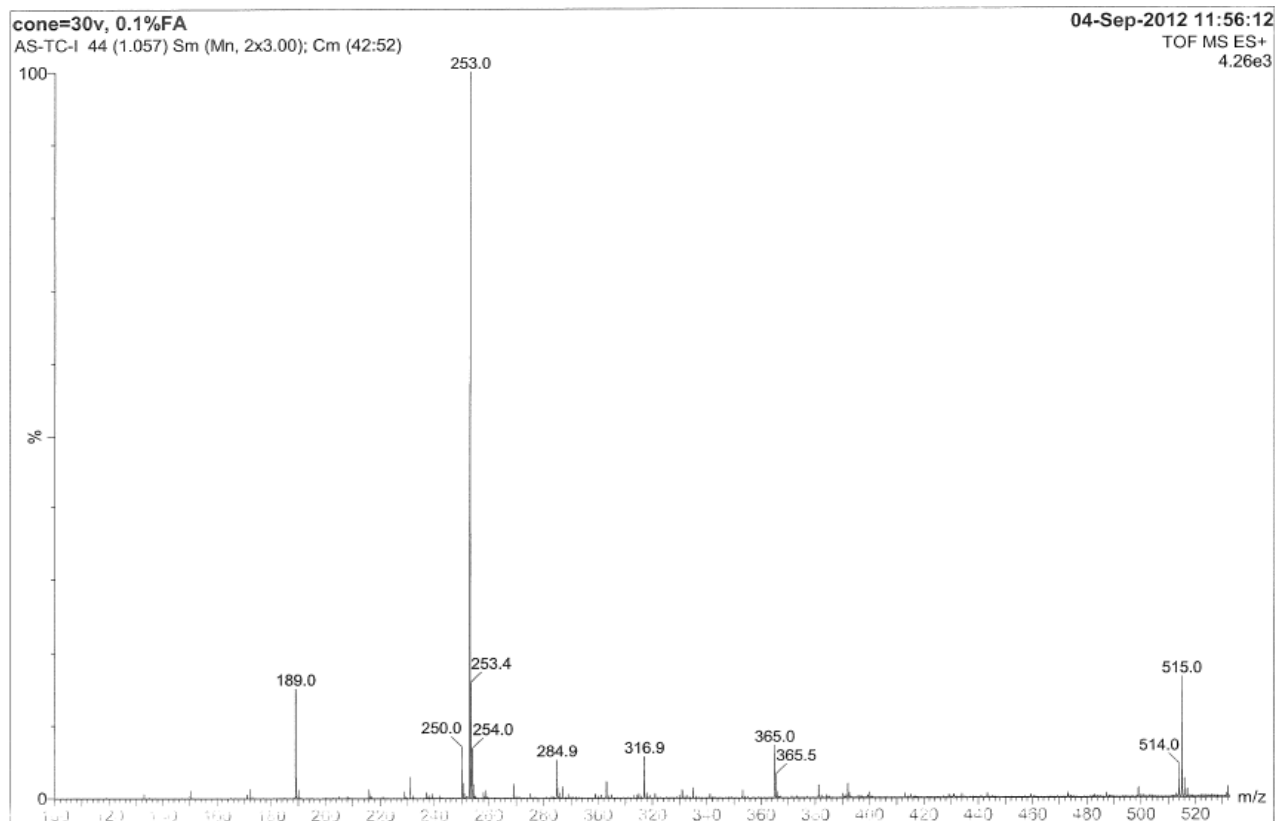
ANNEXe 1



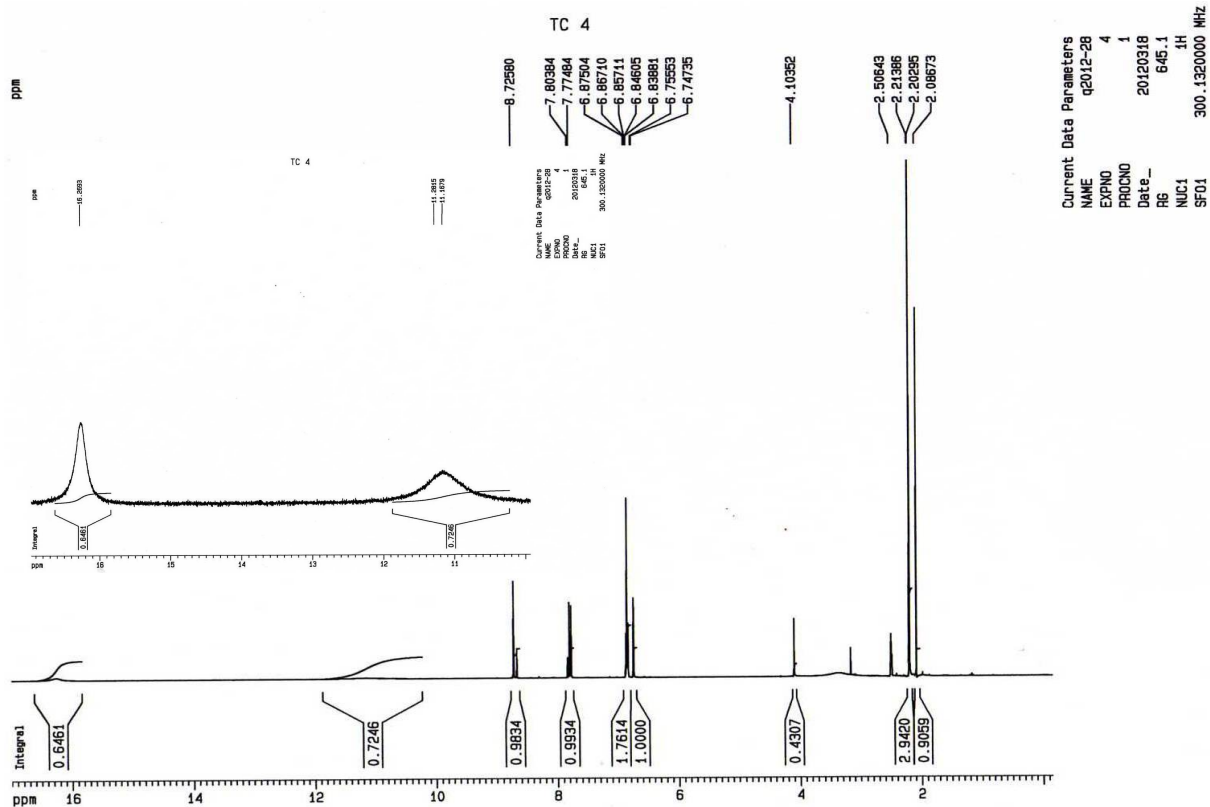
Spectre RMN ¹H à 300.13 MHz du composé 1a



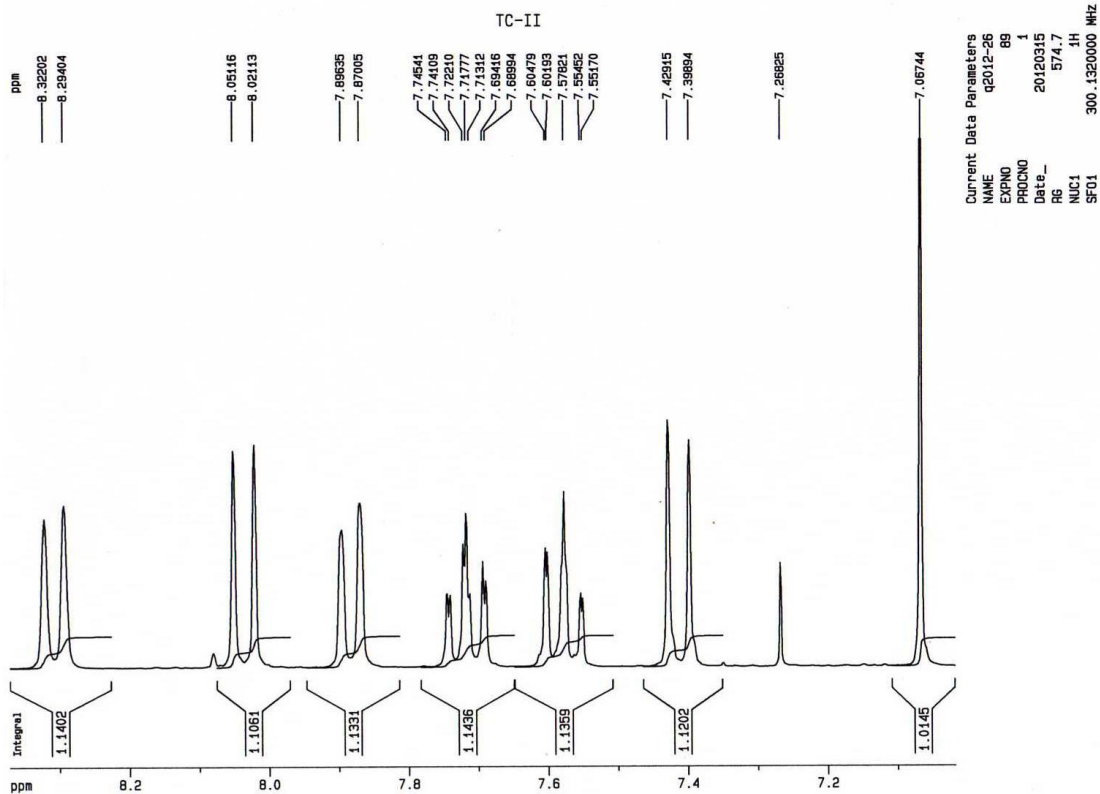
Spectre RMN ¹³C à 75.47 MHz du composé 1a



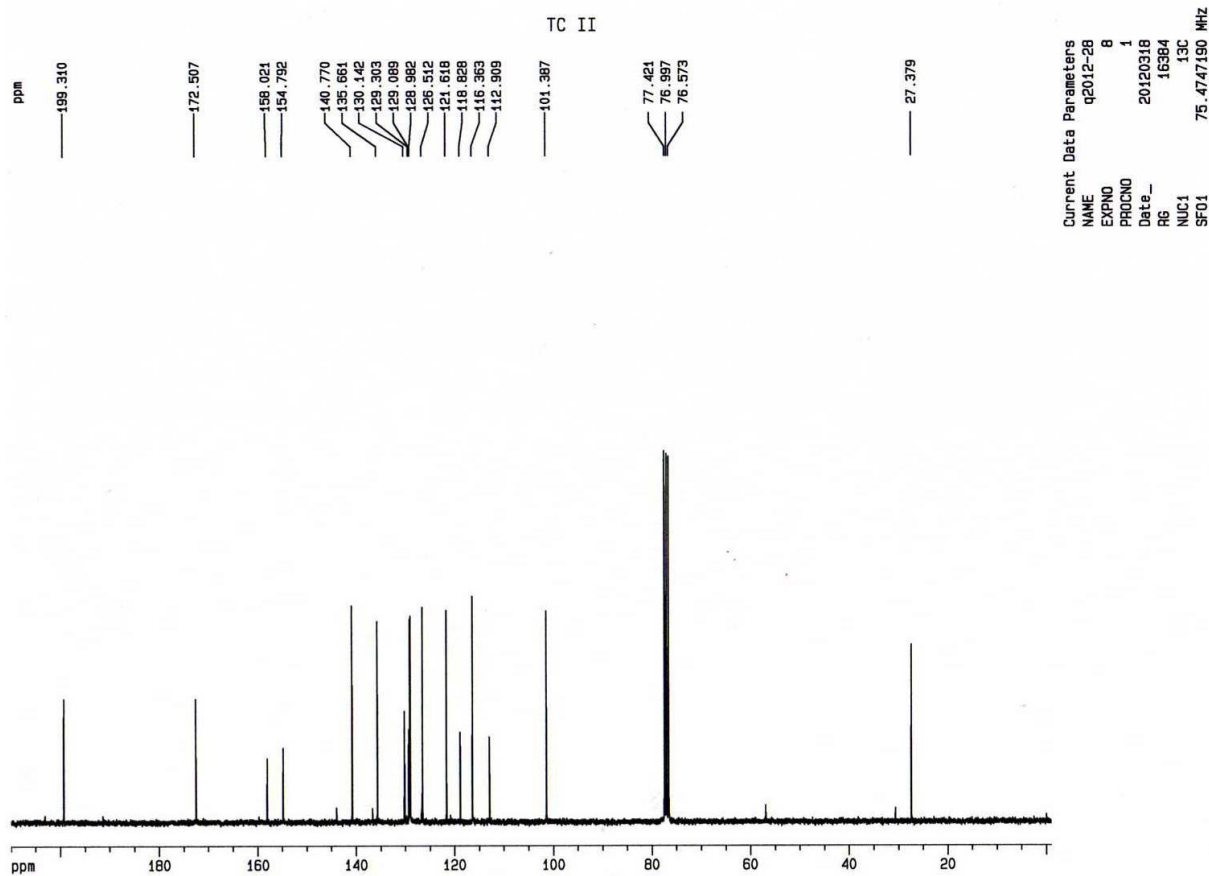
Spectre de masse du composé 1a



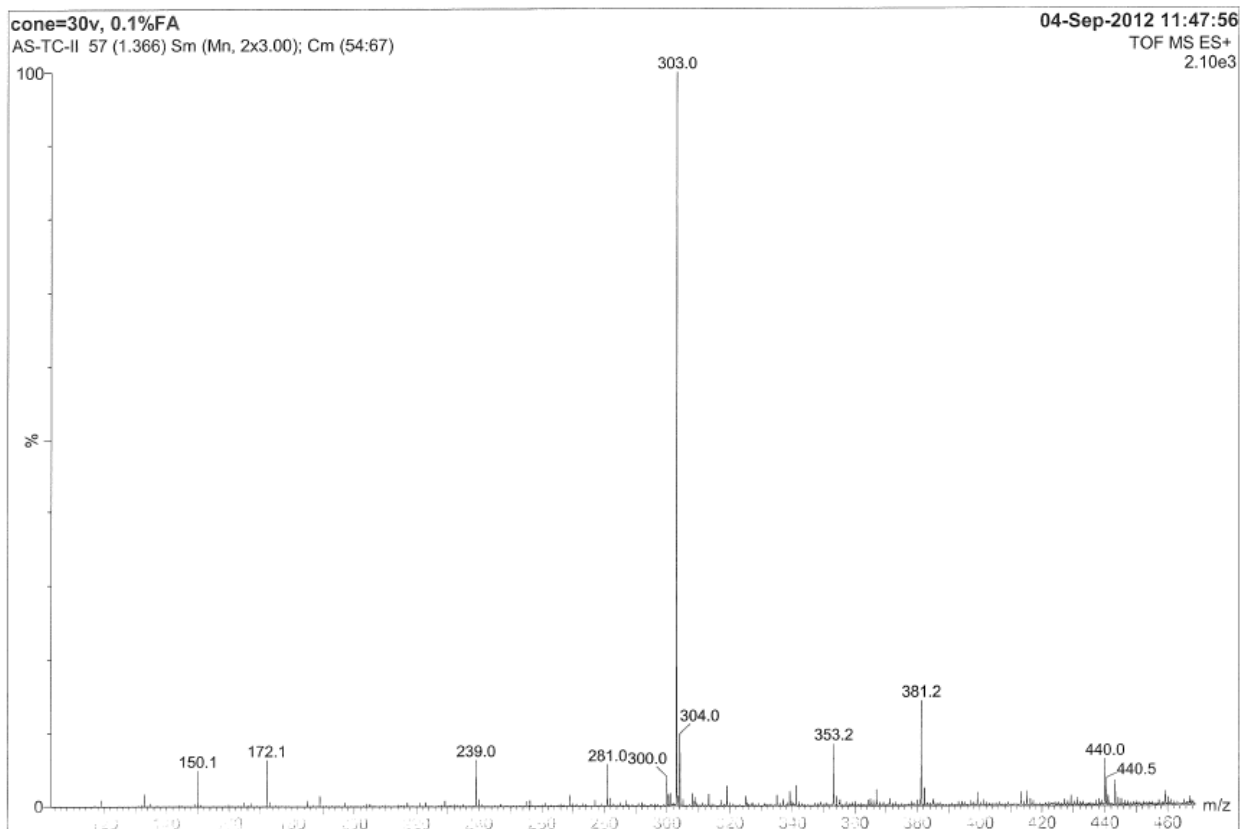
Spectre RMN¹ H à 300.13MHz du composé 1b



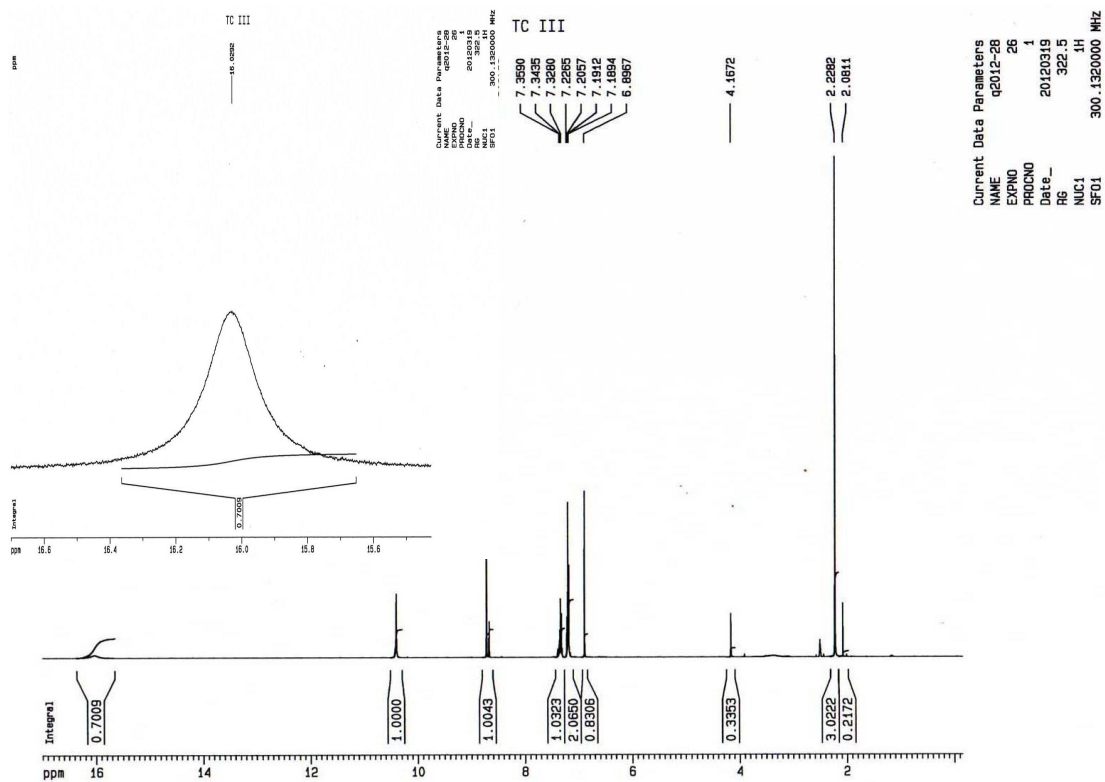
Spectre RMN ^1H à 300.13 MHz étalé du composé 1c



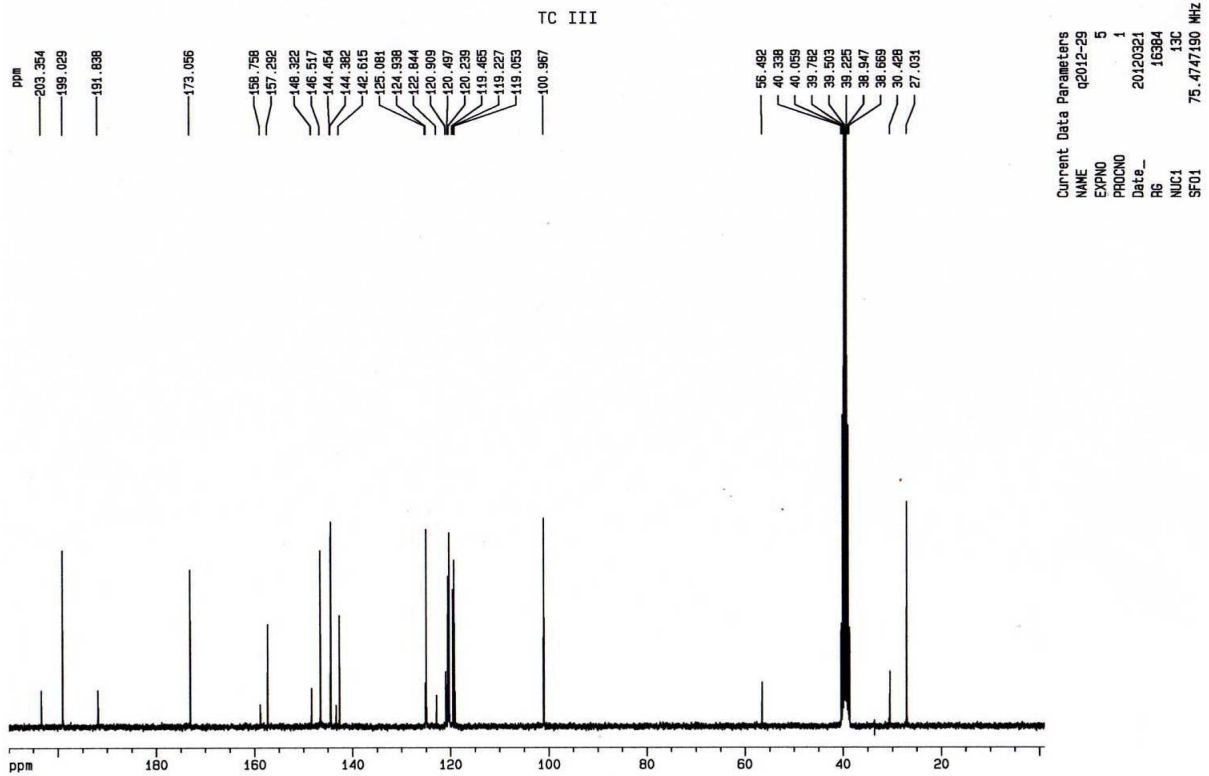
Spectre RMN ^{13}C à 75.47 MHz du composé 1c



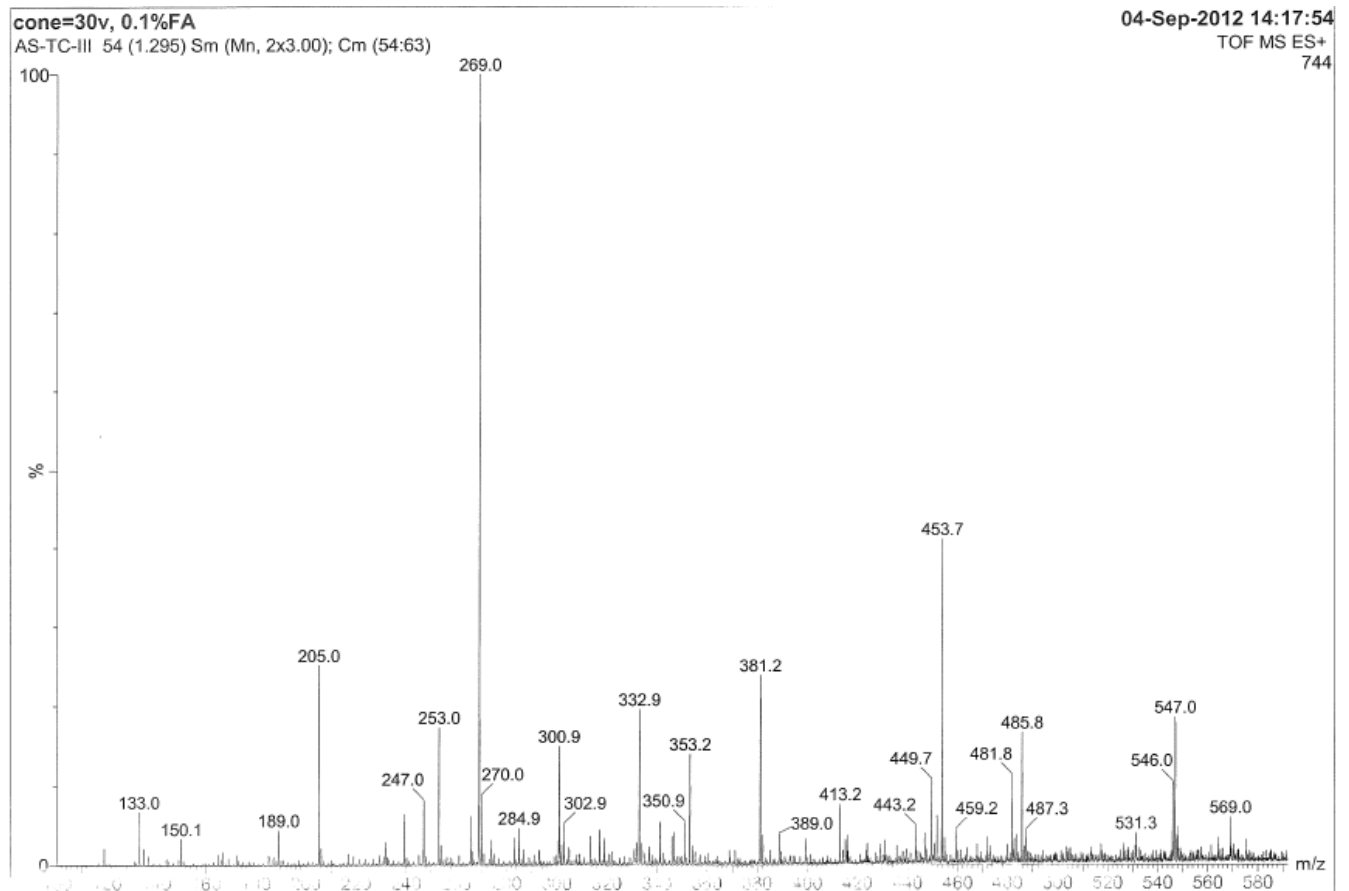
Spectre de masse du composé 1c



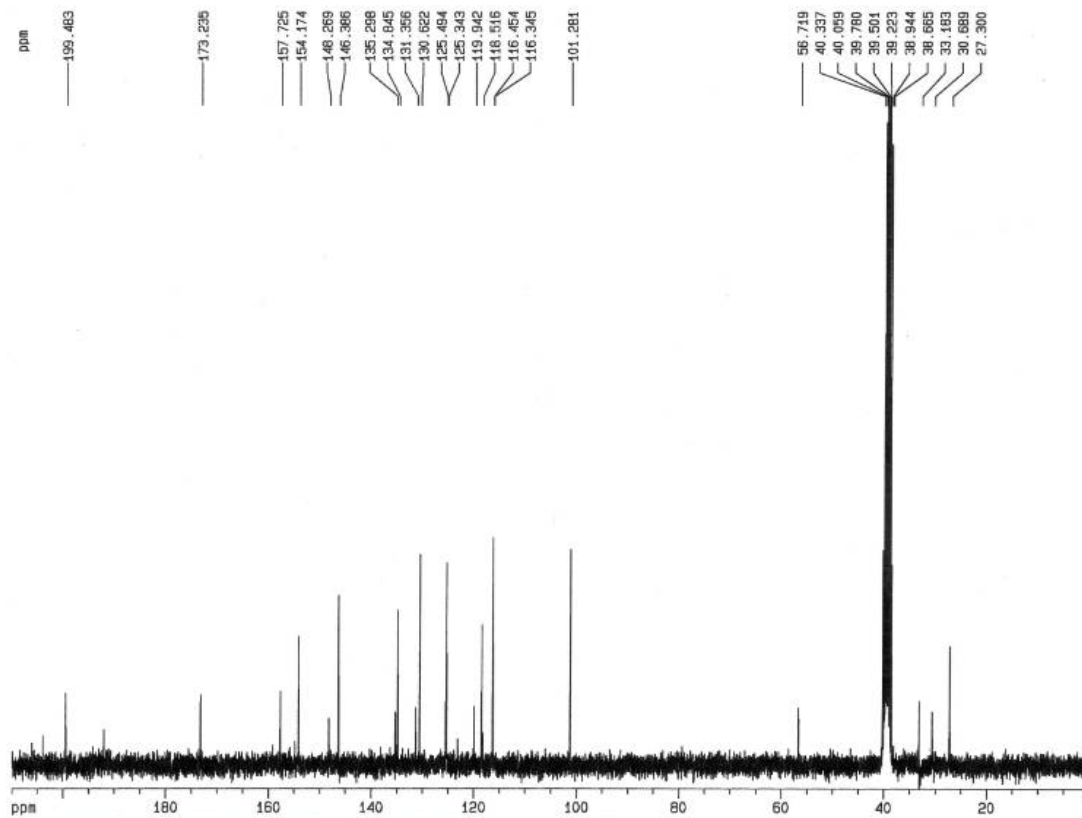
Spectre RMN ^1H à 300.13 MHz du composé 1d



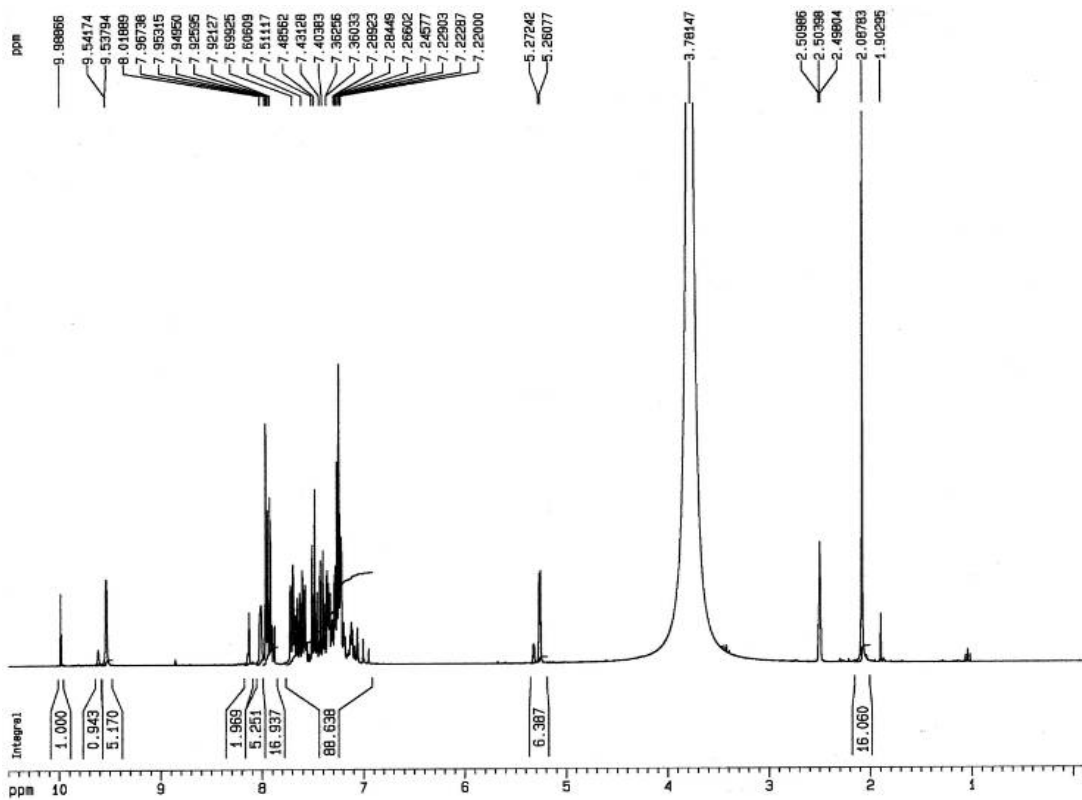
Spectre RMN ^{13}C à 75.47 MHz du composé 1d



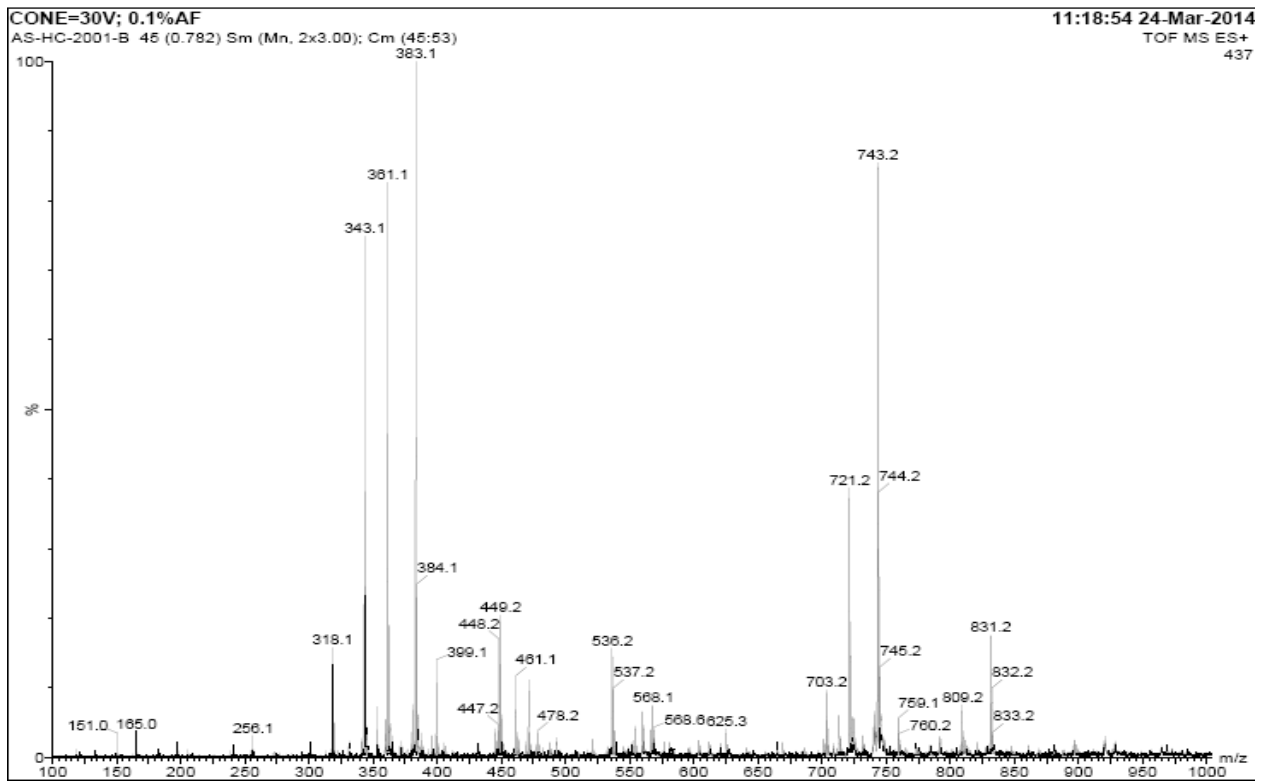
Spectre de masse du composé 1d



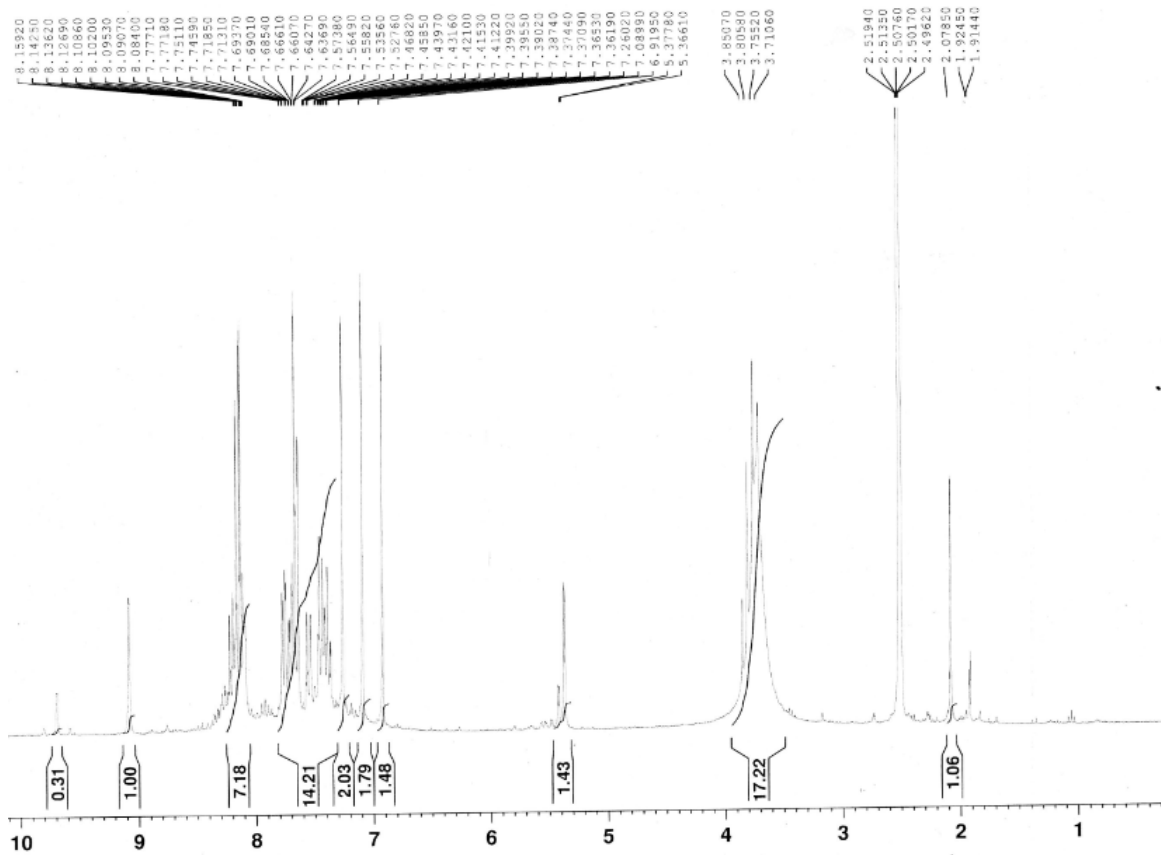
Spectre RMN ^{13}C du composé 4a



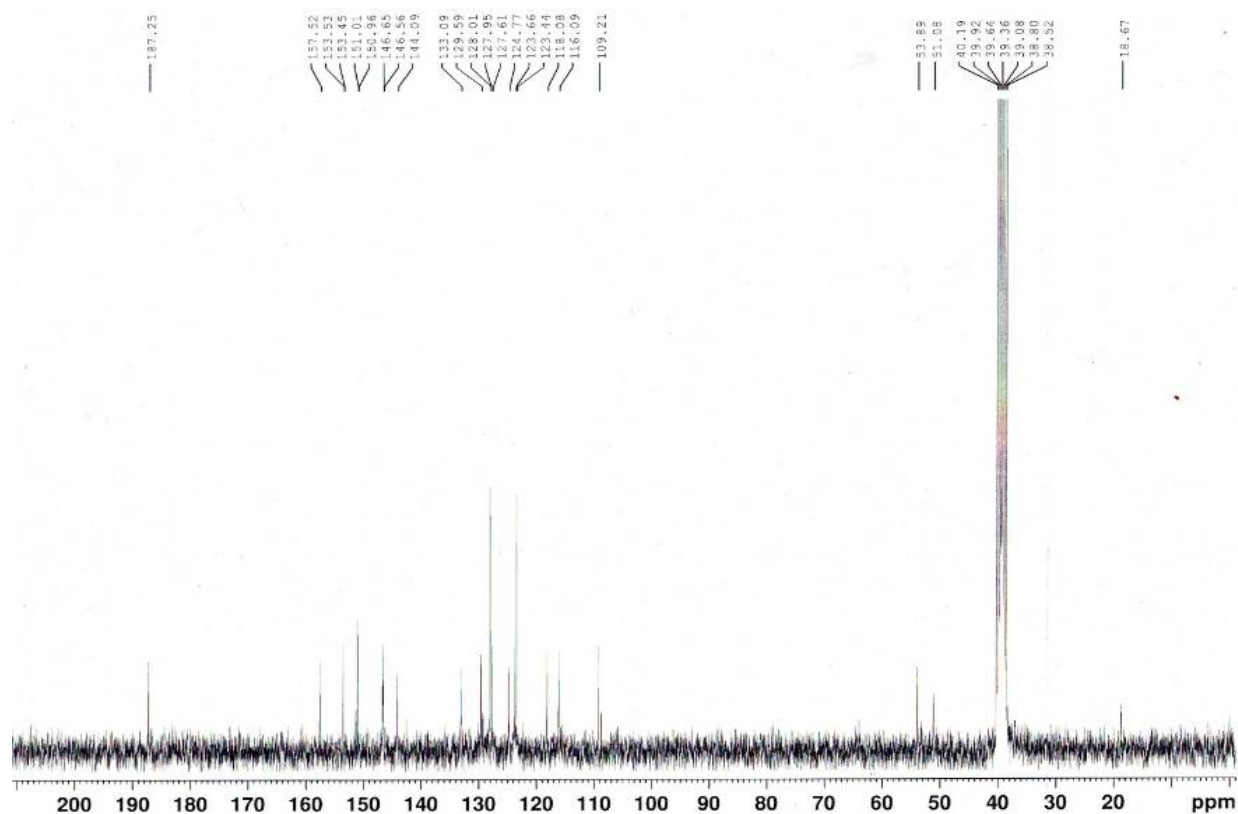
Spectre RMN ^1H du composé 4a



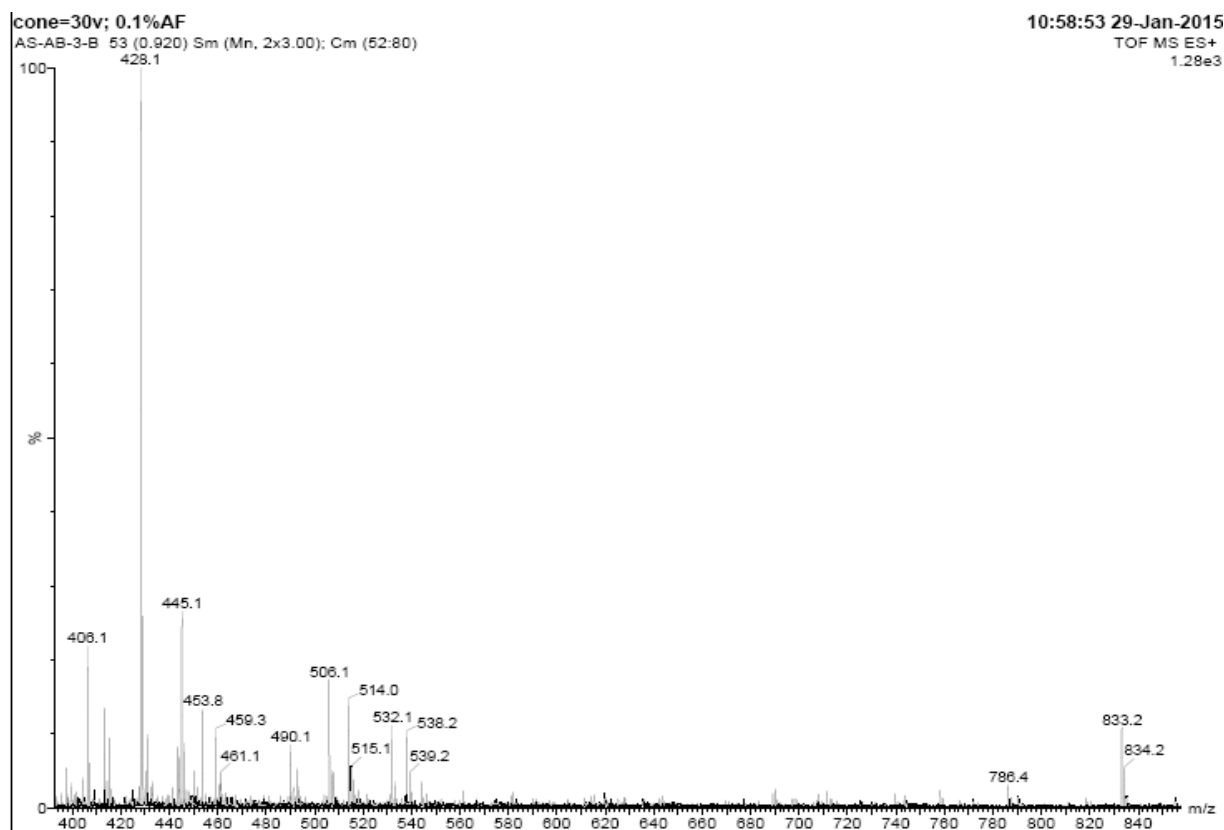
Spectre de masse du composé 4a



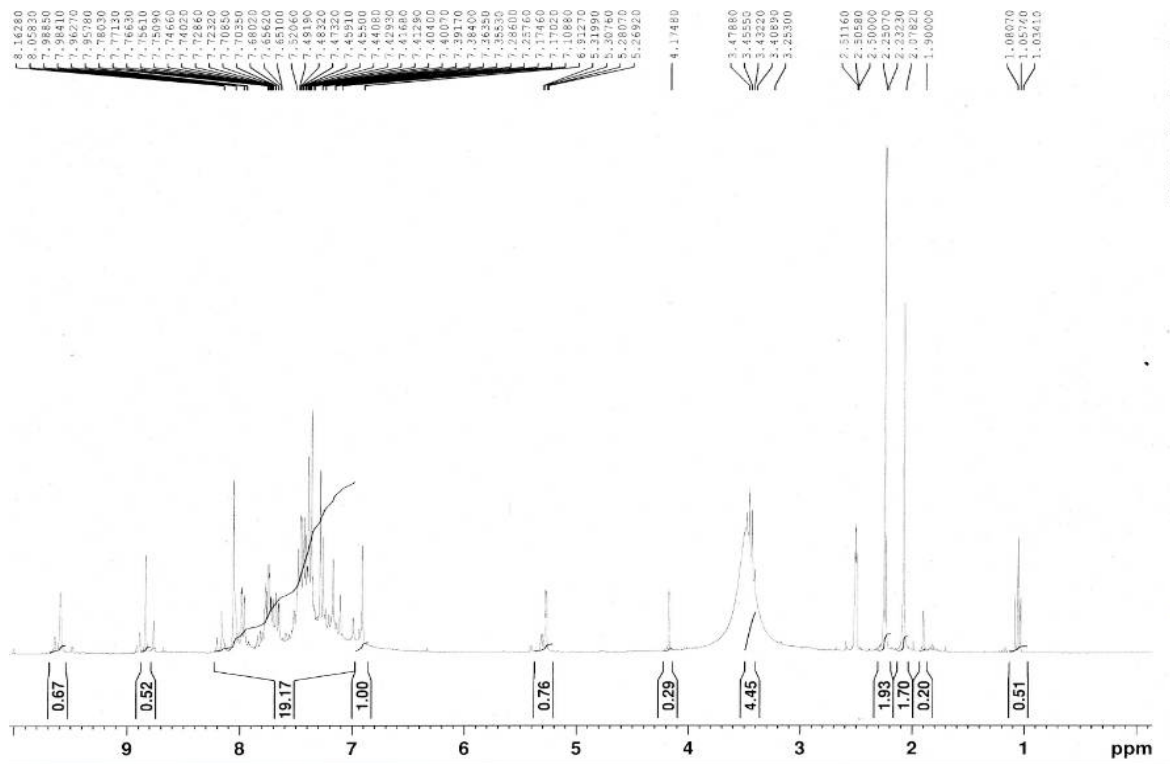
Spectre RMN ^1H du composé 4b



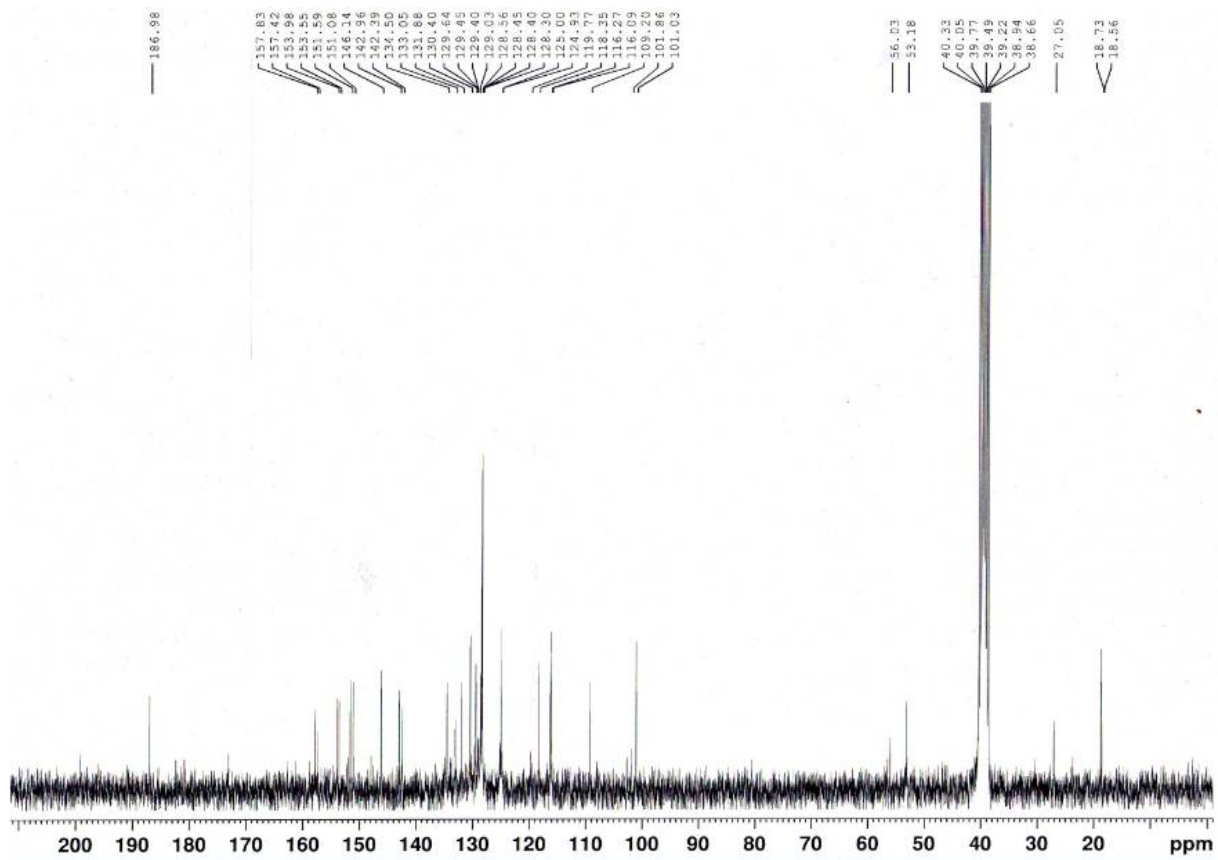
Spectre RMN ^{13}C du composé 4b



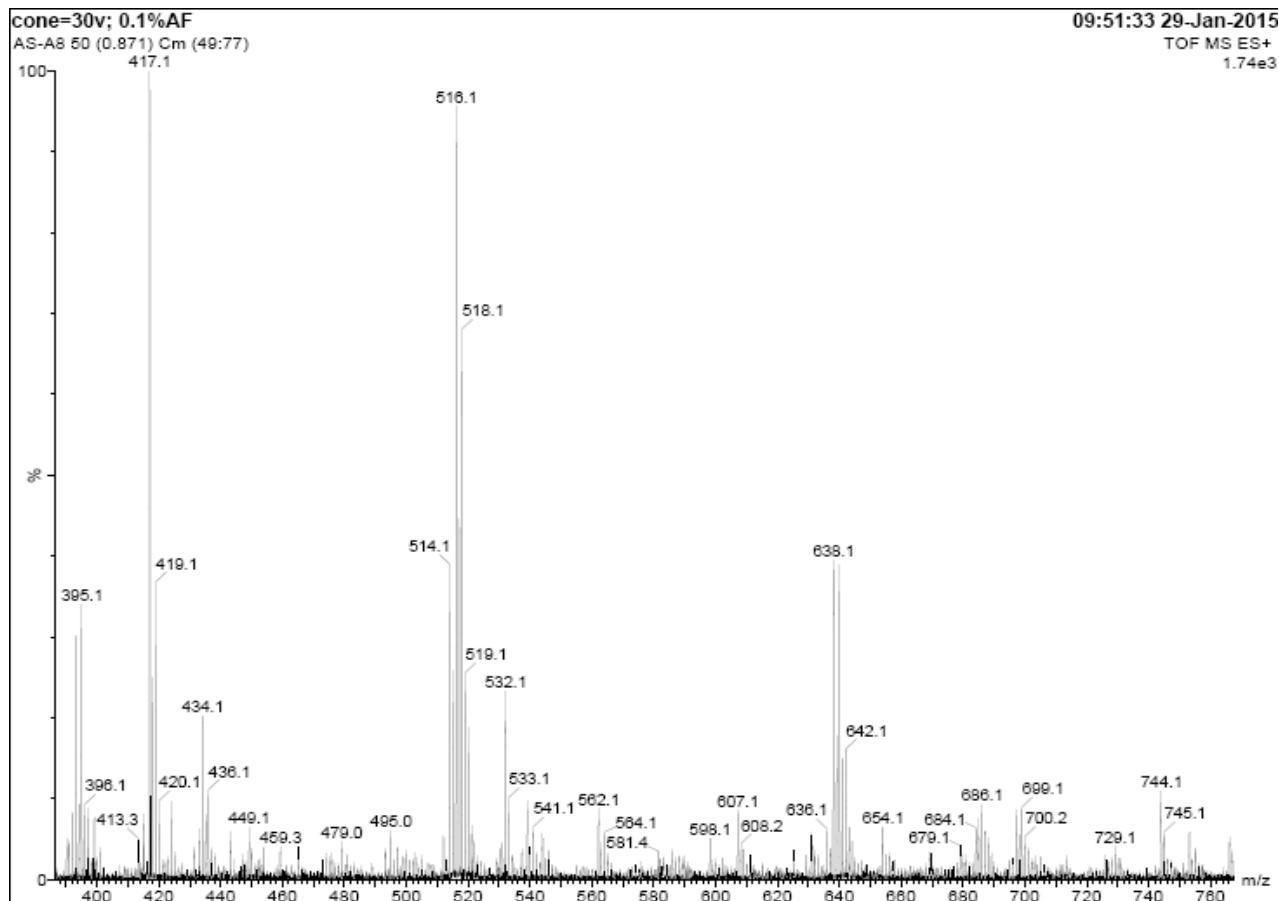
Spectre de masse du composé 4b



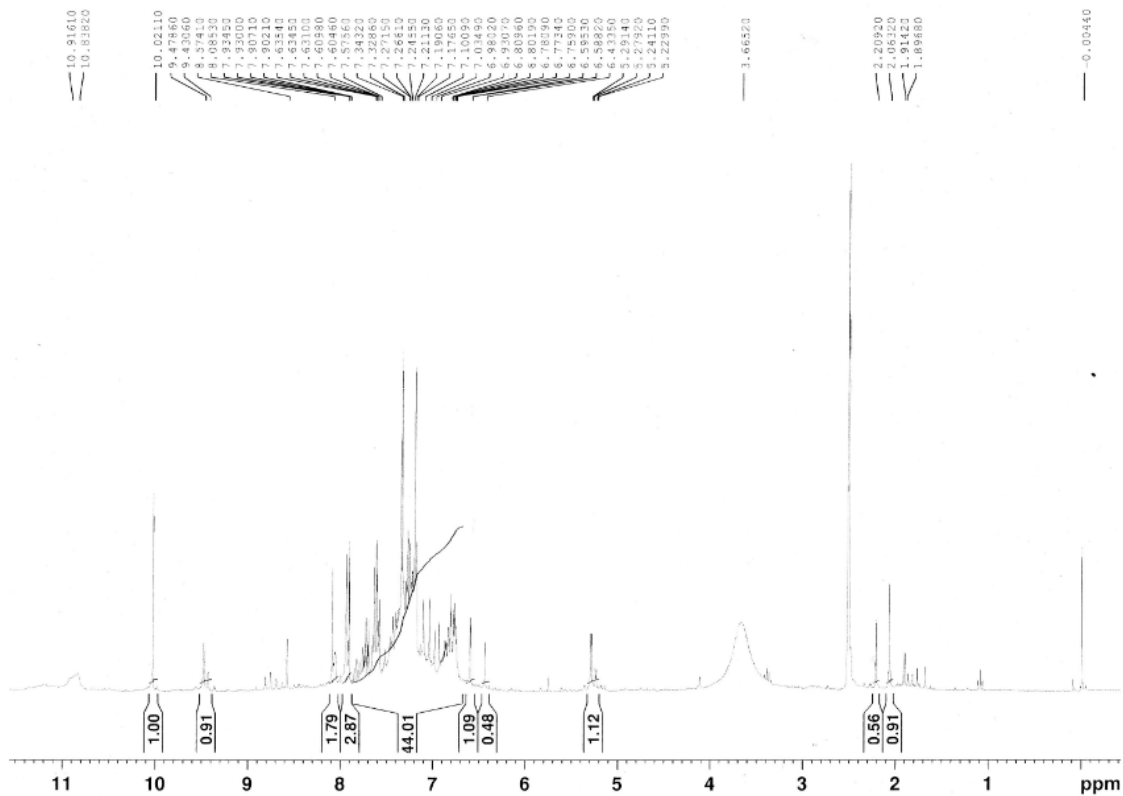
Spectre RMN ^1H du composé 4c



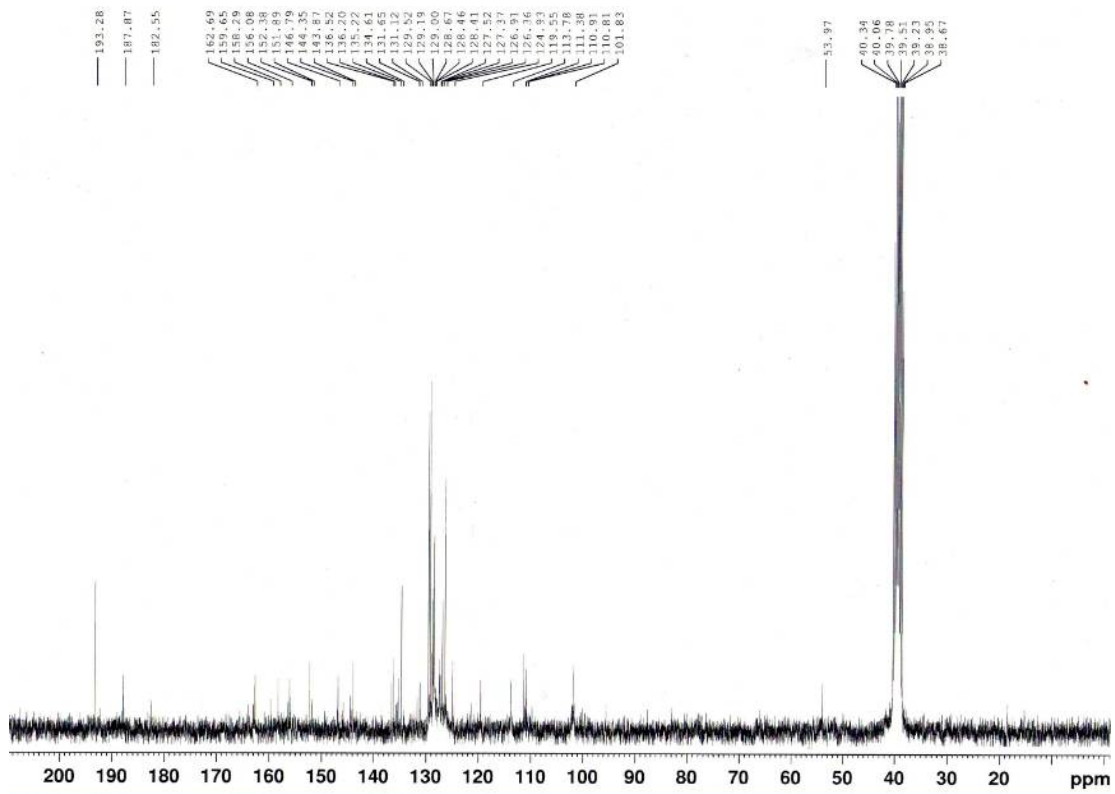
Spectre RMN du ^{13}C du composé 4c



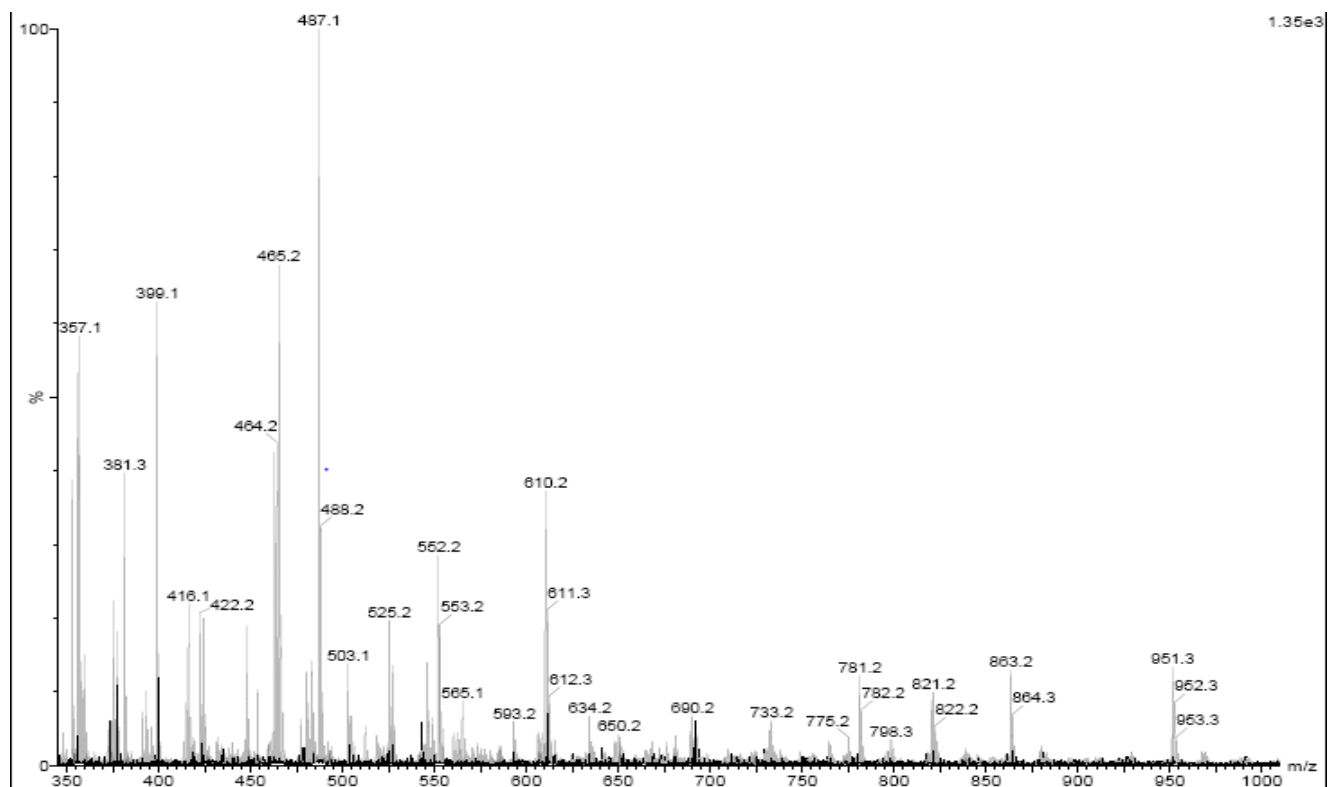
Spectre de masse du composé 4c



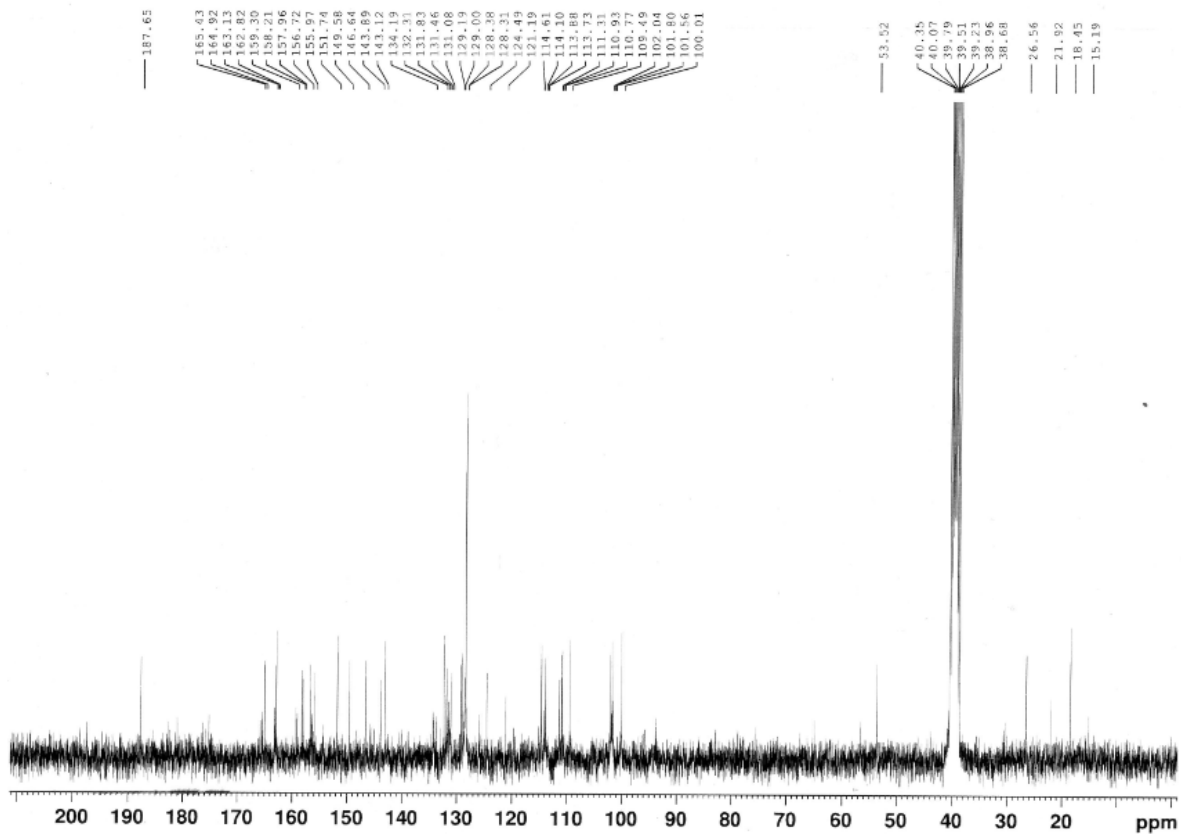
Spectre RMN ^1H du composé 5a



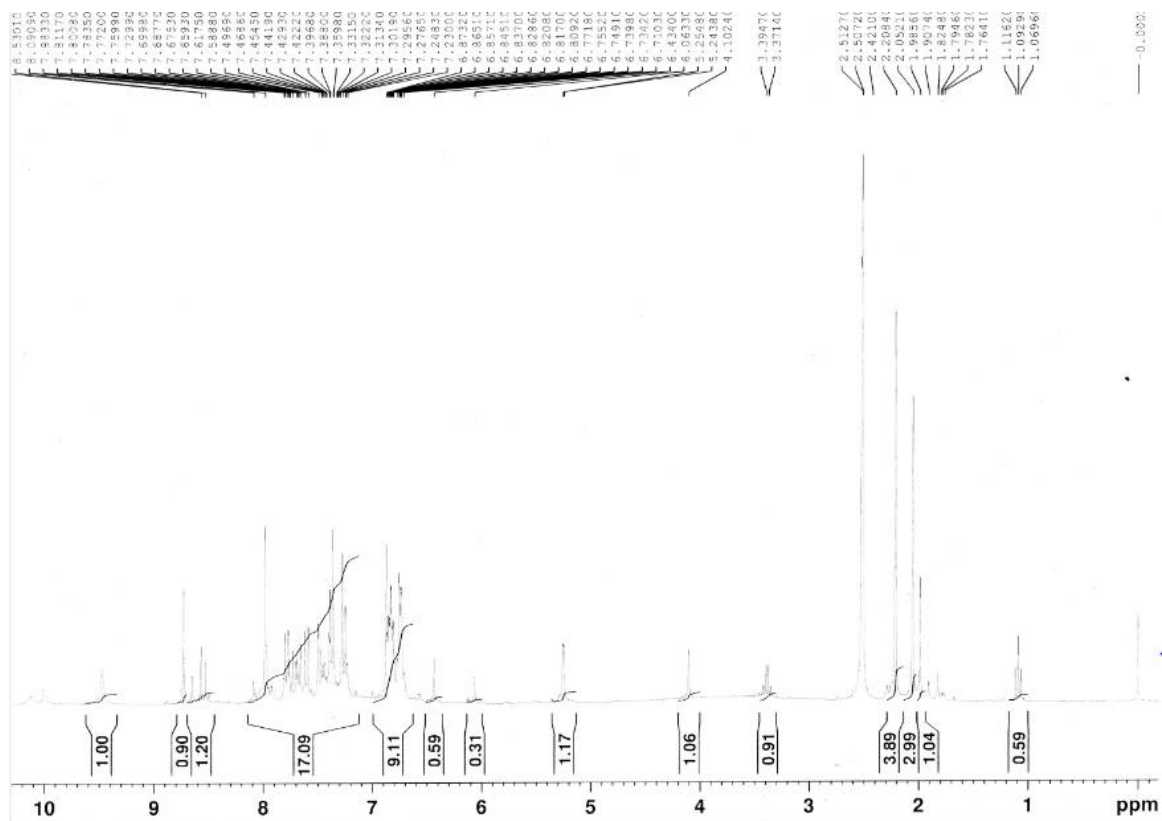
Spectre RMN ^{13}C du composé 5a



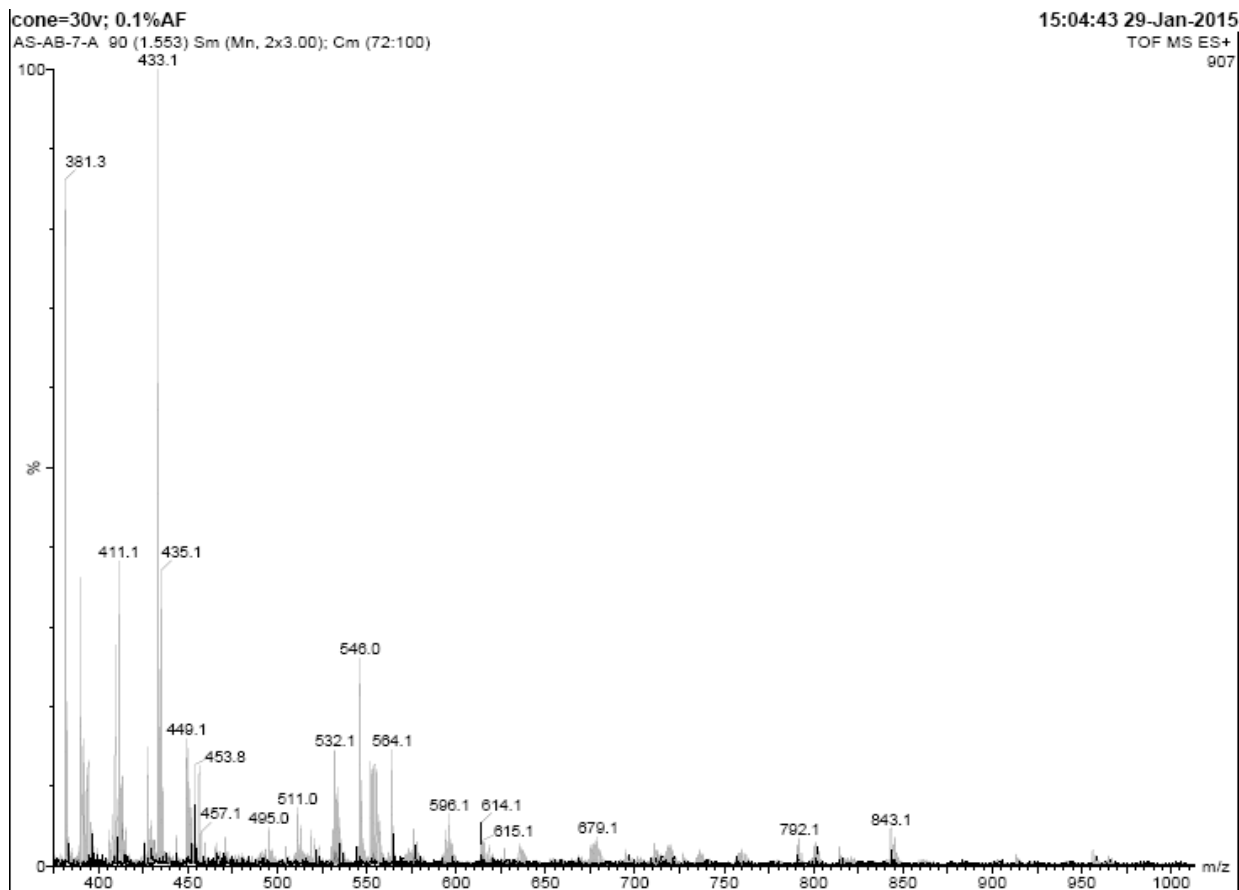
Spectre de masse du composé 5a



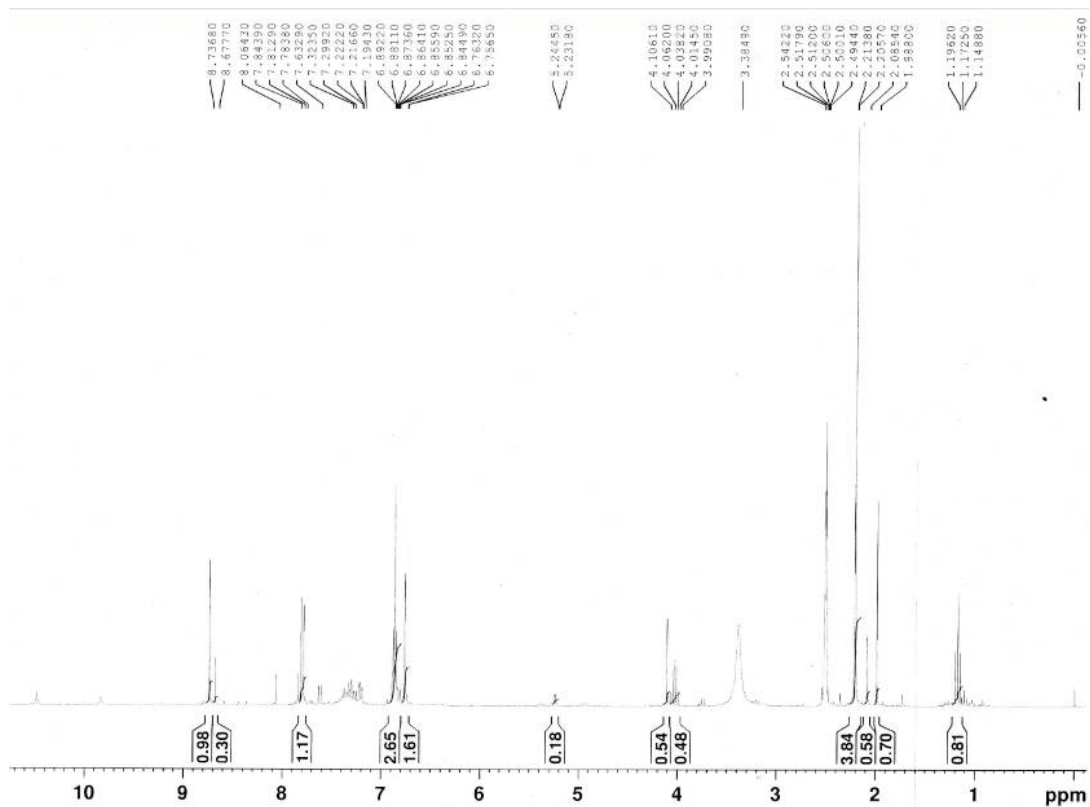
Spectre RMN ^{13}C du composé 5c



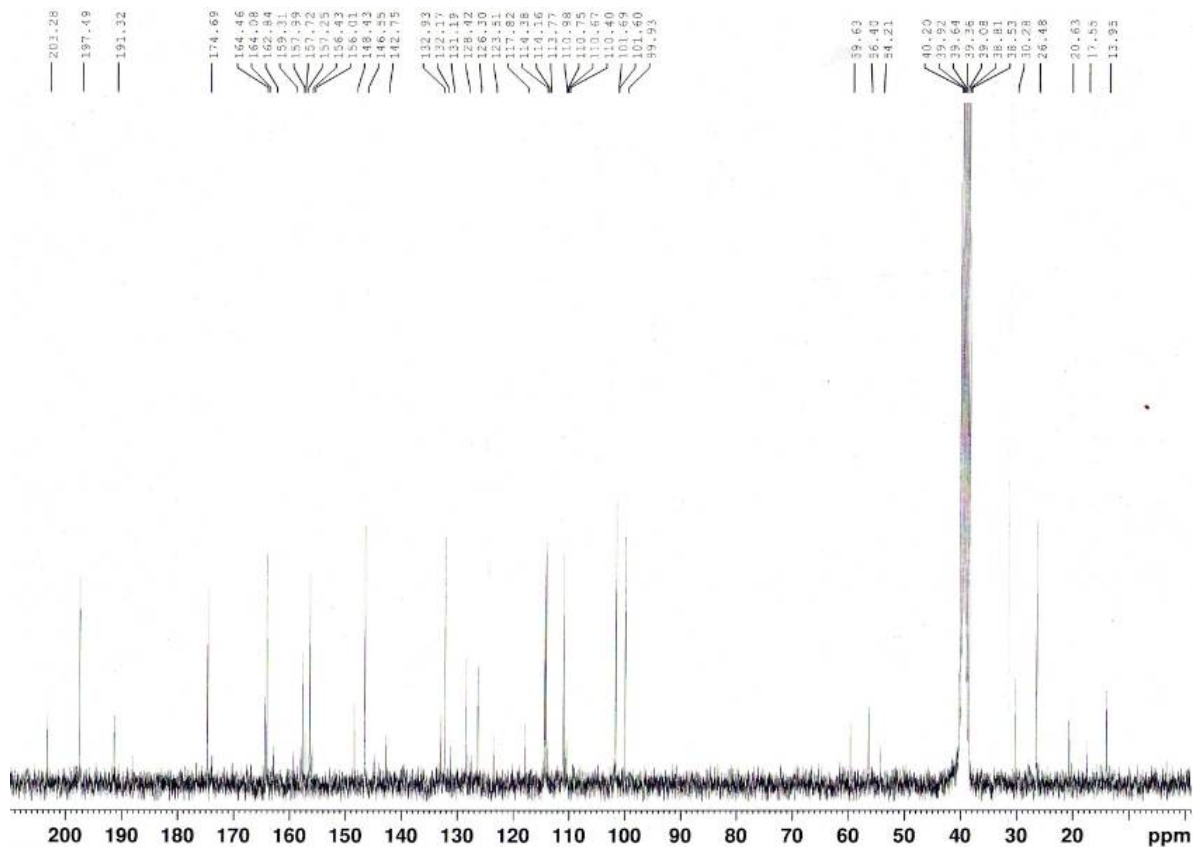
Spectre RMN ^1H du composé 5c



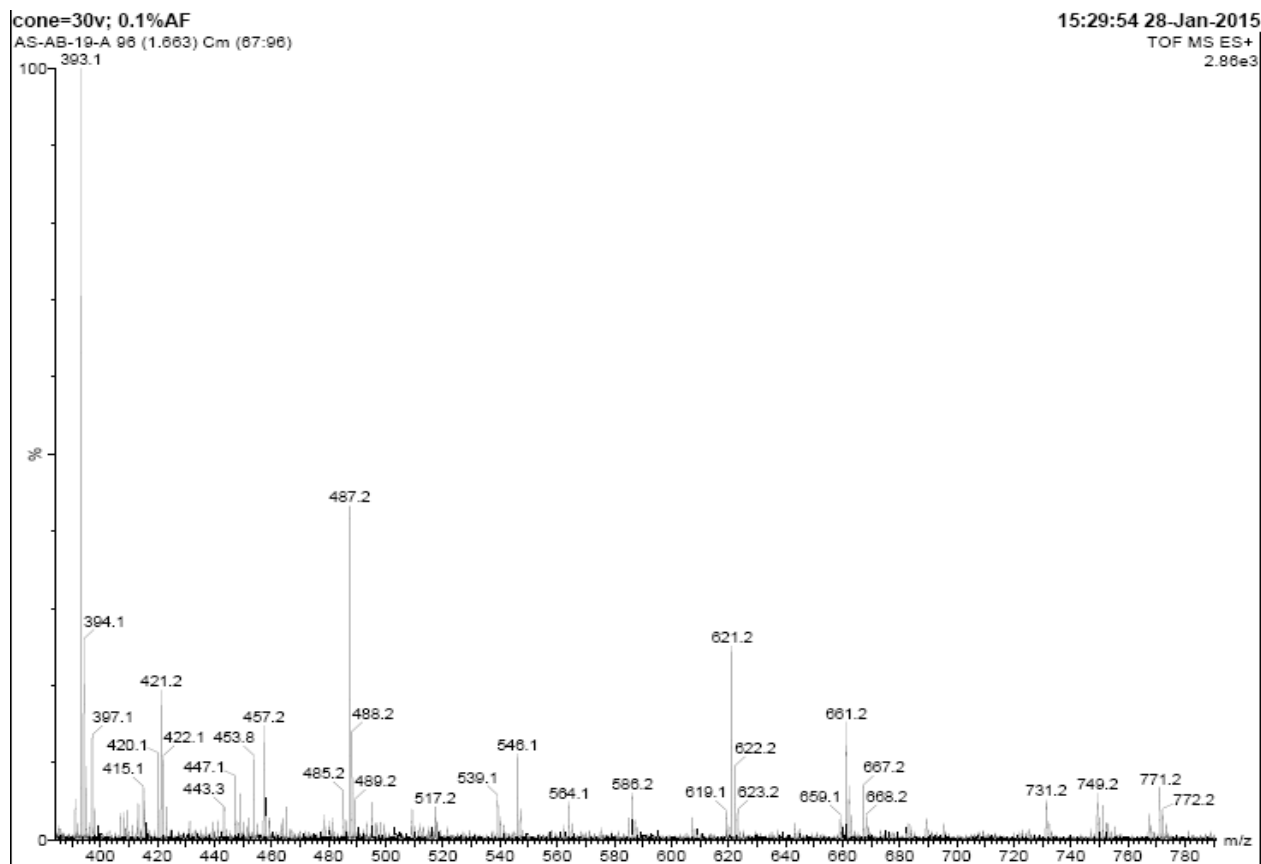
Spectre de masse du composé 5c



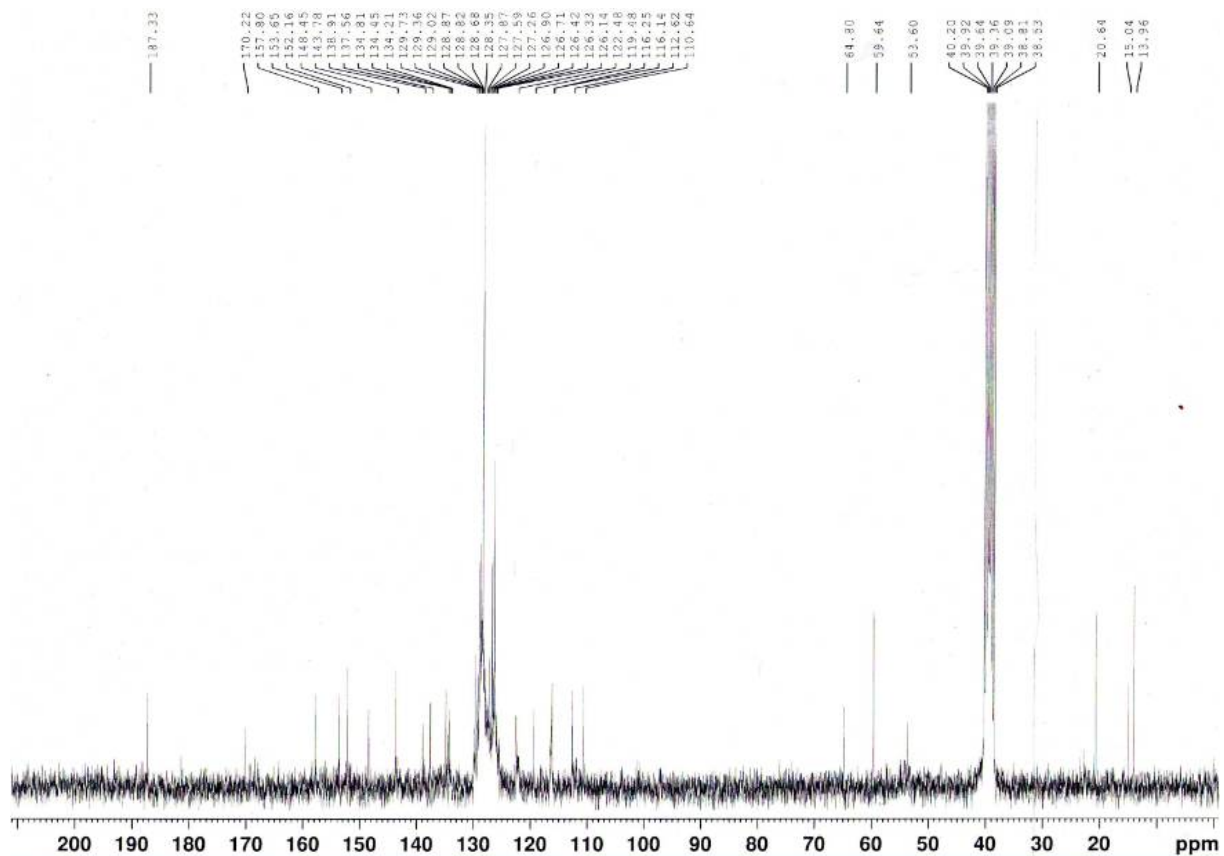
Spectre RMN ¹H du composé 5d



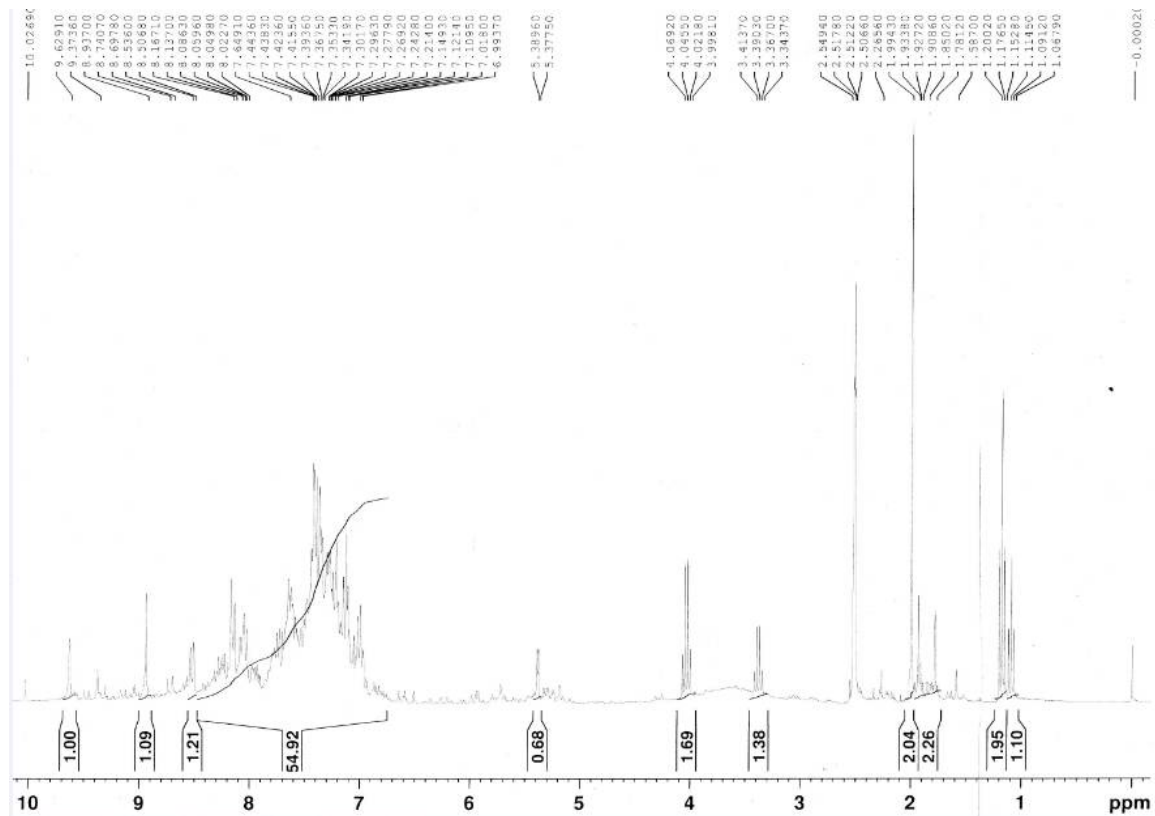
Spectre RMN ^{13}C du composé 5d



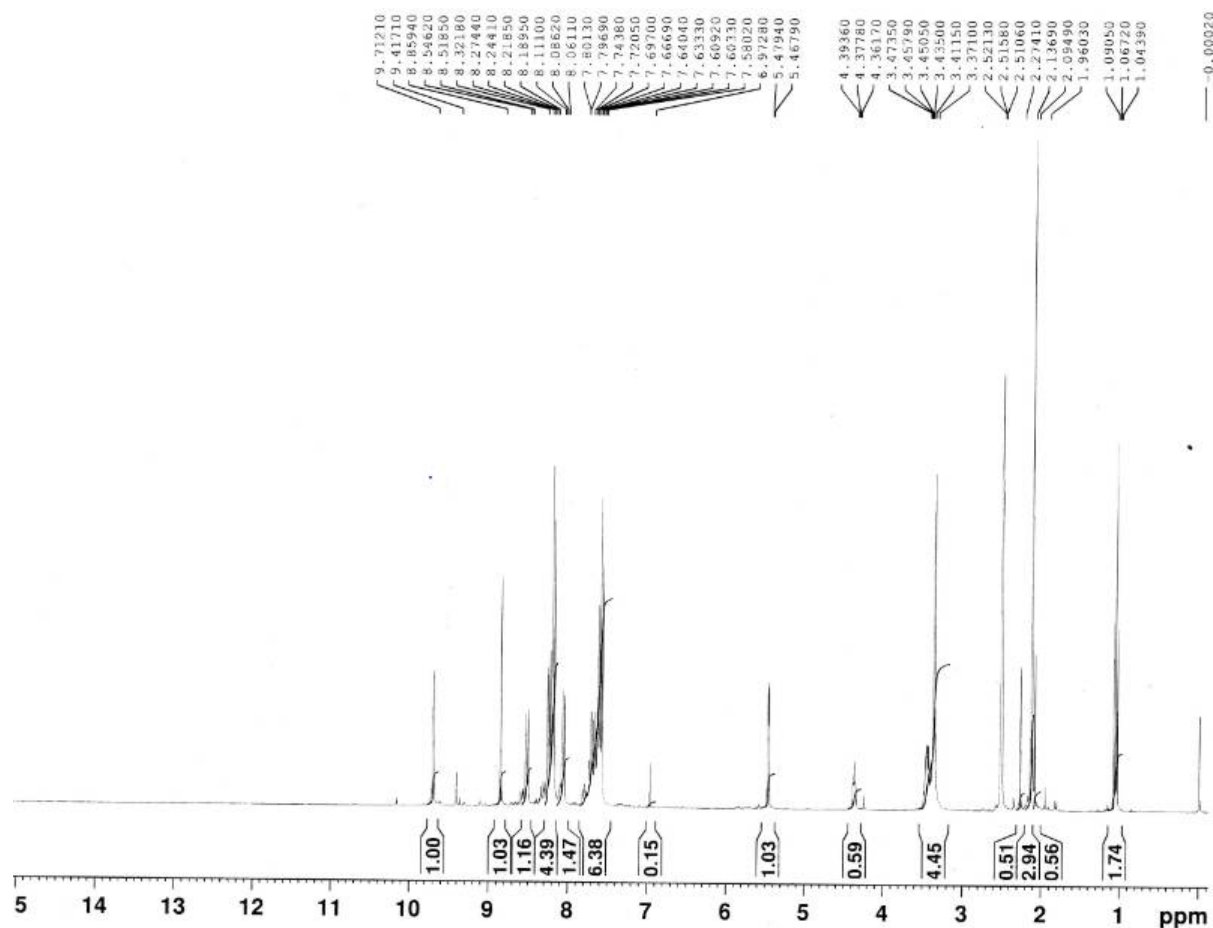
Spectre de masse du composé 5d



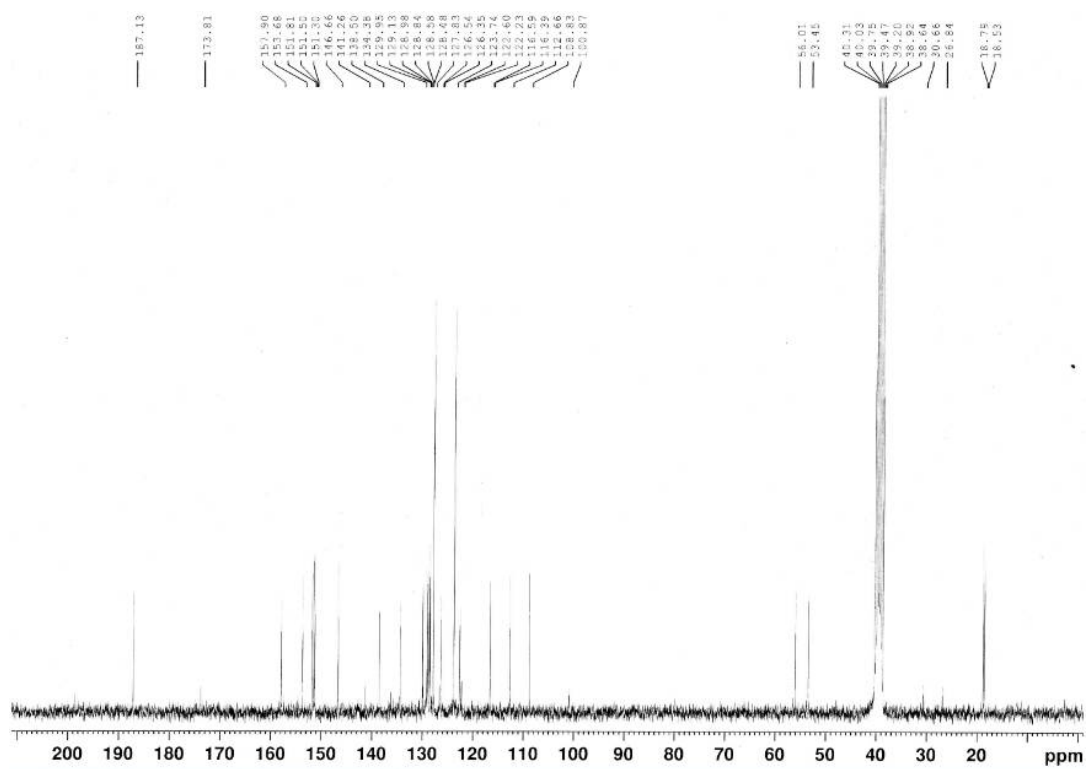
Spectre RMN ^{13}C du composé 6a



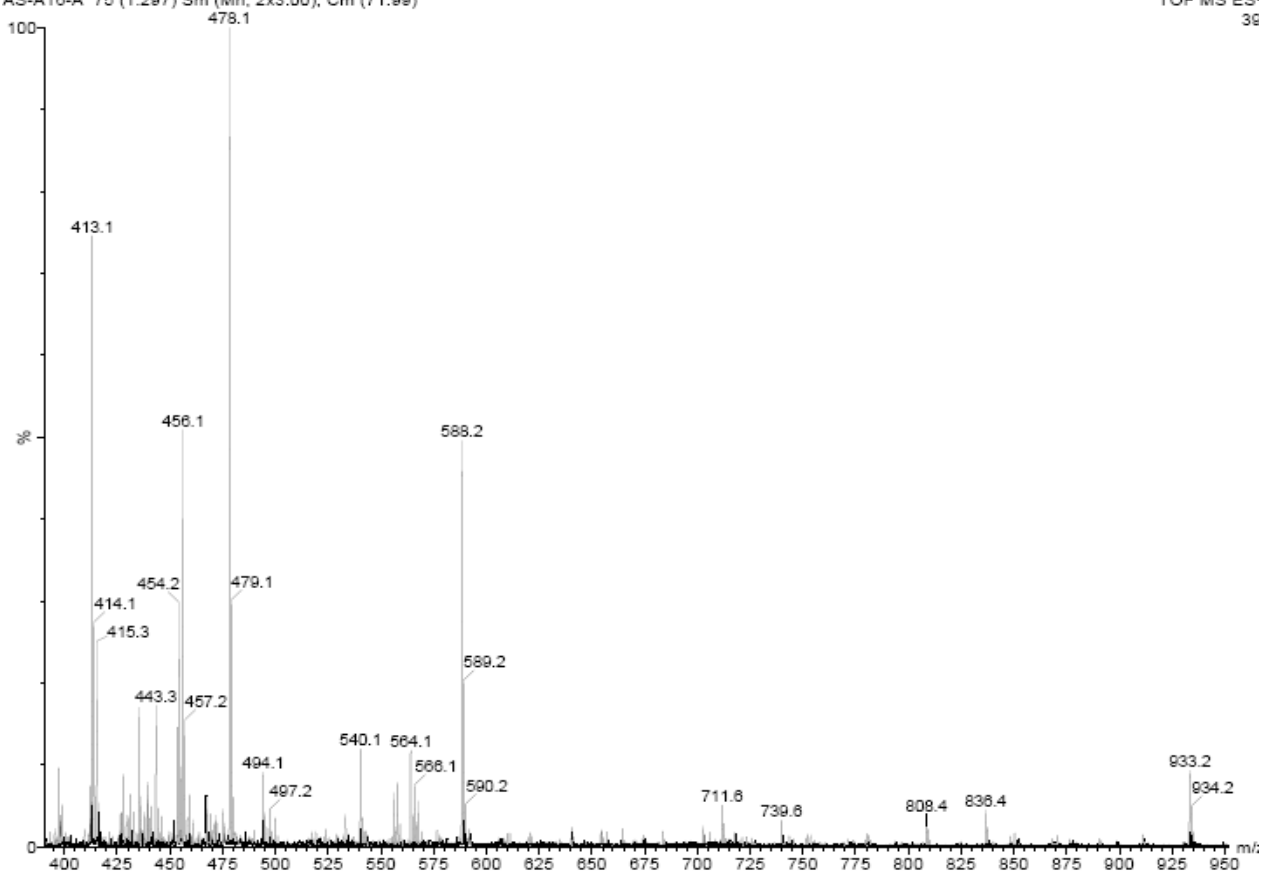
Spectre RMN ^1H du composé 6a



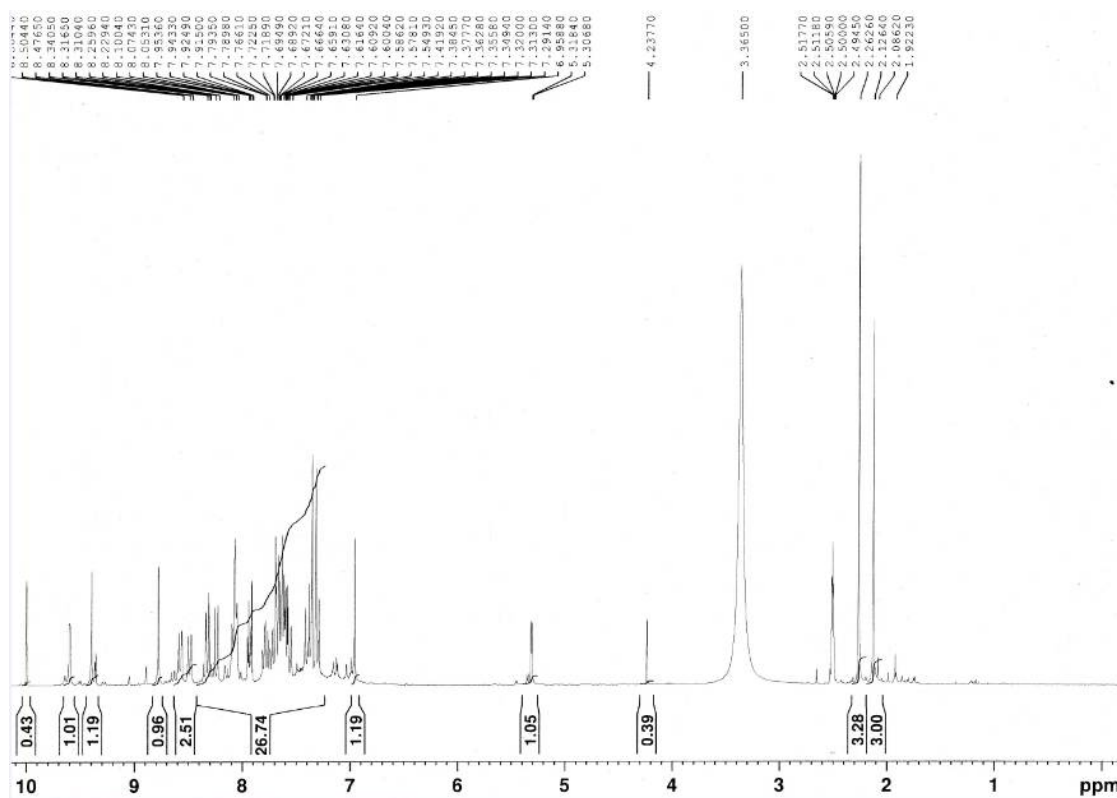
Spectre RMN ^1H du composé 6b

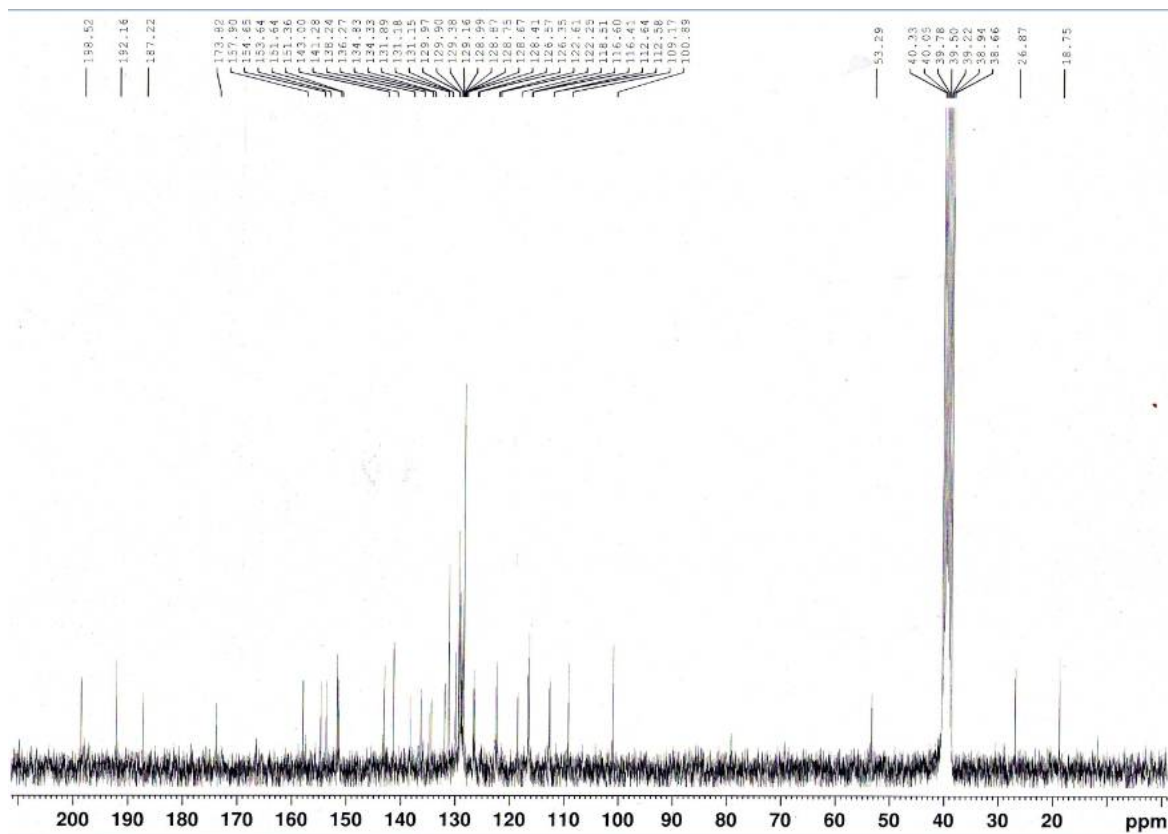


Spectre RMN ^{13}C du composé 6b

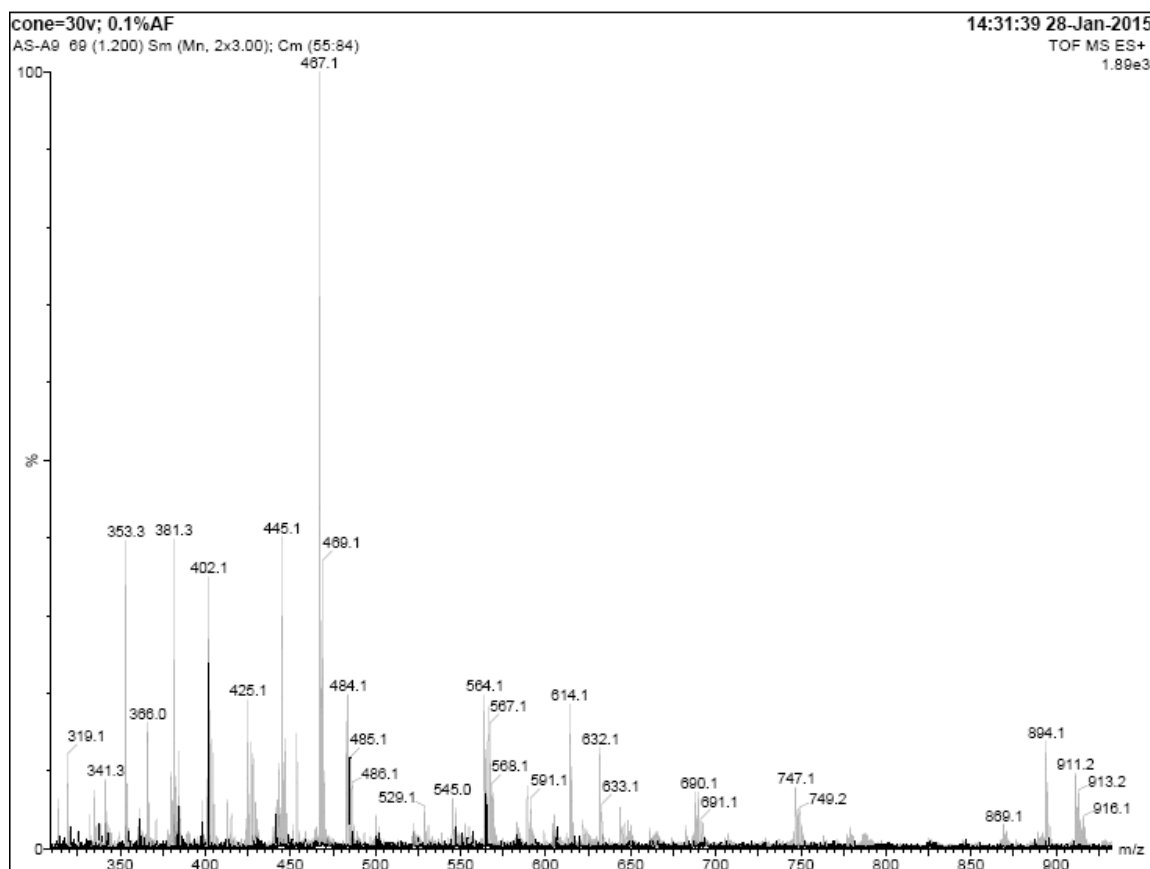


Spectre de masse du composé 6b

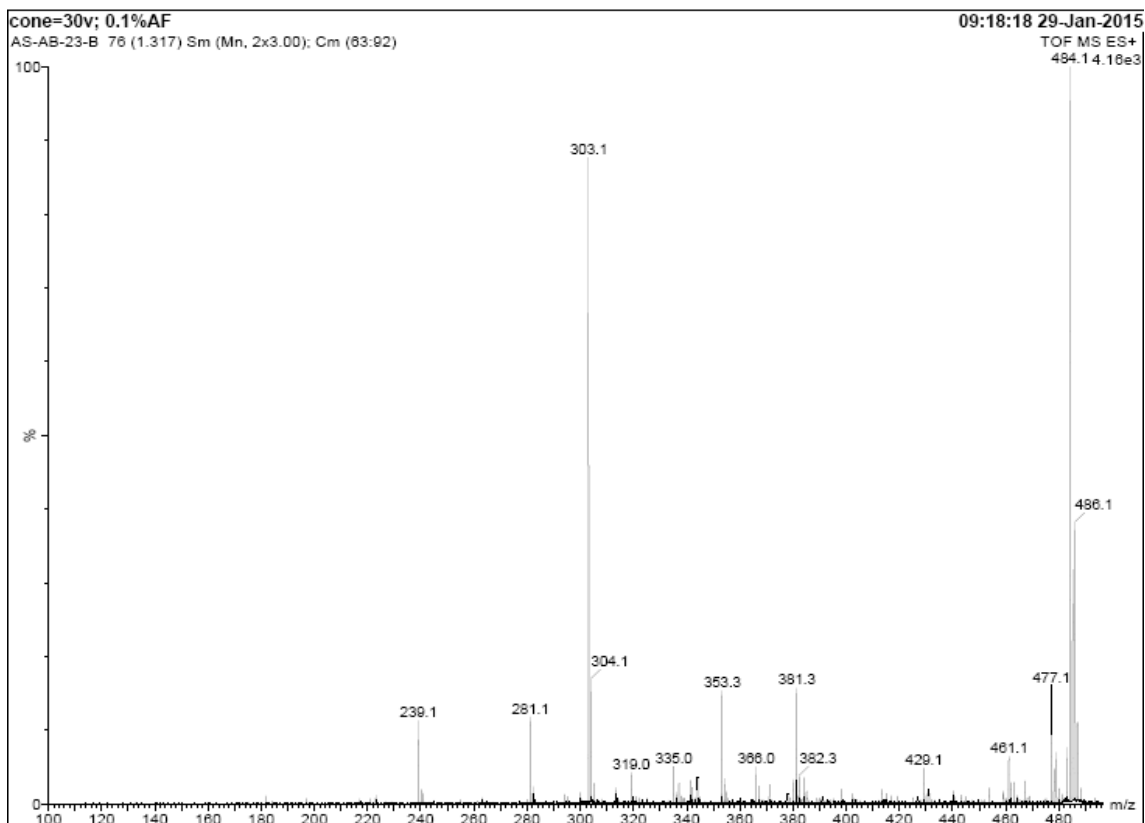




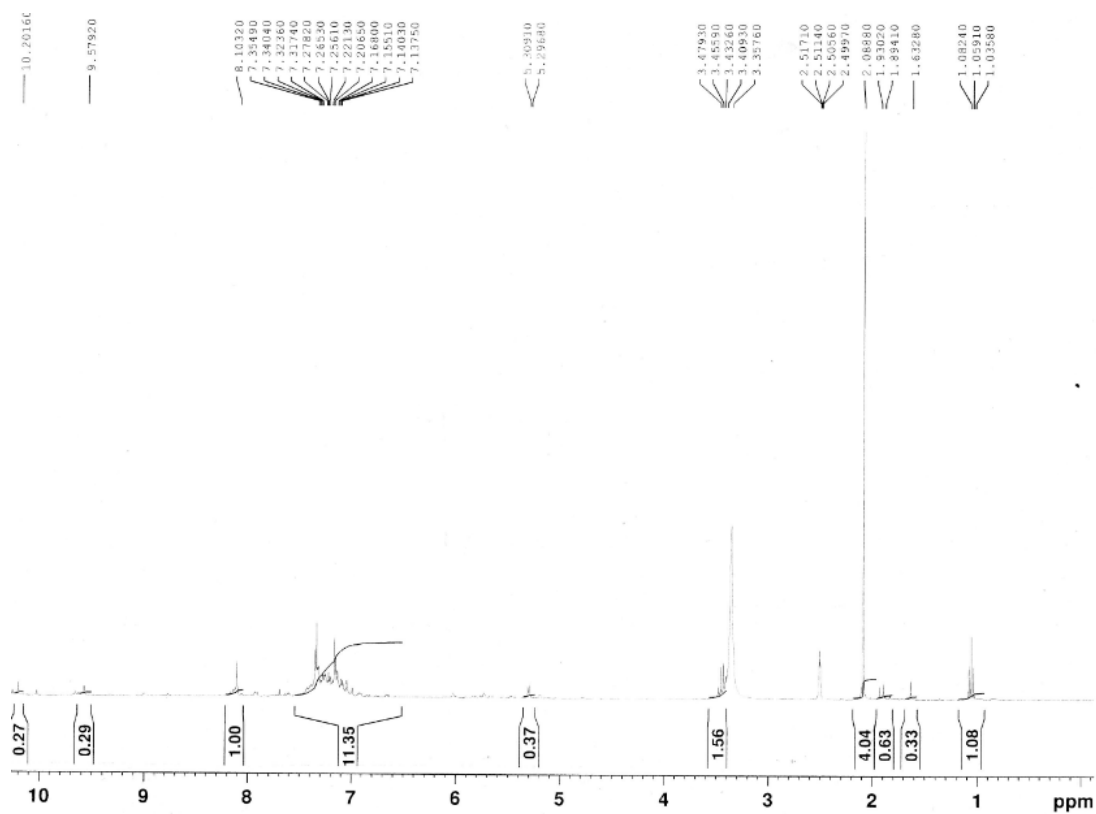
Spectre RMN ^{13}C du composé **6c**



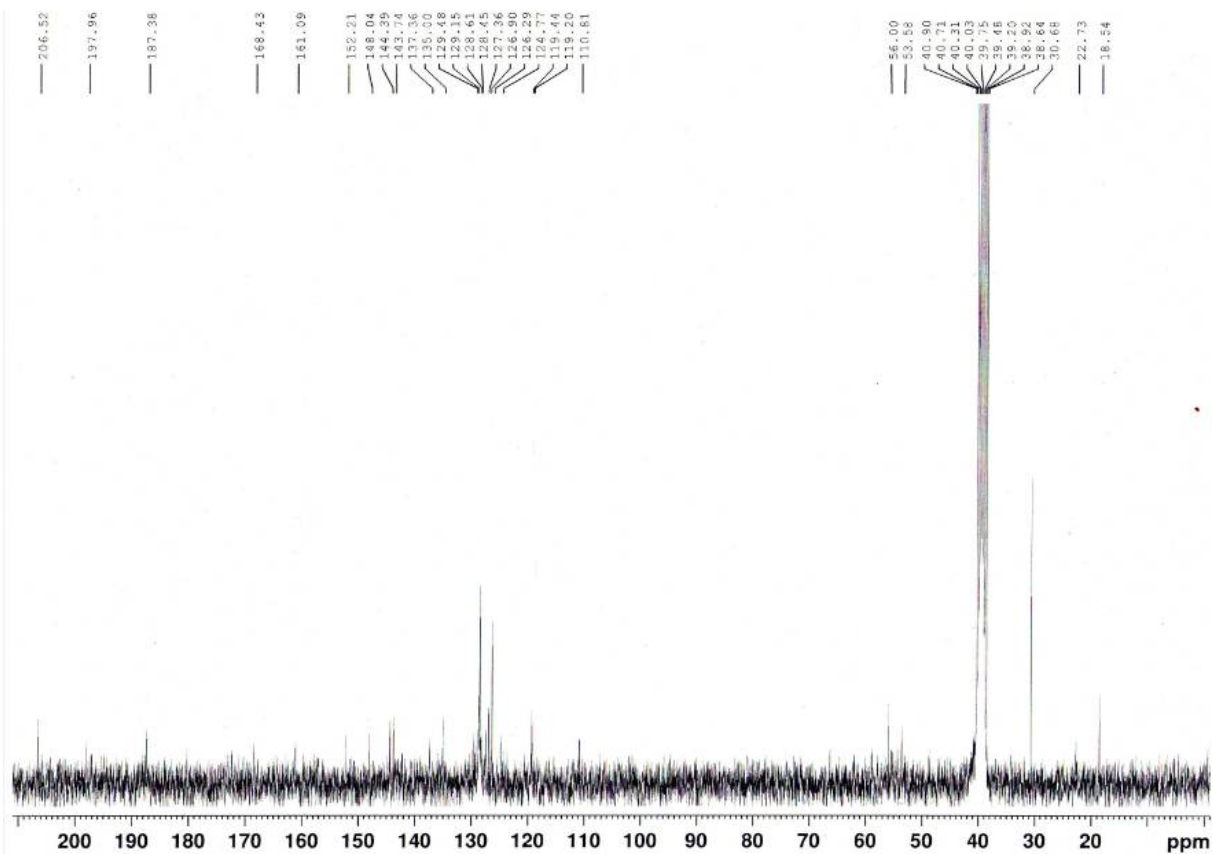
Spectre de masse du composé **6c**



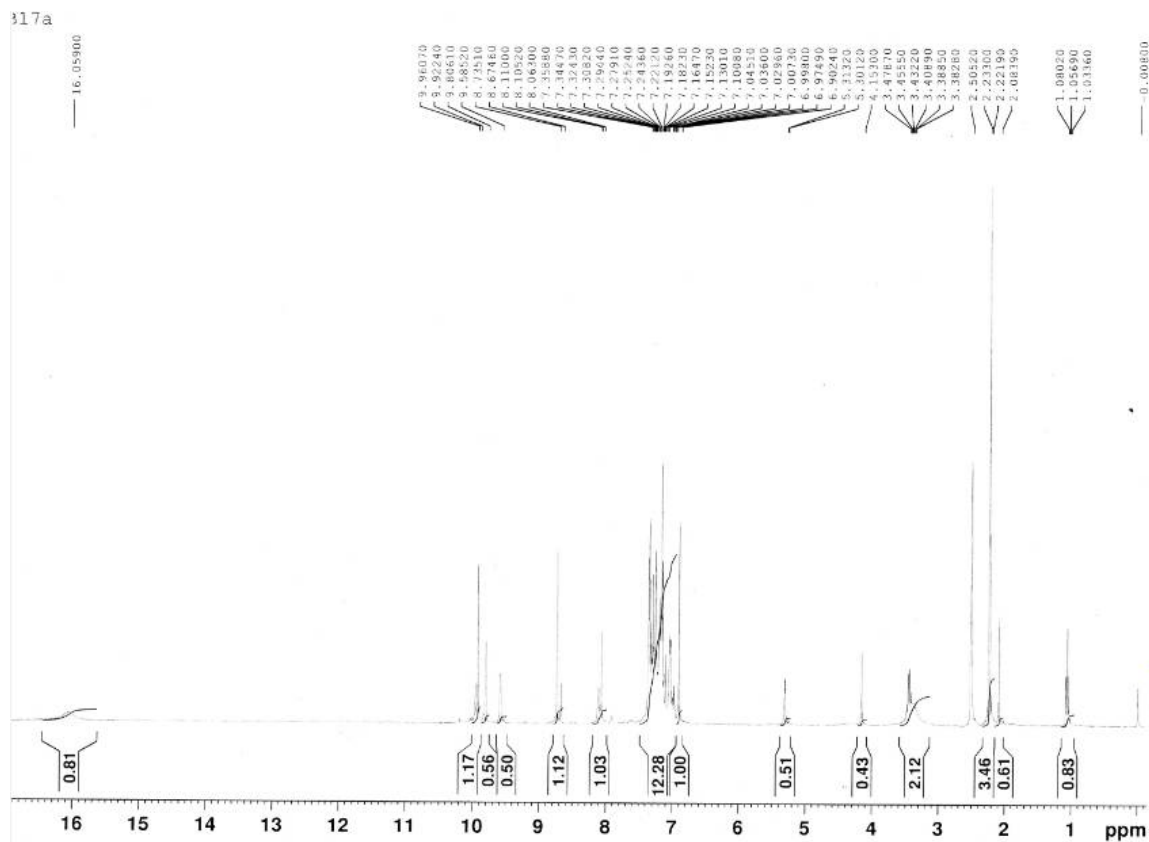
Spectre de masse du composé 6d



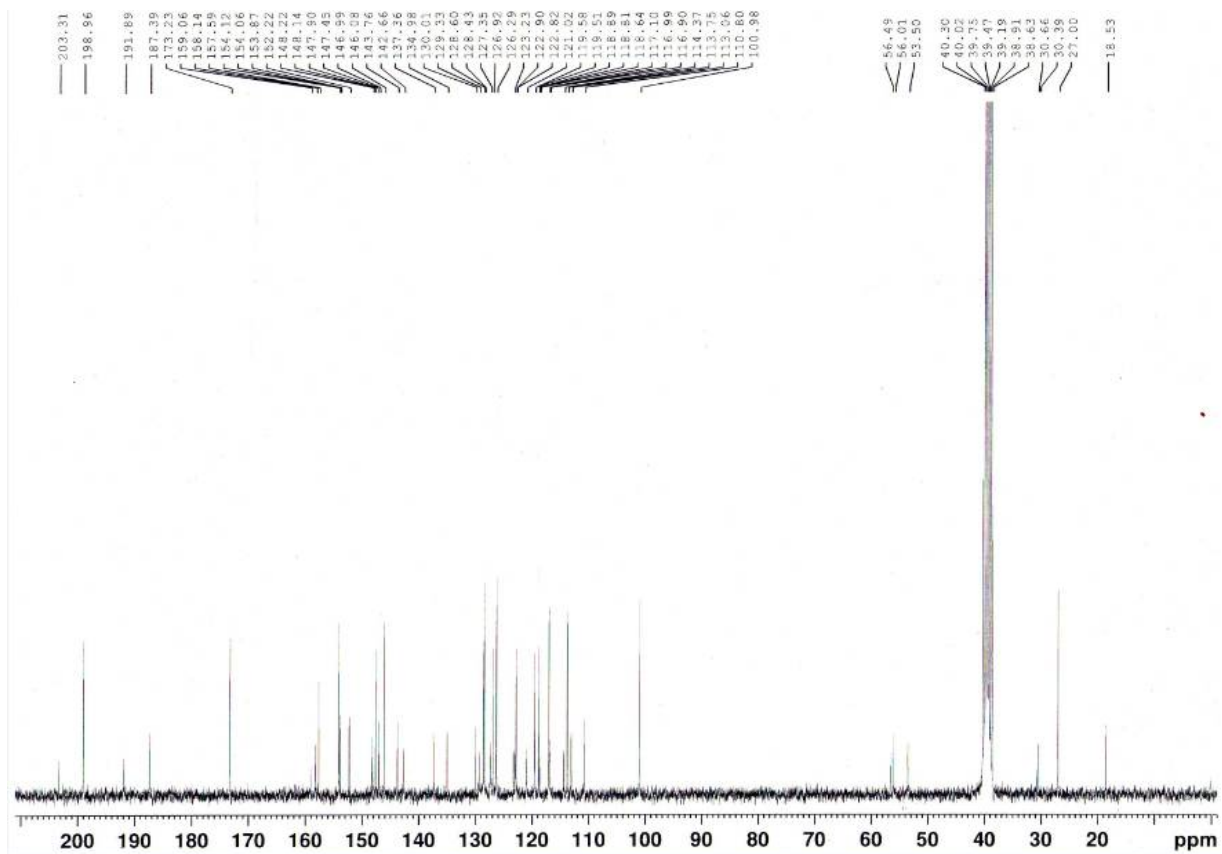
Spectre RMN ^1H du composé 7



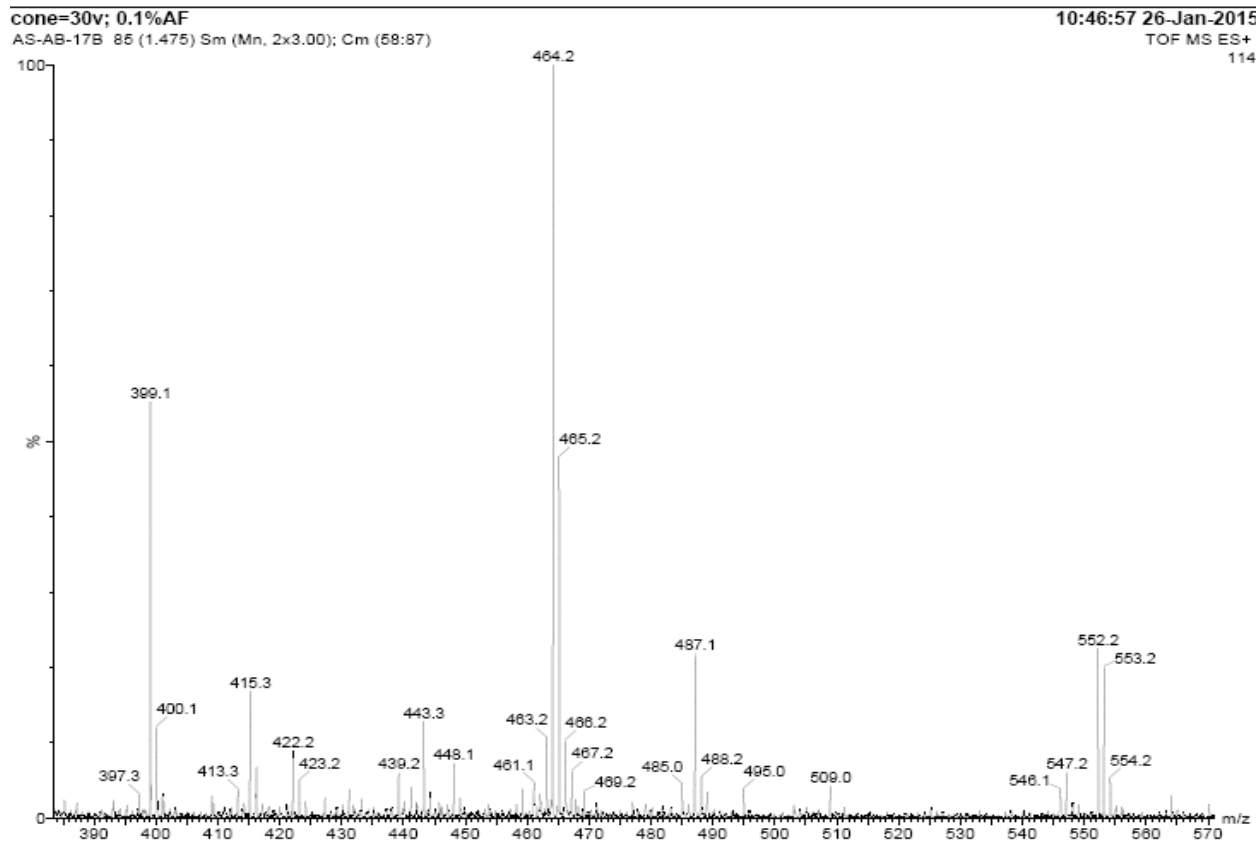
Spectre RMN ^{13}C du composé 7



Spectre RMN ^1H du composé 8



Spectre RMN ¹³C du composé 8



Spectre de masse du composé 8

ANNEXe 2



A facile synthesis of new coumarin-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones/thiones dyads



Amina Benazzouz^{a,b}, Malika Makhloufi-Chebli^{a,b}, Nejla Khatir-Hamdi^c,
Baya Boutemour-Khedis^b, Artur M.S. Silva^{d,*}, Maamar Hamdi^{b,*}

^aDépartement de Chimie, Faculté des Sciences, Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou 15000 Algeria

^bLaboratoire de Chimie Organique Appliquée (Groupe Hétérocycles), Faculté de Chimie, Université des Sciences et de la Technologie, BP32, El-Alia 16111 Bab-Ezzouar, Alger, Algeria

^cUnité de Recherche Ingénierie et Environnement, Département du Génie de l'Environnement, École Nationale Polytechnique, 10, Avenue des Frères Ouadek, Hassen badi, BP.182, 16200 El Harrach, Alger, Algeria

^dDepartment of Chemistry & QOPNA, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 March 2015

Accepted 10 April 2015

Available online 16 April 2015

Keywords:

Nitrogen heterocycles

3-(Acetoacetyl)coumarins

3,4-Dihydropyrimidinone

3,4-Dihydropyrimidinethione

Biginelli reaction

ABSTRACT

A new series of 4-aryl-6-methyl-5-(2-oxo-2H-chromene-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones/thiones (DHPMs) have been synthesized through multicomponent Biginelli reactions, involving 3-(acetoacetyl)coumarin derivatives, *para*-substituted benzaldehydes, and urea/thiourea in refluxing acetonitrile, in the presence of a catalytic amount of sulfuric acid. The structure of all newly synthesized compounds has been established by 2D NMR spectroscopic spectra (HSQC, HMBC, and NOESY), elemental analysis, and mass spectrometry.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Nitrogen heterocycles are a very important class of compounds and an interesting field for research with great opportunities for the synthesis of novel drugs. For instance, pyrimidinone derivatives are widely distributed in nature and exhibit various biological properties, such as antimalarial,^{1–3} antibacterial,⁴ antifungal,⁵ anti-HIV,⁶ antiviral,⁷ anticancer,⁸ and anti-inflammatory^{9,10} activities. Therefore, the corresponding dihydropyrimidinones (DHPMs) have exhibited important therapeutic and pharmacological properties, namely as the integral backbone of several calcium channel blockers,¹¹ antihypertensive agents,¹² and α 1a-antagonists.¹³ A broad range of biological effects including antiviral, antitumor, antibacterial, and anti-inflammatory activities have been described for these compounds.^{13–15} Functionalized DHPMs have shown significant antibacterial,¹⁶ antiviral,¹⁷ and antitumor¹⁸ activities. The synthesis of DHPMs has been the focus of great interest for organic and medicinal chemists.^{13,15} The most common method for

the synthesis of DHPMs and the corresponding dihydropyrimidinethiones (DHPMTs) involves the multicomponent Biginelli reaction.¹⁹ The original Biginelli protocol for the preparation of DHPMs consisted of heating a mixture of three components, a β -ketoester, an aldehyde, and urea, in ethanol containing a catalytic amount of HCl.²⁰ Multicomponent reactions (MCRs) are convergent reactions, in which three or more starting materials react to form a product. In an MCR, a product is assembled according to a cascade of elementary chemical reactions. In contrast to classical multistep linear synthetic protocols, MCRs enable expedient and efficient assembly of molecules of structural complexity and diversity in one-pot operations with facile execution, high atom economy, and selectivity. Multicomponent reactions (MCRs) have facilitated many fascinating and challenging transformations in organic synthesis. These reactions obviate the isolation and purification of intermediates and diminish waste generation, thereby enhancing the greenness of transformations. MCRs are emerging as powerful tools in the synthesis of complex biologically important compounds.²¹

Several reports on the synthesis and biological evaluation of pyrimido-fused heterocycles such as pyrimido[4,5-*d*]pyridazin-8(7*H*)-ones,²² pyrano[2,3-*d*]pyrimidines, pyrido[2,3-*d*]pyrimidines,²³ and 2,4-diaminopyrido[2,3-*d*]pyrimidines²⁴ are available in the literature.

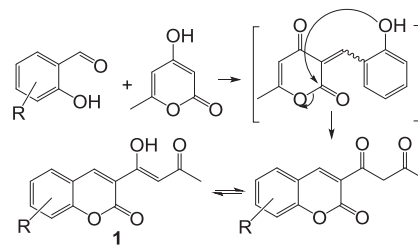
* Corresponding authors. Tel./fax: +351 234 370714; e-mail addresses: artur.silva@ua.pt (A.M.S. Silva), prhamdi@gmail.com (M. Hamdi).

In continuation of our interest on the synthesis of fused heterocycles,²⁵ herein we describe a simple and efficient strategy for the synthesis of a new series of 4-aryl-6-methyl-5-(2-oxo-2H-chromene-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones/thiones (**4a–e**, **5a–d**, **6a–d**, **7**, and **8**) under mild conditions using 3-(acetoacetyl)coumarin derivatives **1a–e** as key synthons.

2. Results and discussion

A 3-acetoacetyl coumarin derivatives **1a–e** have recently been synthesized in our laboratory from substituted salicylaldehydes and 4-hydroxy-6-methyl-2H-pyran-2-one (triacetic acid lactone=TAL) through a tandem microwave-assisted Knoevenagel condensation and intramolecular trans-lactonization process in an organobasic medium (Scheme 1).²⁶

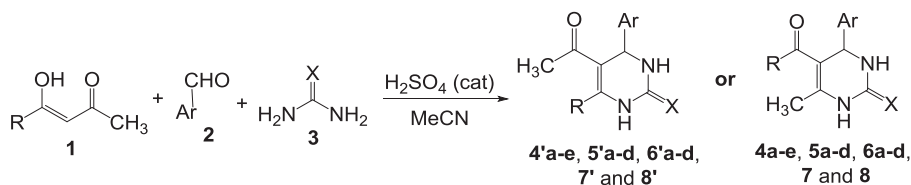
benzaldehydes **2** and urea/thiourea **3**, in the presence of sulfuric acid under refluxing acetonitrile (Table 1).



Scheme 1. Synthesis of 3-(acetoacetyl)coumarins **1**.

Table 1

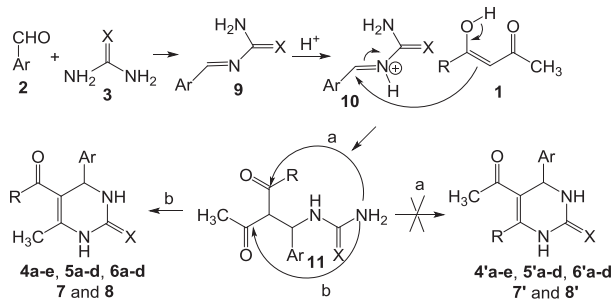
Synthesis of 4-aryl-6-methyl-5-(2-oxo-2H-chromene-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones/thiones **4a–e**, **5a–d**, **6a–d**, **7**, and **8**



Entry	Product	R	Ar	X	Yield (%)	Mp (°C)
1	4a		C ₆ H ₅	O	72	130–133
2	4b		4-NO ₂ C ₆ H ₅	O	50	260
3	4c		4-ClC ₆ H ₅	O	42	134
4	4d		C ₆ H ₅	S	56	140–145
5	4e		4-ClC ₆ H ₅	S	52	180–185
6	5a		C ₆ H ₅	O	82	240
7	5b		4-NO ₂ C ₆ H ₅	O	42	235
8	5c		4-ClC ₆ H ₅	O	50	135
9	5d		C ₆ H ₅	S	60	168–170
10	6a		C ₆ H ₅	O	83	206
11	6b		4-NO ₂ C ₆ H ₅	O	70	225
12	6c		4-ClC ₆ H ₅	O	42	180–186
13	6d		C ₆ H ₅	S	70	160
14	7		C ₆ H ₅	O	94	225
15	8		C ₆ H ₅	O	65	203

These compounds are key building blocks, as they contain a coumarin nucleus as well as the active methylene group of the acetoacetyl moiety, which is prone to undergo further useful chemical transformations. Following our studies on the establishment of new synthetic routes to biologically active heterocyclic compounds, we developed an efficient one-pot synthesis of 4-aryl-6-methyl-5-(2-oxo-2H-chromene-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones/thiones (**4a–e**, **5a–d**, **6a–d**, **7**, and **8**). After several experiments, we found that these new compounds could be obtained via a one-pot multicomponent reaction of the 1,3-dicarbonyl branch of 3-(acetoacetyl)coumarins/3-(acetoacetyl)benzof[*f*]coumarins **1a–e**, *para*-substituted

The mechanism of the Biginelli reaction together with the structure of the used synthons suggested the possible formation of two dihydropyrimidinones/thiones-type compounds **4a–e**, **5a–d**, **6a–d**, **7**, **8** or **4'a–e**, **5'a–d**, **6'a–d**, **7'**, **8'** (Scheme 2, Table 1). This process starts with the formation of an imine **9**, by condensation of the benzaldehyde **2** with urea/thiourea **3**, which then reacts with the 1,3-dicarbonyl **1** after protonation of the imines' nitrogen **10**. In the last step of the mechanism there are two possible cyclization sites, which can lead after dehydration to DHPM(T)s **4a–e**, **5a–d**, **6a–d**, **7**, **8** or **4'a–e**, **5'a–d**, **6'a–d**, **7'**, **8'**. However, the cyclization occurred only at the most electrophilic carbonyl carbon of the intermediate **11** (Scheme 2).



Scheme 2. Mechanism proposal for the formation of 4-aryl-6-methyl-5-(2-oxo-2H-chromene-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones/thiones **4a–e**, **5a–d**, **6a–d**, **7**, and **8**.

The structures and purities of the obtained products were deduced from their elemental analysis, NMR (extensive 2D NMR analyses for **5b**: HSQC, HMBC, and NOESY), and mass spectrometry data. As a representative example, the ^1H NMR spectrum of **5b** exhibited a singlet at δ_{H} 2.05 ppm and a doublet at δ_{H} 5.38 ppm, assigned, respectively, to proton resonances of the methyl group and H-6. It presents other five singlets attributed to the H-4' (δ_{H} 8.01 ppm), H-8' (δ_{H} 6.75 ppm), NH (δ_{H} 8.11 and 9.58 ppm), and OH-7' (δ_{H} 10.92 ppm) protons. The remaining aromatic and benzopyranone protons appeared as doublets at δ_{H} 6.80, 7.52, 7.59, and 8.17 ppm.

The NOESY experiment of **5b** did not allowed us to conclude, which one of the isomers were obtained, since NOE effects were observed between H-2'',6'' and H-6, NH-1, NH-3, and CH₃ (Fig. 1), which can be due to the asymmetric center at C-6. There are also NOE effects [(i) H-4' with H-5' and CH₃; (ii) H-5' with H-6, CH₃ and 3-NH, and (iii) CH₃ with 3-NH (Fig. 1)], but not relevant to the necessary unequivocal proof.

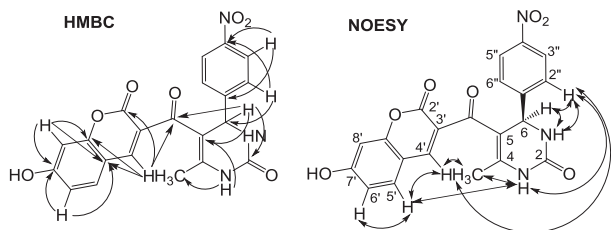


Fig. 1. Main HMBC and NOESY correlations of 5-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromene-3-carbonyl)-6-methyl-4-(4-nitrophenyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one **5b**.

The HMBC connectivities of **5b** were the key to proof the structure of the isomer obtained; namely that between H-4' and the ketone carbonyl carbon, which is also correlated with H-6 (Fig. 1). These correlations are only compatible with the structure **5b** and not **5'b**. The HMBC connectivities of **5b** allowed to unequivocally assign all of their carbon resonances (Fig. 1).

All the data described for **5b** are similar to the other derivatives that allowed us to conclude that we have only obtained 4-aryl-6-methyl-5-(2-oxo-2H-chromene-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones/thiones **4a–e**, **5a–d**, **6a–d**, **7**, and **8** and not the corresponding isomers or **4'a–e**, **5'a–d**, **6'a–d**, **7'**, and **8'** (Scheme 1, Table 1).

3. Conclusion

In conclusion, we have shown that the three-component reaction of 3-(acetoacetyl)coumarin derivatives, *para*-substituted benzaldehydes, and urea/thiourea, catalyzed by sulfuric acid provides a simple one-pot entry for the synthesis in very good yield of a series of new 4-aryl-6-methyl-5-(2-oxo-2H-chromene-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones/thiones **4a–e**, **5a–d**,

6a–d, **7**, and **8**. The mechanism of the Biginelli reaction together with the structure of the used synthons suggested the possible formation of two dihydropyrimidinones/thiones-type compounds. However, with the elucidation of the obtained products, we have proved that the cyclization occurred at the most electrophilic carbonyl carbon.

4. Experimental section

4.1. General

Melting points were determined on a Stuart scientific SPM3 apparatus fitted with a microscope and are uncorrected. ^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) spectrometer. Chemical shifts are reported in parts per million (δ , ppm) using TMS as internal reference and coupling constants (*J*) are given in hertz (Hz). ^{13}C assignments were made using NOESY, HSQC, and HMBC (delays for one bond and long-range *J*_{C/H} couplings were optimized for 145 and 7 Hz, respectively) experiments. Mass spectra are obtained with ESI⁺. Positive-ion ESI mass spectra were acquired using a Q-TOF 2 instrument [diluting 1 μL of the sample chloroform solution ($\sim 10^{-5}$ M) in 200 μL of 0.1% trifluoroacetic acid/methanol solution. Nitrogen was used as nebulizer gas and argon as collision gas. The needle voltage was set at 3000 V, with the ion source at 80 °C and desolvation temperature at 150 °C. Cone voltage was 35 V].

4.2. Synthesis of 5-acetyl-6-methyl-4-(aryloyl)-3,4-dihydropyrimidin-ones/thiones **4**, **5**, **6**, **7**, and **8**

A mixture of the appropriate 3-acetoacetyl coumarins **1** (1 mmol), benzaldehydes **2** (1 mmol), urea/thiourea **3** (1.5 mmol), and sulfuric acid (20 drops) in 10 mL of acetonitrile was stirred and refluxed for the appropriate amount of time (12–18 h). After completion of the reaction as indicated by thin layer chromatography (TLC), using a 1:4 mixture of CHCl₃/methanol as eluant, the mixture was cooled to room temperature, then ice and water was added to afford the pure product. The solid was separated by filtration and washed with cold water, dried, washed with diethyl ether, and recrystallized from ethanol or ethyl acetate.

4.2.1. 6-Methyl-5-(2-oxo-2H-chromene-3-carbonyl)-4-phenyl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (4a). Orange solid, mp: 130–133 °C; 260 mg (72%). ^1H NMR (DMSO-*d*₆, 300.13 MHz): δ 2.09 (s, 3H, CH₃), 5.26 (d, 1H, *J* 3.4 Hz, H-6), 7.22–7.51 (m, 5H, H-2'',3'',4'',5'',6''), 7.58–7.94 (m, 4H, H-5',6',7',8'), 7.97 (s, 1H, H-4'), 8.01 (d, 1H, *J* 3.4 Hz, NH-1), 9.54 (s, 1H, NH-3); ^{13}C NMR (DMSO-*d*₆, 75.47 MHz): δ 18.6 (CH₃), 53.8 (C-6), 109.4, 116.1, 118.3, 119.8, 124.9, 125.1, 126.3, 127.3, 128.4, 134.5, 143.8, 146.1, 151.7, 153.3, 157.8, 173.0, 187.0 (C=O, ketone); MS (ESI⁺): *m/z* 383 (100) [M+Na]⁺, 361 (85) [M+H]⁺. Anal. Calcd for C₂₁H₁₆N₂O₄: C 69.99, H 4.48, N 7.77. Found: C 69.79, H 4.54, N 7.65%.

4.2.2. 6-Methyl-4-(4-nitrophenyl)-5-(2-oxo-2H-chromene-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (4b). Yellow solid, mp: 260 °C; 210 mg (52%). ^1H NMR (DMSO-*d*₆, 300.13 MHz): δ 2.08 (s, 3H, CH₃), 5.42 (d, *J* 3.4 Hz, 1H, H-6), 7.36 (t, 1H, *J* 8.9 Hz, H-6'), 7.43 (d, 1H, *J* 8.9 Hz, H-8'), 7.54 (d, 1H, *J* 8.9 Hz, H-5'), 7.68 (t, 1H, *J* 8.9 Hz, H-7'), 7.77 (d, 2H, *J* 8.6 Hz, H-2'',6''), 8.10 (d, 1H, *J* 3.4 Hz, NH-1), 8.16 (s, 1H, H-4'), 8.22 (d, 2H, *J* 8.6 Hz, H-3'',5''), 9.69 (s, 1H, NH-3); ^{13}C NMR (DMSO-*d*₆, 75.47 MHz): δ 18.7 (CH₃), 53.9 (C-6), 109.2, 116.1, 118.1, 123.4, 124.8, 127.6, 128.0, 129.6, 133.1, 144.9, 145.6, 146.7, 150.9, 153.4, 157.5, 173.1, 187.5 (C=O, ketone); MS (ESI⁺): *m/z* 428 (100)

[M+Na]⁺, 406 (23) [M+H]⁺. Anal. Calcd for C₂₁H₁₅N₃O₆: C 62.22, H 3.73, N 10.37. Found: C 62.42, H 3.67, N 10.25%.

4.2.3. 4-(4-Chlorophenyl)-6-methyl-5-(2-oxo-2H-chromene-3-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (**4c**). Yellow solid, mp: 134 °C (recrystallized from ethanol); 170 mg (43%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300.13 MHz): δ 2.08 (s, 3H, CH₃), 5.27 (d, 1H, J 3.3 Hz, H-6), 7.26 (d, 2H, J 8.7 Hz, H-3''',5''), 7.38 (d, 1H, J 8.9 Hz, H-8'), 7.40 (t, 1H, J 8.9 Hz, H-6'), 7.68 (t, 1H, J 8.9 Hz, H-7'), 7.75 (d, 1H, J 8.7, H-2'',6''), 7.96 (d, 1H, J 8.9 Hz, H-5'), 8.06 (s, 1H, H-4'), 8.84 (d, 1H, J 3.3 Hz, NH-1), 9.59 (s, 1H, NH-3); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.47 MHz): δ 18.6 (CH₃), 53.2 (C-6), 101.0, 109.2, 116.3, 118.3, 124.9, 128.3, 128.6, 129.0, 134.5, 142.4, 142.9, 146.1, 151.6, 153.5, 157.8, 173.0, 186.9 (C=O, ketone); MS (ESI⁺): *m/z* 417 (100) [M+Na, ³⁵Cl]⁺, 419 (38) [(M+Na)⁺, ³⁷Cl], 395 (35) [(M+H)⁺, ³⁵Cl], 397(10) [(M+H)⁺, ³⁷Cl]. Anal. Calcd for C₂₁H₁₅ClN₂O₄: C 63.89, H 3.83, Cl 8.98, N 7.10. Found: C 63.79, H 3.63, Cl 8.78, N 7.22%.

4.2.4. 6-Methyl-5-(2-oxo-2H-chromene-3-carbonyl)-4-phenyl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-thione (**4d**). Brick-red solid, mp: 140–145 °C (recrystallized from ethyl acetate); 210 mg (56%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300.13 MHz): δ 2.09 (s, 3H, CH₃), 5.26 (d, 1H, J 3.5 Hz, H-6), 6.75–7.17 (m, 5H, H-2'',3'',4'',5'',6''), 7.21–7.83 (m, 4H, H-5',6',7',8'), 8.35 (s, 1H, H-4'), 8.62 (d, 1H, J 3.5 Hz, NH-1), 10.02 (s, 1H, NH-3); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.47 MHz): δ 18.6 (CH₃), 51.9 (C-6), 101.8, 110.9, 114.6, 126.2, 127.3, 129.2, 129.5, 140.9, 141.0, 147.0, 148.0, 150.5, 157.4, 164.8, 168.3, 174.0, 191.3 (C=O, ketone); MS (ESI⁺): *m/z* 416 (100) [M+K]⁺, 377 (25) [M+H]⁺. Anal. Calcd for C₂₁H₁₆N₂O₃S: C 67.00, H 4.28, N 7.44, S 8.52. Found: C 67.20, H 4.18, N 7.34, S 8.72%.

4.2.5. 4-(4-Chlorophenyl)-6-methyl-5-(2-oxo-2H-chromene-3-carbonyl)-4-phenyl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-thione (**4e**). Yellow-orange solid, mp: 180–185 °C (recrystallized from ethyl acetate); 210 mg (51%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300.13 MHz): δ 2.10 (s, 3H, CH₃), 5.35 (d, 1H, J 3.5 Hz, H-6), 7.25 (d, 2H, J 8.5 Hz, H-3''',5''), 7.42 (d, 1H, J 8.9 Hz, H-8'), 7.48 (d, 1H, J 8.5 Hz, H-2'',6''), 7.72 (t, 1H, J 8.9 Hz, H-6'), 7.87 (d, 1H, J 8.9 Hz, H-5'), 7.95 (t, 1H, J 8.9 Hz, H-7'), 8.40 (s, 1H, H-4'), 8.67 (d, 1H, J 3.5 Hz, NH-1), 8.84 (s, 1H, NH-3); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.47 MHz): δ 18.3 (CH₃), 54.2 (C-6), 105.7, 116.3, 118.5, 120.7, 122.9, 127.8, 129.8, 132.9, 133.9, 136.4; 139.1, 144.5, 150.8, 158.6, 164.4, 174.5, 188.1 (C=O, ketone); MS (ESI⁺): *m/z* 434 (50) [(M+Na)⁺, ³⁵Cl], 436 (25) [(M+Na)⁺, ³⁷Cl], 451 (75) [(M+K)⁺, ³⁵Cl], 453 (45) [(M+K)⁺, ³⁷Cl]. Anal. Calcd for C₂₁H₁₅ClN₂O₃: C 61.39, H 3.68, Cl 8.63, N 6.82, S 7.80. Found: C 61.59, H 3.80, Cl 8.83, N 6.65, S 7.65%.

4.2.6. 5-(7-Hydroxy-2-oxo-2H-chromene-3-carbonyl)-6-methyl-4-phenyl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (**5a**). Yellow solid, mp 240 °C; 310 mg (82%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300.13 MHz): δ 2.04 (s, 3H, CH₃), 5.21 (d, 1H, J 3.3 Hz, H-6), 6.74 (s, 1H, H-8'), 6.79 (d, 1H, J 8.6 Hz, H-6'), 7.21–7.30 (m, H-2'',3'',4'',5'',6''), 7.55 (d, 1H, J 8.6 Hz, H-5'), 7.90 (s, 1H, H-4'), 7.92 (d, 1H, J 3.3 Hz, NH-1), 9.39 (s, 1H, NH-3), 11.06 (s, OH-7'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.47 MHz): δ 18.4 (CH₃), 53.9 (C-6), 101.8, 110.8, 111.4, 113.8, 124.9, 128.4, 128.7, 134.6, 144.3, 146.8, 151.9, 152.4, 156.1, 158.3, 162.7, 187.8 (C=O, ketone); MS (ESI⁺): *m/z* 399 (100) [M+Na]⁺, 377 (60) [M+H]⁺. Anal. Calcd for C₂₁H₁₆N₂O₅: C 67.02, H 4.28, N 7.44. Found: C, 67.22, H 4.40, N 7.385.

4.2.7. 5-(7-Hydroxy-2-oxo-2H-chromene-3-carbonyl)-6-methyl-4-(4-nitrophenyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (**5b**). Yellow solid, mp: 235 °C; 180 mg (43%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300.13 MHz): δ 2.05 (s, 3H, CH₃), 5.38 (d, 1H, J 3.3 Hz, H-6), 6.75 (s, 1H, H-8'), 6.80 (d, 1H, J 8.5, H-6'), 7.52 (d, 2H, J 8.6 Hz, H-2'',6''), 7.59 (d, 2H, J 8.6 Hz, H-5'), 8.02 (s, 1H, H-4'), 8.11 (d, 1H, J 3.3 Hz, NH-1), 8.17 (d, 1H, J 8.7 Hz, H-3''',5''), 9.58 (s, 1H, NH-3), 10.92 (OH-7'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.47 MHz): δ 18.5 (CH₃), 53.7 (C-6), 102.0 (C-8'), 109.0 (C-5), 110.8

(C-4'a), 113.8 (C-6'), 123.7 (C-3''',5''), 124.4 (C-3'), 127.7 (C-2'',6''), 131.1 (C-5'), 144.0 (C-4'), 146.7 (C-4''), 150.2 (C-2), 151.4 and 151.6 (C-4 and C-1''), 155.9 (C-8'a), 158.2 (C-2'), 162.7 (C-7), 187.6 (C=O, ketone); MS (ESI⁺): *m/z* 444 (100) [M+Na]⁺; 422 (60) [M+H]⁺. Anal. Calcd for C₂₁H₁₅N₃O₇: C 59.86, H 3.59, N 9.97. Found: C 59.68, H 3.70, N 9.75%.

4.2.8. 4-(4-Chlorophenyl)-5-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromene-3-carbonyl)-6-methyl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (**5c**). Yellow solid, mp: 135 °C (recrystallized from ethanol); 210 mg (51%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300.13 MHz): δ 2.05 (s, 3H, CH₃), 5.25 (d, 1H, J 3.3 Hz, H-6), 6.74 (s, 1H, H-8'), 6.86 (d, 1H, J 8.6 Hz, H-6'), 7.24 (d, 2H, J 8.3 Hz, H-3''',5''), 7.35 (d, 2H, J 8.3, H-2'',6''), 7.76 (d, 1H, J 8.7 Hz, H-5'), 8.09 (s, 1H, H-4'), 8.73 (d, 1H, J 3.3 Hz, NH-1), 9.47 (s, 1H, NH-3), 10.90 (OH-7'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.47 MHz): δ 18.5 (CH₃), 53.5 (C-6), 102.0, 109.5, 110.8, 113.7, 121.2, 124.4, 128.3, 131.8, 143.9, 146.6, 149.6, 151.7, 155.9, 158.2, 162.8, 187.6 (C=O, ketone); MS (ESI⁺): *m/z* 433 (100) [(M+Na)⁺, ³⁵Cl], 435 (38) [(M+Na)⁺, ³⁷Cl], 412 (40) [(M+H)⁺, ³⁵Cl], 414 (15) [(M+H)⁺, ³⁷Cl]. Anal. Calcd for C₂₁H₁₅ClN₂O₅: C 61.40, H 3.68, Cl 8.63, N 6.82. Found: C 61.62, H 3.88, Cl 8.80, N 6.58%.

4.2.9. 5-(7-Hydroxy-2-oxo-2H-chromene-3-carbonyl)-6-methyl-4-phenyl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-thione (**5d**). Orange solid, mp: 168–170 °C (recrystallized from ethyl acetate); 240 mg (61%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300.13 MHz): δ 2.08 (s, 3H, CH₃), 5.21 (d, 1H, J 3.5 Hz, H-6), 6.76 (s, 1H, H-8'), 6.84 (d, 1H, J 8.6 Hz, H-6'), 7.19–7.32 (m, H-2'',3'',4'',5'',6''), 7.78 (d, 1H, J 8.6 Hz, H-5'), 8.06 (s, 1H, H-4'), 8.68 (d, 1H, J 3.5 Hz, NH-1), 8.74 (s, 1H, NH-3), 11.16 (s, OH-7'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.47 MHz): δ 18.4 (CH₃), 54.2 (C-6), 101.7, 110.9, 113.8, 114.4, 126.3, 128.4, 132.2, 132.9, 142.8, 146.5, 148.4, 157.7, 157.9, 164.5, 174.7, 191.3 (C=O, ketone); MS (ESI⁺): *m/z* 415 (10) [M+Na]⁺, 393 (100) [M+H]⁺. Anal. Calcd for C₂₁H₁₆N₂O₅S: C 64.27, H 4.11, N 7.14, S 8.17. Found: C 64.49, H 4.33, N 7.34, S 8.20%.

4.2.10. 6-Methyl-5-(3-oxo-3H-benzof[f]chromene-2-carbonyl)-4-phenyl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (**6a**). Light green solid, mp: 206 °C (recrystallized from ethyl acetate); 340 mg (83%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300.13 MHz): δ 2.11 (s, 3H, CH₃), 5.38 (d, 1H, J 3.5 Hz, H-6), 6.99–7.44 (m, 5H, H-2'',3'',4'',5'',6''), 7.60 (d, 1H, J 8.8 Hz, H-8'), 7.65 (t, 1H, J 8.8 Hz, H-7'), 7.72 (d, 1H, J 8.8 Hz, H-5'), 8.02 (t, 1H, J 8.8 Hz, H-6'), 8.14 (d, 1H, J 8.7 Hz, H-9'), 8.50 (d, 1H, J 8.7 Hz, H-10'), 8.94 (s, 1H, H-4'), 9.37 (d, 1H, J 3.5 Hz, NH-1), 9.62 (s, 1H, NH-3); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.47 MHz): δ 18.4 (CH₃), 53.6 (C-6), 110.6, 112.6, 116.1, 119.5, 126.3, 127.3, 128.4, 128.9, 129.0, 129.7, 134.2, 134.8, 137.6, 138.9, 143.8, 148.5, 152.2, 153.6, 157.8, 170.2, 187.3 (C=O, ketone); HRMS (ESI⁺): *m/z* 450 (100) [M+K]⁺, 411 (50) [M+H]⁺. Anal. Calcd for C₂₅H₁₈N₂O₄: C 73.16, H 4.42, N 6.83. Found: C 73.26, H 4.64, N 6.62%.

4.2.11. 6-Methyl-4-(4-nitrophenyl)-5-(3-oxo-3H-benzof[f]chromene-2-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (**6b**). Yellow solid, mp: 225 °C (recrystallized from ethanol); 320 mg (70%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300.13 MHz): δ 2.13 (s, 3H, CH₃), 5.47 (d, 1H, J 3.3 Hz, H-6), 7.58 (d, 1H, J 8.7 Hz, H-9'), 7.61 (t, 1H, J 8.7 Hz, H-7'), 7.64 (d, 1H, J 8.1 Hz, H-2'',6''), 7.74 (t, 1H, J 8.7 Hz, H-6'), 8.06 (d, 1H, J 8.7 Hz, H-5'), 8.19 (d, 1H, J 7.8 Hz, H-9'), 8.27 (d, 1H, J 7.8 Hz, H-10'), 8.51 (d, 1H, J 8.1 Hz, H-3''',5''), 8.86 (s, 1H, H-4'), 9.32 (d, 1H, J 3.3 Hz, NH-1), 9.71 (s, 1H, NH-3); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.47 MHz): δ 18.5 (CH₃), 53.5 (C-6), 108.8, 112.7, 116.4, 122.2, 122.6, 123.7, 126.3, 127.8, 128.6, 128.9, 129.9, 134.4, 138.5, 146.7, 151.3, 151.5, 151.8, 153.7, 157.9, 173.8, 187.1 (C=O, ketone); MS (ESI⁺): *m/z* 478 (100) [M+Na]⁺, 456 (35) [M+H]⁺. Anal. Calcd for C₂₅H₁₇N₃O₆: C 65.93, H 3.76, N 9.23. Found: C 65.84, H 3.88, N 9.29%.

4.2.12. 4-(4-Chlorophenyl)-6-methyl-5-(3-oxo-3H-benzof[f]chromene-2-carbonyl)-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (**6c**). Yellow

solid, mp: 180–186 °C (recrystallized from ethanol); 190 mg (43%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300.13 MHz): δ 2.13 (s, 3H, CH₃), 5.31 (d, 1H, *J* 3.2 Hz, H-6), 7.29 (d, 1H, *J* 8.6 Hz, H-3''',5''), 7.31 (d, 1H, *J* 8.6 Hz, H-8'), 7.34 (t, 1H, *J* 8.6 Hz, H-7'), 7.66 (t, 1H, *J* 8.6 Hz, H-6'), 8.25 (d, 1H, *J* 8.6 Hz, H-2'',6''), 8.34 (d, 1H, *J* 8.6 Hz, H-5'), 8.47 (d, 1H, *J* 7.9 Hz, H-9'), 8.56 (d, 1H, *J* 7.9 Hz, H-10'), 8.78 (s, 1H, H-4'), 9.35 (d, 1H, *J* 3.2 Hz, NH-1), 9.60 (s, 1H, NH-3); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.47 MHz): δ 18.7 (CH₃), 53.3 (C-6), 109.2, 112.6, 116.4, 122.2, 123.5, 124.6, 126.4, 126.9, 128.4, 129.0, 130.0, 134.8, 138.2, 143.0, 151.4, 151.6, 153.6, 154.6, 158.0, 173.8, 187.2 (C=O, ketone); MS (ESI⁺): *m/z* 467 (100) [(M+Na)⁺, ³⁵Cl], 469 (38) [(M+Na)⁺, ³⁷Cl], 445 (40) [(M+H)⁺, ³⁵Cl], 447 (15) [(M+H)⁺, ³⁷Cl]. Anal. Calcd for C₂₅H₁₇ClN₂O₄: C 67.50, H 3.85, Cl 7.97, N 6.30. Found: C 67.65, H 3.73, Cl 7.77, N 6.42%.

4.2.13. 4-(4-Chlorophenyl)-6-methyl-5-(3-oxo-3H-benzof[chromene-2-carbonyl]-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-thione (6d). Orange solid, mp: 160 °C (recrystallized from ethyl acetate); 320 mg (70%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 2.12 (s, 3H, CH₃), 5.32 (d, 1H, *J* 3.5 Hz, H-6), 7.27 (d, 1H, *J* 8.8 Hz, H-8'), 7.41 (d, 1H, *J* 8.6 Hz, H-3''',5''), 7.47 (t, 1H, *J* 8.8 Hz, H-7'), 7.60 (t, 1H, *J* 8.8 Hz, H-6'), 7.79 (d, 1H, *J* 8.8 Hz, H-5'), 8.27 (d, 1H, *J* 7.8 Hz, H-2'',6''), 8.55 (d, 1H, *J* 8.7 Hz, H-9'), 8.88 (d, 1H, *J* 8.7 Hz, H-10'), 9.40 (s, 1H, H-4'), 10.00 (d, 1H, *J* 3.5 Hz, NH-1), 10.64 (s, 1H, NH-3); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.47 MHz): δ 18.4 (CH₃), 53.3 (C-6), 110.0, 112.4, 116.3, 118.4, 121.5, 126.6, 127.8, 128.1, 128.5, 129.0, 129.4, 129.8, 131.6, 136.9, 141.1, 143.1, 154.5, 157.3, 168.6, 173.7, 191.4 (C=O, ketone); MS (ESI⁺): *m/z* 483 (100) [(M+Na)⁺, ³⁵Cl], 485 (38) [(M+Na)⁺, ³⁷Cl], 500 (75) [(M+K)⁺, ³⁵Cl], 502 (10) [(M+K)⁺, ³⁷Cl], 461 (10) [(M+H)⁺, ³⁵Cl], 463 (5) [(M+H)⁺, ³⁷Cl]. Anal. Calcd for C₂₅H₁₇ClN₂O₃S: C 65.14, H 3.72, Cl 7.69, N 6.08, S 6.96. Found: C 65.36, H 3.67, Cl 7.73, N 6.12; S 6.78%.

4.2.14. 5-(6-Hydroxy-2-oxo-2H-chromene-3-carbonyl)-6-methyl-4-phenyl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (7). Yellow solid, mp: 225 °C; 350 mg (93%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 2.08 (s, 3H, CH₃), 5.29 (d, 1H, *J* 3.4 Hz, H-6), 7.14–7.35 (m, 8H, H-2'',3'',4'',5'',6'', H-5' and H-7',8'), 8.10 (s, 1H, H-4'), 9.90 (d, 1H, *J* 3.4 Hz, NH-1), 9.58 (s, 1H, NH-3), 10.20 (s, OH-6'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 18.4 (CH₃), 53.5 (C-6), 110.7, 119.1, 126.2, 127.3, 128.3, 129.2, 134.9, 137.3, 142.1, 143.3, 144.3, 147.9, 152.1, 157.7, 161.1, 187.3 (C=O, ketone); MS (ESI⁺): *m/z* 399 (32) [(M+Na)⁺], 377 (60) [(M+H)⁺]. Anal. Calcd for C₂₁H₁₆N₂O₅: C 67.02, H 4.28, N 7.44. Found: C 67.22, H 4.32, N 7.56%.

4.2.15. 5-(8-Hydroxy-2-oxo-2H-chromene-3-carbonyl)-6-methyl-4-phenyl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one (8). Yellow solid, mp: 203 °C; 250 mg (66%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ 2.08 (s, 3H, CH₃), 5.24 (d, 1H, *J* 3.3 Hz, H-6), 7.00–7.35 (m, 8H, 2'',3'',4'',5'',6'', and H-6',7',8'), 8.73 (s, 1H, H-4'), 9.58 (d, 1H, *J* 3.3 Hz, NH-1), 9.80 (s,

1H, NH-3), 9.96 (OH-8'); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 18.5 (CH₃), 53.5 (C-6), 110.8, 113.7, 116.9, 126.3, 126.9, 128.6, 134.9, 137.4, 143.8, 146.9, 147.9, 152.2, 154.1, 157.6, 159.1, 187.3 (C=O, ketone); MS (ESI⁺): *m/z* 399 (55) [(M+Na)⁺], 377 (10) [(M+H)⁺]. Anal. Calcd for C₂₁H₁₆N₂O₅: C 67.02, H 4.28, N 7.44. Found: C 67.23, H 4.30, N 7.55%.

Acknowledgements

Thanks are due to the University of Aveiro, Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal), EU, QREN, FEDER, COM-PETE, for funding the Organic Chemistry Research Unit (project PEst-C/UII0062/2013), and the Portuguese National NMR Network (RNRMN).

References and notes

- Santelli-Rouvier, C.; Pradines, B.; Berthelot, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, *39*, 735–744.
- Bhattacharjee, A. K.; Hartell, M. G.; Nichols, D. A. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, *39*, 59–67.
- Verhaeghe, P.; Azas, N.; Hutter, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *17*, 396–401.
- Hossain, A. S.; Abu-Melha, H. M.; Al-Omar, M. A. *Molecules* **2012**, *17*, 13642–13655.
- Ashok, M.; Holla, B. S.; Kumari, N. S. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 380–385.
- Hamy, F.; Brondani, V.; Flörsheimer, A. *Biochemistry* **1998**, *37*, 5086–5095.
- Galabov, A. S.; Velichkova, E.; Karparov, A. *Arzneim.-Forsch.* **1984**, *34*, 9–14.
- Karkola, S.; Lilienkamp, A.; Wähälä, K. *Chem. Med. Chem.* **2008**, *3*, 461–472.
- Lee, E. S.; Park, J. G.; Jahng, Y. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1883–1886.
- Romeo, G.; Russo, F.; Caruso, A. *Arzneim.-Forsch.* **1998**, *48*, 167–172.
- (a) Rovnyak, G. C.; Kimball, S. D.; Beyer, B.; Cucinotta, G.; Dimarco, D. J.; Gougoutas, J.; Hedberg, A.; Malley, M.; McCarthy, J. P.; Zhang, R.; Moreland, S. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 119–129; (b) Kappe, C. O. *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, *35*, 1043–1052.
- Atwal, K. S.; Swanson, B. N.; Unger, S. E.; Floyd, D. M.; Moreland, S.; Hedberg, A.; O'Reilly, B. C. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 806–811.
- Kappe, C. O.; Fabian, W. M. F.; Semones, M. A. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 2803–2816.
- Ranu, B. C.; Hajra, A.; Jana, U. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 6270–6272.
- Atwal, K. S.; Rovnyak, G. C.; Schwartz, J.; Moreland, S.; Hedberg, A.; Gougoutas, J. Z.; Malley, M. F.; Floyd, D. F. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1510–1515.
- Aron, Z. D.; Overman, L. E. *Chem. Commun.* **2004**, 253–265.
- Byk, G.; Gettlieb, H. E.; Herscovici, J.; Mirkin, F. *J. Comb. Chem.* **2000**, *2*, 732–735.
- Haggarty, S. J.; Mayer, T. U.; Miyamoto, D. T.; Fathi, R.; King, R. W.; Mitchison, T. J.; Schreiber, S. L. *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 275–286.
- Wan, J.-P.; Liu, Y. *Synthesis* **2010**, 3943–3953.
- Biginelli, P. *Gazz. Chim. Ital.* **1893**, *23*, 360–416.
- Karami, B.; Eskandari, K.; Khodabakhshi, S.; Hoseini, S. J.; Hashemian, F. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 23335–23342.
- Rosa, F. A.; Machado, P.; Fiss, G. F.; Vargas, P. S.; Fernandes, T. S.; Bonacorso, H. G.; Zanatta, N.; Martins, M. A. P. *Synthesis* **2008**, 3639–3648.
- Devi, I.; Bhuyan, P. J. *Synlett* **2004**, 283–286.
- Hurlbert, B. S.; Ferone, R.; Herrmann, T. A.; Hitchings, G. H.; Barnett, M.; Bushby, S. R. M. *J. Med. Chem.* **1968**, *11*, 711–717.
- Talhi, O.; Makhoulfi-Chebli, M.; Pinto, D. C. G. A.; Hamdi, M.; Silva, A. M. S. *Synlett* **2013**, 2559–2562.
- Makhoulfi-Chebli, M.; Hamdi, M.; Silva, A. M. S.; Balegrone, F. *J. Soc. Alger. Chim.* **2008**, *18*, 91–101.



Study of novel fluorescent coumarin-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones dyads. Estimation of ground- and excited-state dipole moments from a solvatochromic shift

Amina Benazzouz^{a,b}, Malika Makhloufi-Chebli^{a,b}, Safouane M. Hamdi^c, Baya Boutemour-Kheddis^b, Artur M.S. Silva^{d,*}, Maamar Hamdi^{b,*}

^a Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou 15000, Algeria

^b Laboratoire de Chimie Organique Appliquée (Groupe Hétérocycles), Faculté de Chimie, Université des Sciences et de la Technologie, BP32, El-Alia, 16111, Bab-Ezzouar, Algiers, Algeria

^c Laboratoire de Biochimie-Purpan, Institut Fédératif de Biologie, CHU Toulouse, 3330, Avenue de Grande Bretagne, F-31039 Toulouse Cedex 9, France

^d Department of Chemistry & QOPNA, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 January 2016

Accepted 29 February 2016

Available online xxxx

Keywords:

3,4-Dihydropyrimidones

Coumarins

Photophysical properties

Solvatochromic effect

Dipole moments

Quantum yields

Polarity solvents

ABSTRACT

The photophysical properties like ground- and excited-state dipole moments, change in the dipole moment and fluorescence quantum yield of three coumarin-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones dyads **4a–c** are characterized. The study is carried out in various solvents at room temperature using absorption and steady-state fluorescence technique. The emission wavelengths of the **4a–c** are quite sensitive to the polarity of solvents. Increasing solvent polarity red or bathochromic shifts of about 10 nm have been observed. The excited- and ground-state dipole moments are estimated using solvatochromic shift method. It was observed that dipole moments of the excited state were higher than those of the ground state, indicating a substantial redistribution of the π -electron densities in a more polar excited state for **4a–c**. The changes in dipole moment ($\Delta\mu$) are calculated both from solvatochromic shift method and microscopic solvent polarity parameter. The bathochromic shift of the emission spectra and the increase in the excited-state dipole moment indicates $\pi \rightarrow \pi^*$ transitions as well as the possibility of intramolecular charge transfer (ICT) character in the emitting singlet state of **4a–c**. The relative quantum yields (Φ) are calculated using single point method. It is found that the quantum yields of the molecules vary (9 to 22%) with the change in the solvent polarity indicating the dependency of fluorescence nature on the solvent environment.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Coumarins (2H-1-benzopyran-2-ones) are lactones of *o*-hydroxycinnamic acid widely distributed in plants, but also found in fungi and bacteria [1–3]. This numerous class of compounds (around 1.300 derivatives) occurs as single nucleus or as dyads combined with sugars or acids and presents many pharmacological properties, such as anti-inflammatory [4], anti-microbial [5], antioxidant [6] and anti-tumor activities [7–9]. The intrinsic photophysical features of coumarins enable their use as biological and chemical probes [10], which have been explored in the detection of proteins [11], metals [12], DNA/RNA [13], tumour cells [14], besides being useful as pH indicators [15].

In the last years, combination chemotherapy has been a common clinical strategy adopted to treat cancer and/or to overcome drug resistance. The development of more potent anti-breast cancer agents combining tissue selective effects with novel structures or new

mechanism of action are still needed and very challenging, since molecules used to treat either primary or metastatic breast cancers are limited [8].

In the design of new drug prototypes, the concept of molecular hybridization is a useful tool and is based on the combination of pharmacophore moieties of different bioactive substances to produce a new dyad compound with improved affinity and efficacy [16]. This strategy has resulted in compounds with modified selectivity profile, different and/or dual mode of action and reduced undesired side effects. Musa et al. have reviewed the application of coumarins in the pharmacotherapy of breast cancer using this concept [17]. Recently, Sashidhara et al. [18] have disclosed a coumarin–monastrol dyad as potential anti-breast tumour-specific agent.

Cytogenetic analysis of tumour material has been greatly enhanced over the past 30 years by the application of a range of techniques based around fluorescence [19]. Optical techniques provide an accurate and rapid means to detect regions of cancer. In order to obtain optimal results from the flow cytometry analysis, especially when performing multidimensional analysis, it is vital that the appropriate combination of fluorochromes is used. To choose fluorochromes there are a number

* Corresponding authors.

E-mail addresses: artur.silva@ua.pt (A.M.S. Silva), prhamdi@gmail.com (M. Hamdi).

of different parameters to take into account. Each fluorochrome has distinct properties and is characterized by specific excitation and emission wavelengths. First, the fluorochrome must be excited by lasers available on the instrument. Second, the emission wave lengths are read by different detectors or photomultiplier tubes and the range of detection is limited by optical filters. This work represents a continuation of our systematic studies of highly fluorescent laser dyes [20,21]. The dipole moment of an excited state of a molecule provides information on their electronic and geometrical structure in the short lived state. Accordingly, the objective of this work is to study the spectroscopic properties and to estimate the ground- and excited-state dipole moments and also the change in the dipole moments of three coumarin-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones **4a–c** recently synthesized [22] (Fig. 1).

We anticipated that the presence of the 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one ring as well as the substituents of the coumarin core could lead to interesting photophysical properties and those compounds could subsequently be used as cation extraction agents or signalling agents for cation recognition, as pH indicators and fluorescent probes.

2. Experimental methods

2.1. Apparatus

All spectrophotometric measurements were conducted at ambient temperature. UV/vis absorption spectra were recorded on a JENWAY 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 data were analysed by appropriate 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 ($\Phi = 0.9$) as standard and were determined using the classical formula:

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

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. The excitation source was a long life Xenon flash lamp.

2.2. Materials

Coumarin-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one derivatives **4a–c** were synthesized as reported in the literature [22]. Their molecular structure and purity was confirmed by NMR spectroscopy and mass spectrometry. The solvents used in the present study, namely dimethylsulfoxide (DMSO), acetonitrile (ACN), dimethylformamide (DMF), acetone, ethyl acetate, THF, dichloromethane and chloroform were of HPLC and spectroscopic grade (purchased from Fluka and Labosi). The

required solutions were prepared at a fixed solute concentration ($4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$).

2.3. 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 band position. The solvent dependence of the absorption and fluorescence band maxima is used to estimate the excitation-state dipole moments of different molecules. Two methods depending on the internal electric field effect (solvatochromism) have been employed in the present investigation.

2.3.1. Method I

Solvent dependence of absorption and fluorescence band maxima is used to estimate the excited-state dipole moments of different molecules. Eqs. (1) and (2) that afford the best results in the change of dipole moments 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 the absorption and fluorescence maxima (cm^{-1}), respectively, n and ϵ are the refractive index and the dielectric constant of solvents, respectively.

The expressions for the solvent parameters $f(\epsilon, n)$ and $\Phi(\epsilon, n)$ are 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.

Table 1

Summary of solvent properties and calculated values of solvent polarity parameters $f(\epsilon, n)$ and $\Phi(\epsilon, n)$.

Solvents	μ	ϵ	n	$f(\epsilon, n)$	$\Phi(\epsilon, n)$	$E_{\text{pol}}^{\text{N}}$
CHCl ₃	1.04	4.81	1.446	0.372	0.97	0.259
CH ₂ Cl ₂	1.60	8.90	1.424	0.590	1.17	0.309
THF	1.75	7.58	1.407	0.549	0.55	0.207
Ethyl acetate	1.88	6.02	1.372	0.489	1.00	0.228
Acetone	2.88	20.70	1.359	0.790	1.28	0.355
ACN	3.92	37.50	1.344	0.863	1.33	0.460
DMF	3.82	38.00	1.430	0.839	1.42	0.386
DMSO	3.96	46.70	1.479	0.841	1.49	0.444

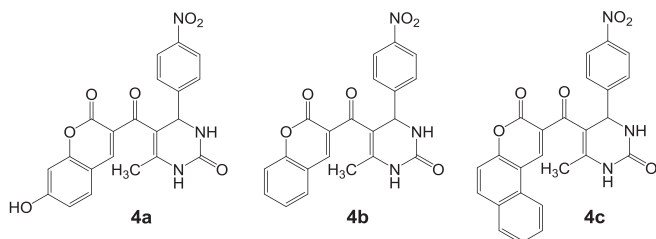


Fig. 1. Structures of the compounds studied.

Table 2
Spectroscopic and photophysical characteristics of the coumarin–DHPM derivatives **4a–c** in different solvents.

Compound	Solvent	λ_{abs} (nm)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	$\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f$ (cm ⁻¹)	$\Phi_f \times 10^2$
4a	DMSO	345	290/ 460	498	8905	9.25
	ACN	343	290	496	8993	7.69
	DMF	344	290	494	8949	9.61
	Acetone	342	290	496	9078	3.94
	Ethyl acetate	339	290	493	9214	5.30
	THF	339	290	493	9214	7.65
	CH ₂ Cl ₂	340	290	494	9169	–
4b	DMSO	292	300	506	14,484	10.06
	ACN	288	300	496	14,561	22.39
	DMF	290	300	498	14,402	21.46
	Acetone	285	300	494	14,845	5.28
	Ethyl acetate	280	300	492	15,389	10.06
	THF	279	–	–	–	–
	CH ₂ Cl ₂	286	300	496	14,804	8.91
4c	CHCl ₃	282	300	498	15,381	16.15
	DMSO	379	360	470	5109	9.64
	ACN	390	360	465	4136	9.64
	DMF	375	360	455	4689	12.33
	Acetone	378	360	462	4810	12.46
	Ethyl acetate	399	360	461	3371	8.64
	THF	401	–	–	–	–
	CH ₂ Cl ₂	400	360	465	3495	11.88
	CHCl ₃	403	360	460	3075	17.28

λ_{abs} : absorbance wavelength; λ_{ex} : excitation wavelength; λ_{em} : maximum emission wavelength; $\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f$: Stokes shift; Φ_f : fluorescence quantum yield.

From Eqs. (1) and (2) the expression for slopes S_1 and S_2 are given by:

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

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

where μ_g and μ_e are ground- and excited-state dipole moments of the solute molecule. 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 dye 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 means of Eqs. (9)–(11). Based on Eqs. (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:

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

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

Table 3
Spectroscopic and photophysical characteristics of **4a–c** in different solvents.

Compound	Solvent	$\bar{\nu}_a$ (cm ⁻¹)	$\bar{\nu}_f$ (cm ⁻¹)	$\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f$ (cm ⁻¹)	$\bar{\nu}_a + \bar{\nu}_f$ (cm ⁻¹)
4a	DMSO	28,985	20,080	8905	49,066
	ACN	29,154	20,161	8993	49,316
	DMF	29,070	20,121	8949	49,190
	Acetone	29,240	20,161	9078	49,401
	Ethyl acetate	29,498	20,284	9214	49,782
	THF	29,498	20,284	9214	49,782
	CH ₂ Cl ₂	29,412	20,243	9169	49,655
4b	DMSO	34,246	19,763	14,484	54,009
	ACN	34,722	20,161	14,561	54,883
	DMF	34,483	20,080	14,403	54,563
	Acetone	35,088	20,243	14,845	55,331
	Ethyl acetate	35,714	20,325	15,389	56,036
	CH ₂ Cl ₂	34,965	20,161	14,804	55,126
	CHCl ₃	35,461	20,080	15,381	55,541
4c	DMSO	26,385	21,276	5109	47,661
	ACN	25,641	21,505	4136	47,146
	DMF	26,667	21,978	4689	48,645
	Acetone	26,455	21,645	4810	48,100
	Ethyl acetate	25,063	21,692	3371	46,755
	CH ₂ Cl ₂	25,000	21,505	3495	46,505
	CHCl ₃	24,814	21,739	3075	46,553

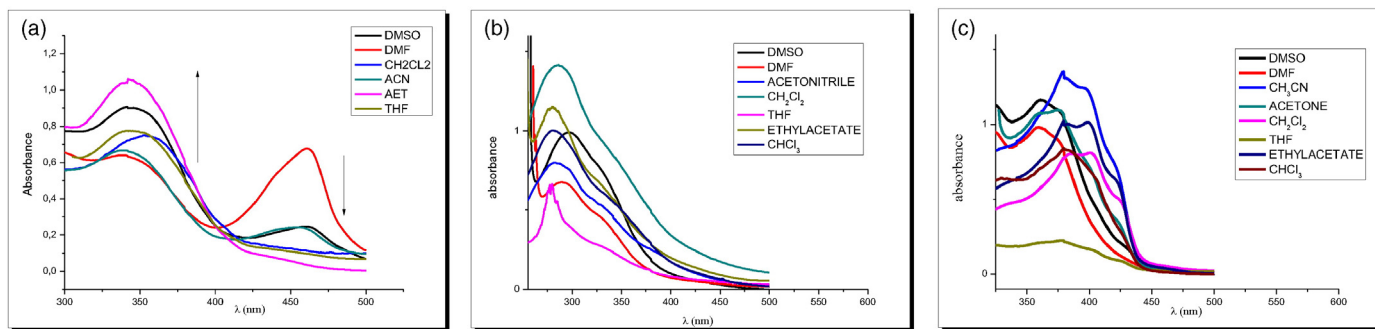


Fig. 2. (a–c): absorption spectrum of all compounds (a) **4a**, (b) **4b**, and (c) **4c** in different solvents.

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

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.

2.3.2. 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 et al. [28] according to Eq. (12):

$$(\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f) = S_3 E_T^N + cste \quad (12)$$

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

where $\Delta\mu_b = 9$ D and $a_b = 6.2$ Å are the change in dipole moment on excitation and Onsager radius of betaine dye; $\Delta\mu$ and a_0 are the corresponding quantities for the solute molecule of interest. E_T^N is defined by Eq. (14), using water ($E_T^N = 1$) and tetramethylsilane ($E_T^N = 0$) as the solvent of reference [29].

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

Finally, the change in dipole moment ($\Delta\mu$) can be determined by Eq. (15):

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

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 Eq. (12).

3. Results and discussion

3.1. Solvent effect on absorption and emission spectra

It is known that the spectral behaviour of an organic molecule is strongly related to its electronic structure in both ground and excited states, that is why the knowledge of the solvent effect on absorption and fluorescence spectra is of particular importance. Indeed, a change in solvent is accompanied by a variation of polarity, dielectric constant or polarizability of the surrounding medium. Thus, the solvent polarity functions $f(\epsilon, n)$, $\Phi(\epsilon, n)$ and E_T^N have been estimated in order to determine the ground and excited states from eight organic solvents of increasing polarity, namely DMSO, ACN, DMF, acetone, ethyl acetate, THF, dichloromethane and chloroform (Table 1).

The choice of solvents was due to the solubility of the products. The absorption and emission maxima, quantum yields, Stokes shift $\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f$ for the three molecules (**4a–c**) in different solvents are given in Table 2 and the arithmetic sum of Stokes shift $\bar{\nu}_a + \bar{\nu}_f$ are given in Table 3.

3.1.1. UV–vis absorption spectra

The UV–vis absorption spectra of all the compounds **4a–c** (concentration 4.10^{-5} mol·dm $^{-3}$) were recorded immediately after dissolution of the products and filtration through paper. The magnitudes of Stokes shift vary between 8905 and 15,381 cm $^{-1}$. The values of the Stokes shift are also indicative of the charge transfer transition (Table 2).

The absorption spectrum of **4a** exhibited different double absorption band spectra with maximum absorption at around 345–353 nm and a minor absorption red shifted at 455–461 nm which vary with the polarity of the solvent [Fig. 2(a)]. The intensity of the latter band increased in DMSO, acetonitrile, DMF and acetone and disappears in ethyl acetate, THF and dichloromethane. The minor band associated

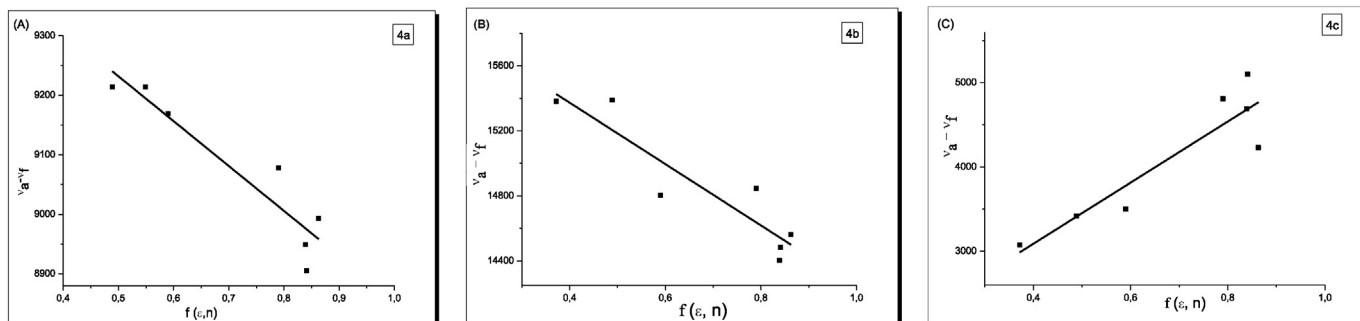


Fig. 3. Emission spectra of all compounds (a) **4a**, (b) **4b**, and (c) **4c** in different solvents.

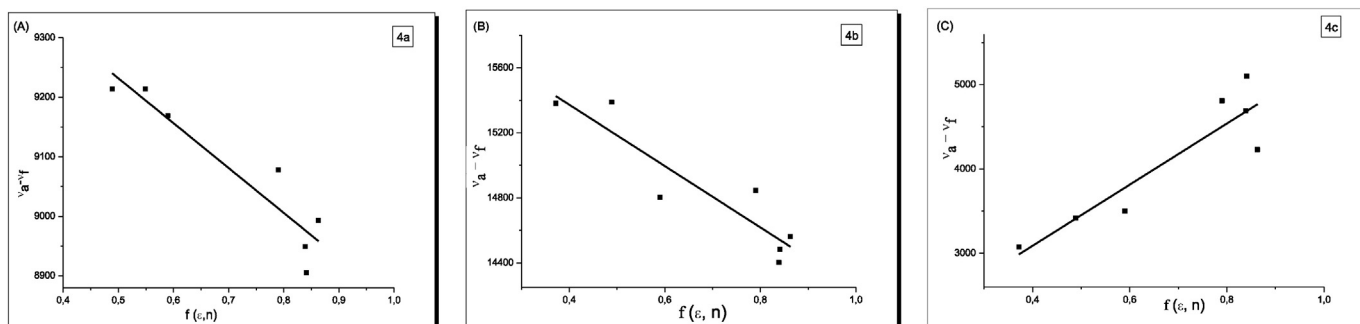


Fig. 4. The variation of Stokes shift with $f(\epsilon, n)$ by using Eq. (1) in different solvents: a) **4a**, b) **4b**, and c) **4c**.

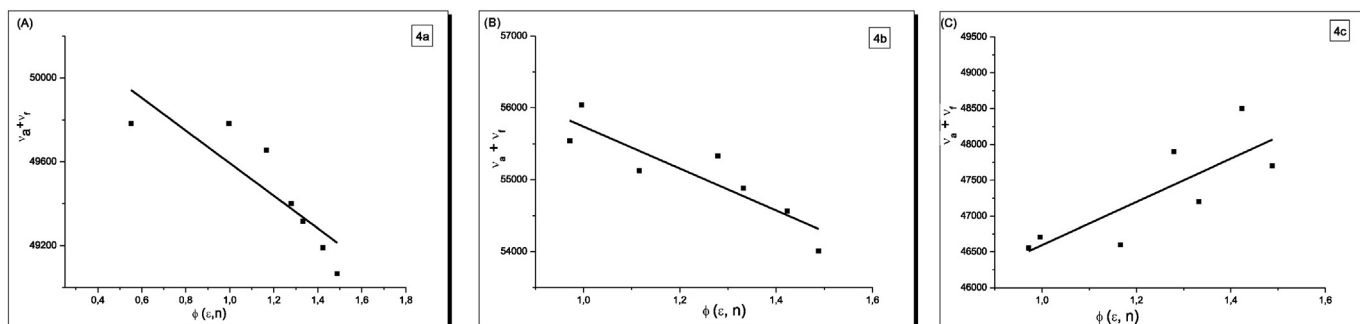


Fig. 5. The variation of arithmetic sum of Stokes shift with $\phi(\epsilon, n)$ by using Eq. (12) in different solvents: a) **4a**, b) **4b** and c) **4c**.

with the hydroxyl of aromatic group and can be attributed to charge transfer that occurs between the electron donating group (the hydroxyl group) and the electron withdrawing pole, constituted by the carbonyl group, that reinforce the electron-attracting strength on this side of these molecules (Fig. 7).

For the **4b** and **4c** only one band was observed in all the solvents around 280–292 nm and 375–403 nm, respectively.

3.1.2. Steady-state emission spectra.

For all compounds **4a–c**, the shape and position of the emission spectra were independent of the excitation wavelength, which confirms that only one species emits in each solution and shows only one peak (Fig. 3).

The emission spectra underwent a strong blue shift when the polarity of the solvent increased. The peak moving from 497 nm in DMSO to 494 nm in dichloromethane for **4a** [Fig. 3(a)] and from 505 nm in DMSO to 498 nm in chloroform for **4b** [Fig. 3(b)]. For **4c** the emission spectra showed a wavelength band from 470 nm in DMSO to 460 nm in chloroform [Fig. 3(c)]. However large variations were found in the shape of the spectra according to the solvent used. For all the compounds, the intensity of the peak increased with the polarity of the solvent. A bathochromic shift was observed for all the compounds

4a–c and associated with a rising of solvent polarity caused by a significant difference in charge distributions between the ground and excited state induced by a strong interaction with polar solvents in the excited state. Moreover, the weaker red shift of the electronic absorption spectra compared to fluorescence emission spectra indicates that compounds are less polarized by polar solvents in the ground state than in the excited state. In addition, the analysis of solvation effects shows that the different solvent's polarities have various consequences on the fluorescence spectra, whereas in UV–vis spectra, the aprotic polar nature seems to be the most important factor in absorption phenomena. Indeed, Fig. 1 shows that DMSO and DMF cause rising of absorption. Whereas in fluorescence emission (Fig. 3), DMSO exalts the absorption phenomena and DMF provokes the inverse effect. These behaviours highlight the role of hydrogen bonding and substituents in the generation of specific interactions between the solute and the solvent [29] since the Kamlet–Taft parameters of these solvents show that DMSO and DMF are strong hydrogen bond acceptors. These considerations are confirmed during observation of fluorescence emission spectra (Fig. 3).

An increase in solvent polarity associated to bathochromic shifts in absorption maxima ($\lambda_{\text{abs-max}}$) indicates that these main bands

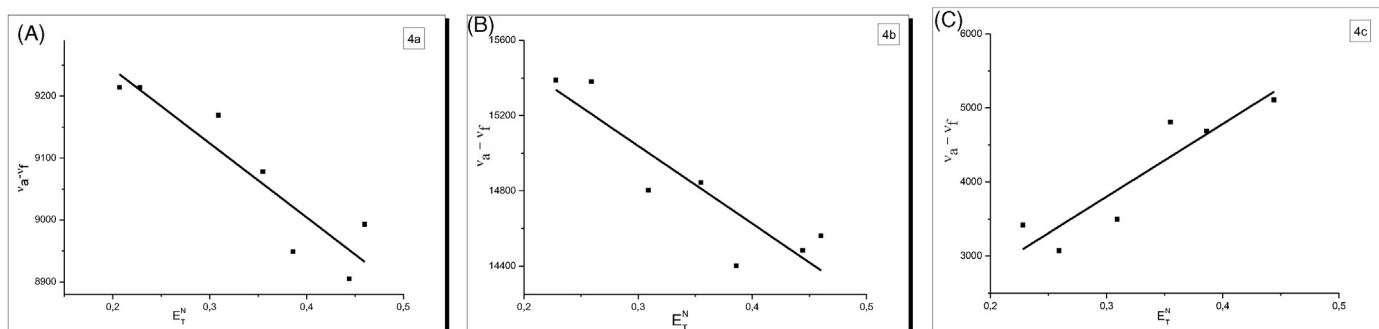


Fig. 6. Variation of Stokes shift with microscopic solvent polarity (E_T^N) using Eq. (15) in various solvents.

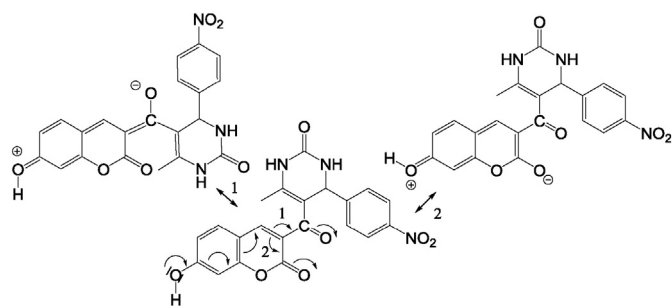


Fig. 7. Possible resonance structure of 4a.

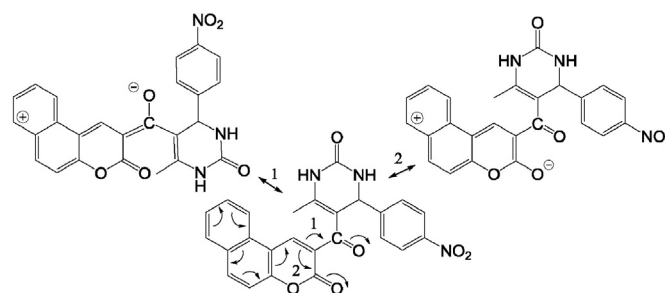


Fig. 9. Possible resonance structure of 4c.

correspond to an electronic $\pi-\pi^*$ transition of compounds. ICT (intramolecular charge transfer) processes are known to be stabilized in solvents with a greater dielectric constant leading to a red shift of both absorbance λ_{\max} and emission λ_{\max} [30]. In fact, in DMSO the coumarin–DHPMs **4a–c** exhibited the biggest bathochromic shifts, resulting from this ICT transfer. The ICT stabilization in coumarins has been correlated to the ability of strong polar solvents in stabilizing their excited singlet state [31,32].

Finally, the magnitude of the Stokes shifts is also indicative of the ICT. Indeed, a 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 groups and solvent molecules (Fig. 6) [29–33].

3.2. Fluorescence quantum yields

The fluorescence quantum yield Φ_f was determined by excitation at λ_{ex} of the compounds (Table 2) and they range between 3.94×10^{-2} and 22.39×10^{-2} . However, unexpectedly, in DMSO, DMF and ACN coumarin–DHPMs **4a–c** 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 [30]. In all the solvents the quantum yields of **4a** were reduced compared to those of **4b** and **4c**. However, compounds **4b** and **4c** are more fluorescent than **4a**.

The increase in quantum yields in DMSO, DMF and ACN in addition to a good Stokes shift of about 200 nm for our coumarin–DHPMs **4a–c**, in these media, and the ICT process makes these compounds a good start point for new chemical and biological probes.

3.3. Estimation of ground- and excited-state dipole moments in several solvents using the solvatochromic method

Stokes shifts have been calculated from the absorption and emission maxima of coumarin–DHPM derivatives **4a–c** (Table 2) to estimate the excited-state dipole moments. The shifts on the emission peaks with

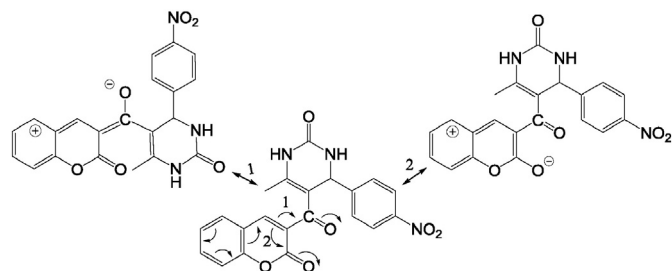


Fig. 8. Possible resonance structure of 4b.

solvent polarity change are more pronounced than those of absorption peaks. This indicates that $\Delta\mu$ is positive, meaning that the dipole moment of all the coumarin–DHPM derivatives **4a–c** increases on the excitation mode. Solvent properties, polarity values $f(\epsilon, n)$ and $\Phi(\epsilon, n)$ and microscopic solvent function (E_T^N) for various solvents used in this study are presented in Table 1. The absorption and emission maxima, Stokes shift $\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f$ and arithmetic mean of Stokes shift $\bar{\nu}_a + \bar{\nu}_f$ for all the compounds **4a–c** in different solvents are given in Table 3. Fig. 4(a–c) shows the graphs of spectral shifts $\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f$ versus bulk solvent polarity functions $f(\epsilon, n)$; Fig. 5(a–c) shows the graphs of the respective spectral shifts $\bar{\nu}_a + \bar{\nu}_f$ versus bulk solvent polarity functions $\Phi(\epsilon, n)$, while Fig. 5(a–c) plots the graphs of Stokes shifts against the microscopic solvent polarity E_T^N . The slopes S_1 , S_2 and S_3 were then obtained from these graphs.

The correlation coefficients, slopes and intercepts of fitted lines are given in Table 4. Good correlation coefficients were obtained for all cases. The values of the ground- and excited-state dipole moments and of the ratios (μ_e/μ_g) of all the solute molecules were estimated from Eqs. (9)–(11) and are present in Table 5. In addition, the change in dipole moment ($\Delta\mu$) was calculated from the first $\mu_e - \mu_g$ and second (Eq. (15)) methods and shown in Table 5.

Table 4
Statistical treatment of the correlations of solvent spectral shifts of **4a–c**.

Compound	Slope	Intercept (cm ⁻¹)	Correlation coefficient	Number of data
Eq. (1) correlation				
4a	−754.19468	9609.07997	0.94	7
4b	−1887.1776	16127.75109	0.92	7
4c	3018.44193	1638.87628	0.91	7
Eq. (2) correlation				
4a	−777.56346	50370.74787	0.87	7
4b	−2919.20397	58659.23848	0.90	7
4c	3626.4352	43576.19523	0.81	7
Eq. (12) correlation				
4a	−1195.72397	9482.65494	0.92	7
4b	−4133.40614	16279.37777	0.90	7
4c	9827.72125	854.54737	0.92	7

Table 5
Onsager cavity radius, ground state, excited state and change in dipole moment (in Debye, D) of **4a–c**.

Compounds	Radius (Å) ^a	μ_g (D) ^a	μ_e (D) ^b	$\Delta\mu$ (D) ^c	μ_e/μ_g ^d	$\Delta\mu$ (D) ^e
4a	4.81	0.49	3.22	3.17	6.57	3.47
4b	4.82	1.46	6.79	5.33	4.66	3.73
4c	5.01	0.55	6.00	5.46	10.94	6.08

Debye = 3.33564×10^{-30} C·m = 10^{-18} esu C·m.

^a The experimental ground-state dipole moment calculated from Eq. (9).

^b The experimental excited-state dipole moment calculated from Eq. (10).

^c The dipole moment change calculated from difference between μ_e and μ_g .

^d The ratio of μ_e and μ_g is calculated from Eq. (11).

^e The dipole moment change calculated from microscopic solvent polarity parameter (E_T^N) Eq. (15).

The dipole moments of all coumarin–DHPMs **4a–c** were higher in the excited state compared to the first ground state. The dipole moment changes with the nature of the substituent introduced on the coumarin structure. A fair agreement has been observed in dipole moment change ($\Delta\mu$) of **4a–c** confirming that these derivatives are more polar in their excited singlet state than in their ground state. This is due to a better stabilization under excitation that is consistent with the analysis of the Stokes shifts. After examination of results it appears that presence of the intramolecular charge transfer (ICT) process that occurs upon photo-excitation is not only caused by solvent polarity but is also strongly governed by the hydrogen bond ability with regard to the solvatochromic effects of DMF and DMSO which are strong hydrogen bond acceptors.

The higher values of μ_e and μ_g and the variation in the dipole moment for all compounds **4a–c** may be understood in terms of their possible resonance structures as shown in Figs. 7–9. The DHPM moiety in **4a–c** does not produce a considerable change in the π electron mobility. Upon excitation the carbonyl group becomes a strong electron donor. Hydroxyl group contributes better to the resonance of the mobility of π electrons. This explains the higher value of dipole moment in both excited states during the charge transfer process; the OH group may become more polar relative to the S_0 state.

4. Conclusions

The solvent effect on the absorption and emission spectra of three coumarin–3,4-dihydropyrimidones **4a–c** is described. A bathochromic shift is observed upon increasing the polarity of the solvent. The shifts in the emission peaks with solvent polarity changes are more pronounced than those of absorption peaks which indicate higher dipole moments in the excited state than in the ground state. Based on this result, we can conclude that an intramolecular charge transfer is taking place in the excited singlet state, resulting in an enhancement of the polarity.

We found that all molecules possess higher dipole moment values in the excited state than in the ground state and the dipole moment of **4b** and **4c** were higher than that of **4a**. This could be attributed to the intense electron resonance effect of carbonyl group in the excited singlet state. The interactions between π systems and the chromophore C=O lead to a strong delocalization of the excited state that makes molecules much more polar, thus resulting in greater values of dipole moments. The same is true for the mesomeric donor effect of the hydroxyl function which shows the same effect. Furthermore, the dipole moments μ_g and μ_e were greater for **4b** that presents a small Onsager radius calculated by ChemOffice. The measured values of μ_g and μ_e for the three dyes **4a–c** differ from each other and this may be due to the structural differences between them.

Coumarin–DHPMs **4a–c** are characterized by good fluorescence efficiency even in aprotic apolar media as shown in the literature [21] for coumarins. Dyads **4a–c** could be the building blocks for a new generation of fluorescent probes, combining the excellent optical properties of coumarin–DHPMs dyads with the simplicity of their synthesis.

Acknowledgements

Thanks are due to University of Aveiro and FCT/MEC for the financial support to the QOPNA research project (FCT UID/QUI/00062/2013) through national funds and where applicable co-financed by the FEDER, within the PT2020 Partnership Agreement.

References and notes

- [1] M. Iranshahi, M. Askari, A. Sahebkar, D. Hadjipavlou-Litina, *DARU J. Pharm. Sci.* 17 (2009) 99–103.
- [2] A. Lacy, R. O'Kennedy, *Curr. Pharm. Des.* 10 (2004) 3797–3811.
- [3] P.K. Jain, H. Joshi, *J. Appl. Pharm. Sci.* 2 (2012) 236–240.
- [4] S.J. Lee, U.S. Lee, W.J. Kim, S.K. Moon, *Mol. Med. Rep.* 4 (2011) 337–341.
- [5] L.W. Nitiema, A. Savadogo, J. Simporé, D. Dianou, A.S. Traore, *Int. J. Microbiol. Res.* 3 (2012) 183–187.
- [6] I. Kostova, S. Bhatia, P. Grigorov, S. Balkansky, V.S. Pramar, A.K. Prasad, L. Saso, *Curr. Med. Chem.* 18 (2011) 3929–3951.
- [7] X.Y. Huang, Z.J. Shan, H.L. Zhai, L. Su, X.Y. Zhang, *Chem. Biol. Drug Des.* 78 (2011) 651–658.
- [8] J. Klenkar, M. Molnar, *J. Chem. Pharm. Res.* 7 (2015) 1223–1238.
- [9] R.F. Rodrigues, A.K. Tashima, R.M.S. Pereira, R.S. Mohamed, F.A. Cabral, *J. Supercrit. Fluids* 43 (2008) 375–382.
- [10] L.G. Meimetis, J.C.T. Carlson, R.J. Giedt, R.H. Kohler, R. Weissleder, *Angew. Chem. Int. Ed.* 53 (2014) 7531–7534.
- [11] Q. Sun, J. Qian, H. Tian, L. Duan, W. Zhang, *Chem. Commun.* 50 (2014) 8518–8521.
- [12] C. Féau, E. Klein, C. Dosche, P. Kerthc, L. Lebeau, *Org. Biomol. Chem.* 7 (2009) 5259–5270.
- [13] S.K. Chattopadhyay, I. Kundua, R. Maitra, *Org. Biomol. Chem.* 8 (2014) 8087–8093.
- [14] Z. Yang, J. Cao, Y. He, J.H. Yang, T. Kim, X. Peng, J.S. Kim, *Chem. Soc. Rev.* 43 (2014) 4563–4601.
- [15] P. Pallavicini, V. Amendola, C. Massera, E. Munduma, A. Taglietti, *Chem. Commun.* (2002) 2452–2453.
- [16] K.V. Sashidhara, M. Kumar, R. Sonkar, B.S. Singh, A.K. Khanna, G. Bhatia, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 2769–2779.
- [17] M.A. Musa, J.S. Cooperwood, M.O. Khan, *Curr. Med. Chem.* 15 (2008) 2664–2679.
- [18] K.V. Sashidhara, S.R. Avula, K. Sharma, G.R. Palnati, S.R. Bathula, *Eur. J. Med. Chem.* 60 (2013) 120–127.
- [19] L. Kearney, J. Shipley, *Methods Mol. Biol.* 878 (2012) 149–174.
- [20] M. Makhloufi-Chebli, S.M. Hamdi, A. Rabahi, A.M.S. Silva, M. Hamdi, *J. Mol. Liq.* 181 (2013) 89–96.
- [21] A. Rabahi, M. Makhloufi-Chebli, S.M. Hamdi, A.M.S. Silva, D. Kheffache, B. Boutemour-Kheddis, M. Hamdi, *J. Mol. Liq.* 195 (2014) 240–247.
- [22] A. Benazzouz, M. Makhloufi-Chebli, N. Khatir-Hamdi, B. Boutemour-Kheddis, A.M.S. Silva, M. Hamdi, *Tetrahedron* 71 (2015) 3890–3894.
- [23] L. Billot, A. Kawski, *Z. Naturforsch.* 17a (1962) 621–626.
- [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 A Mol. Biomol. Spectrosc.* 82 (2011) 527–528.
- [26] J.R. Mannekutla, B.G. Mulimani, S.R. Inamdar, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 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] F.A.S. Chipem, A. Mishra, G. Krishnamoorthy, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14 (25) (2012) 8775–8790.
- [30] M. Cigán, J. Donovalová, V. Szöcs, J. Gaspar, K. Jakusová, A. Gaplovsky, *J. Phys. Chem. A* 117 (2013) 4870–4883.
- [31] P. Dahiya, M. Kumbhakar, T. Mukherjee, H. Pal, *Chem. Phys. Lett.* 414 (2005) 148–154.
- [32] A.S. Satpati, M. Kumbhakar, S. Nath, H. Pal, *Photochem. Photobiol.* 85 (2009) 119–129.
- [33] D. Panda, A. Datta, *J. Chem. Phys.* 125 (2006) 045513–045519.