

## Experimental and theoretical study of the immunoactivity of 2-methoxy-carbonylpyrrole and derivatives on the lymphocyte T human

### Etude expérimentale et computationnelle de l'immunoactivité des dérivés du 2-méthoxycarbonylpyrrole sur le lymphocyte T humain

A. Idrissi Taghki<sup>1</sup>, M. Bouachrine<sup>2</sup>, M. Hnach<sup>1</sup>, S. Harraga<sup>3</sup>, J-P-Perrin<sup>3</sup>,  
B. Laude<sup>4</sup>, T. Lakhliifi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Département de Chimie, Université Moulay Ismail, Faculté des Sciences, Meknès, Maroc

<sup>2</sup> UMIM, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Faculté Polydisciplinaire de Taza, B. P. 1223, Taza Gare, Maroc

<sup>3</sup> Equipe de Chimie Thérapeutique, UFR Sciences Médicales et Pharmaceutiques, Place St Jacques, 25030 Besançon Cedex, France

<sup>4</sup> Laboratoire de Chimie Organique, UFR Sciences et Techniques, Université de Franche-comté, 16 Route de Gray, 25030 Besançon, France.

\*Corresponding Author: Email address: [tahar.lakhliifi@yahoo.fr](mailto:tahar.lakhliifi@yahoo.fr) ; Tel. +212 535538870; Fax +212535536808.

Received: 02 June 2010; revised 2 July 2010; accepted: 07 July 2010

#### Abstract

In order to prepare original compounds that present a new activity, and important immunomodulator properties, we have carried out theoretical study by modern quantum mechanics methods of for each class of molecules derived from the 2-methoxycarbonyl-5-phenylpyrrole and bearing in position -3 either alkyl or aryl group. The goal is to evaluate, on the one hand, the structural and electronic role of these substituents and on the other hand, to announce the approach with the experimental results concerning especially pharmacological activities

*Keywords* : Immunomodulator properties, DFT study, energies LUMO, HOMO, Gap.

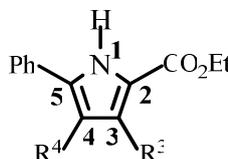
#### Résumé

La volonté de préparer des composés originaux susceptibles de présenter une activité nouvelle, et donc des propriétés immuno-modulatrices importantes nous a poussés à effectuer cette étude théorique par des méthodes de mécanique quantique moderne pour chaque classe de molécules dérivées du 2-éthoxycarbonyl-5-phényl-pyrrole et portant en position -3 soit un groupement alkyle soit un groupement aryle a été entreprise afin d'évaluer, d'une part, le rôle structural et électronique de ces substituants et d'autre part, de faire l'approche avec les résultats expérimentaux à savoir les activités pharmacologiques.

*Mots clés* : Propriétés immuno-modulatrices, méthode DFT, Energies HOMO, LUMO, Gap.

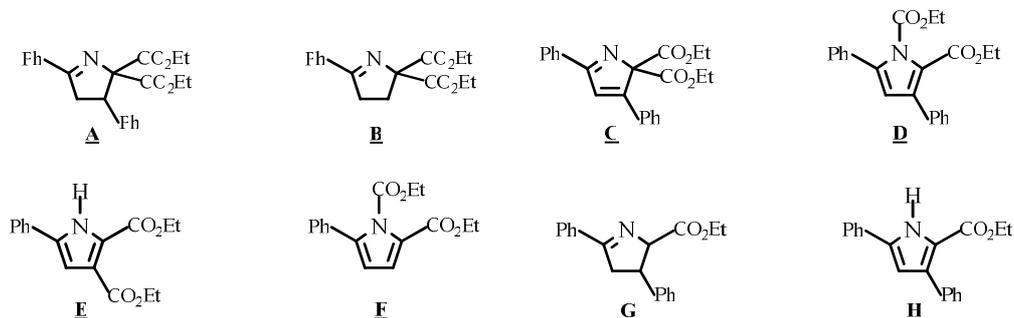
#### 1. Introduction

Dans le présent travail, nous avons envisagé de proposer l'étude de l'immunoactivité éventuelle de certains composés dérivés du 2-éthoxycarbonyl-5-pyrrole, déjà obtenus lors de nos travaux antérieurs [1, 2], du type (Figure1).



**Figure 1** : Dérivés substitués en -3 et -4 du 2-Ethoxycarbonyl-5-phénylpyrrole

En fait, cette recherche a été induite par les résultats obtenus par Birouk et coll. [3, 4] lors de l'étude de l'immunoactivité vis-à-vis du lymphocyte T humain *in-vitro* avec plusieurs pyrroles, 2H-pyrroles et 3,4-dihydropyrroles substitués en diverses positions par des groupements phényle et éthoxycarbone (Figure 2).

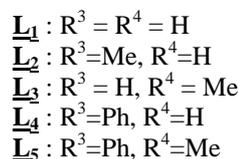
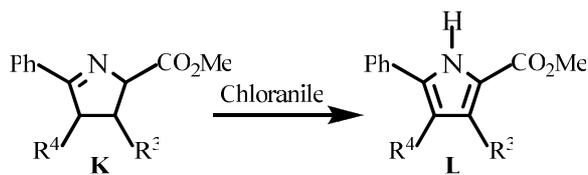


**Figure 2** : Molécules étudiées par Birouk et coll.[3, 4] en immunoactivité vis-à-vis du lymphocyte T humain *in-vitro*

Le produit **H** manifeste une activité immunostimulante plus forte que celle des autres produits (**A-G**) et du lévamisole [5, 6].

0000

Dans nos travaux antérieurs [1,2], nous avons donc préparé quelques dérivés analogues du pyrrole **L** à partir des composés **K** (ylures d'azométhine cycliques pentagonaux) par action du parachloranile au reflux du xylène et soumis ces derniers à des essais pharmacologiques afin de mieux corrélérer structure-activité de ce type de molécules (Figure 3).



**Figure 3** : Dérivés substitués en -3 et -4 du 2-Méthoxycarbonyl-5-phényl pyrrole **L**

Le produit **L**<sub>4</sub> (R<sup>3</sup>=Ph et R<sup>4</sup>=H) est le même que celui préparé par Birouk (composé **H**) [3,4] excepté qu'il s'agit ici de l'ester méthylique.

## 2. Matériels et méthodes

### Approche expérimentale : Etude pharmacologique des composés **L**

Cette étude a été assurée en collaboration avec J. Panouse-Perrin et S. Harraga de l'Equipe de Chimie Thérapeutique de l'UFR Sciences Médicales et Pharmaceutiques, Besançon, France. Nous nous contenterons ici de reproduire le protocole expérimental et les conclusions retirées [2].

### Principe

Des lymphocytes T humains mis en culture à 37°C en présence d'une quantité convenable de PHA, ici 25 µg/mL, sont capables de se multiplier. Cette transformation est augmentée si on ajoute simultanément des produits immunostimulants comme le chlorhydrate de lévamisole. L'effet transformant de la PHA seule, ou de l'association PHA + produit, est mis en évidence par l'addition de thymidine tritiée au milieu de culture, 48 heures après le début de la culture et évaluation au compteur à scintillation liquide de la prolifération cellulaire 18 heures après.

### Réactifs

\* Les lymphocytes humains sont obtenus par centrifugation en gradient de Ficoll à partir de sang de donneurs sains provenant du C.R.T.S. de Besançon (France). Ils sont ajustés à 10<sup>6</sup>/mL dans le milieu de culture 199 enrichi en glutamine (102 µg/mL).

\* Le sérum humain AB (SAB) est préalablement décomplémenté pendant 30 min au bain-marie à 56°C.

\* La PHA-C de marque IBF (lot n°7202) est ajustée à une concentration de 7 mg/mL après reconstitution avec de l'eau distillée stérile. On effectue une dilution pour obtenir une concentration finale active en PHA de 25 µg/mL dans les tubes de culture.

Pour chaque produit on prépare une solution mère à 2240 µg/mL dans le milieu 199, puis des dilutions de telle façon que les concentrations des produits au contact des lymphocytes s'échelonnent entre 1 et 160 µg/mL.

### Mode opératoire (tableau 1)

La répartition des réactifs est effectuée dans l'ordre indiqué dans le tableau 1, on obtient ainsi :

\* tube "témoin" : les cellules sont mises à incuber à 37°C dans le milieu de culture.

\* tubes témoins "PHA" : les cellules sont incubées à 37°C dans le milieu de culture en présence de PHA.

\* tubes "essais" : les cellules sont incubées à 37°C dans le milieu de culture en présence de PHA et du produit à étudier à différentes concentrations.

Après 48 heures d'incubation à 37°C, on ajoute dans tous les tubes la thymidine tritiée. L'ensemble est remis 18 heures à 37°C. Ensuite le contenu de chacun des tubes est recueilli par filtration, sur filtres en fibre de verre (collecteur d'échantillon Millipore 1225) ; les filtres sont lus au compteur à scintillation liquide après addition de liquide de scintillation.

On détermine, sur chaque filtre, le nombre de coups par minute (CPM).

**Tableau 1** : Protocole expérimental de l'étude pharmacologique des composés **L**

Réactifs \ Tubes	Tube "témoin"	Tube "PHA" "témoin"	Tube "essais"
Produit	-	-	0,1 mL
Lymphocytes 10 <sup>6</sup> mL	1 mL	1 mL	1 mL
SAB	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL
PHA	-	0,1 mL	0,1 mL
Laisser 48 heures à l'étuve à 37°C			
Thymidine tritiée 10 UQ/mM	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL
Laisser 18 heures à l'étuve à 37°C. Recueillir sur filtres en fibre de verre. Ajouter sur chaque filtre 10 mL de liquide de scintillation. Attendre 2h à +4°C à l'obscurité puis lire au compteur à scintillation liquide.			

### Expression des résultats

Le nombre de CPM est proportionnel au nombre de cellules présentes ayant incorporé de la thymidine tritiée.

Pour chaque concentration de produit on compare le nombre de CPM obtenus avec les cellules en présence de PHA+produit au nombre de CPM obtenus avec les cellules en présence de PHA seule ; on en déduit le rapport T :

$$T = \frac{\text{CPM (Cellules + PHA + Produit)}}{\text{CPM (Cellules + PHA)}}$$

Si plusieurs concentrations sont étudiées, on peut construire le schéma représentatif de l'immunoréactivité des produits : PHA + produit par rapport à l'activité de la PHA seule en fonction de la concentration du produit. Celle-ci peut être soit au-dessus de la droite T = 1 : on pourra penser à un effet immunostimulant, soit en dessous de la droite T = 1 : cette situation évoquera plutôt l'action d'un produit cytotoxique que celle d'un immunodépresseur.

Les composés **L**<sub>1</sub>, **L**<sub>2</sub>, **L**<sub>3</sub>, **L**<sub>4</sub> et **L**<sub>5</sub> sont étudiés pour leur activité immunomodulatrice sur le lymphocyte T humain en utilisant comme méthode la transformation lymphoblastique. L'étude comparative des produits est effectuée sur un même donneur afin d'éviter les fluctuations individuelles. De plus, le chlorhydrate de lévamisole est pris comme référence. Nos résultats sont représentés dans la figure 4.

Les résultats obtenus [6] montrent que :

\* jusqu'à une concentration de 80 µg/mL, l'ensemble des composés, contrairement au chlorhydrate de lévamisole, ne révèle pas de toxicité vis-à-vis du lymphocyte T humain,

\* à une concentration de 160 µg/mL, on peut noter une légère toxicité pour **L**<sub>1</sub> et **L**<sub>5</sub>,

\* la présence d'un substituant phényle en -3 est très favorable au développement de l'activité (**L**<sub>4</sub> et **L**<sub>5</sub>),

\* l'absence d'un phényle en -3 (**L**<sub>1</sub>, **L**<sub>2</sub>, **L**<sub>3</sub>) entraîne une activité inférieure à celle de **L**<sub>4</sub> et **L**<sub>5</sub>.

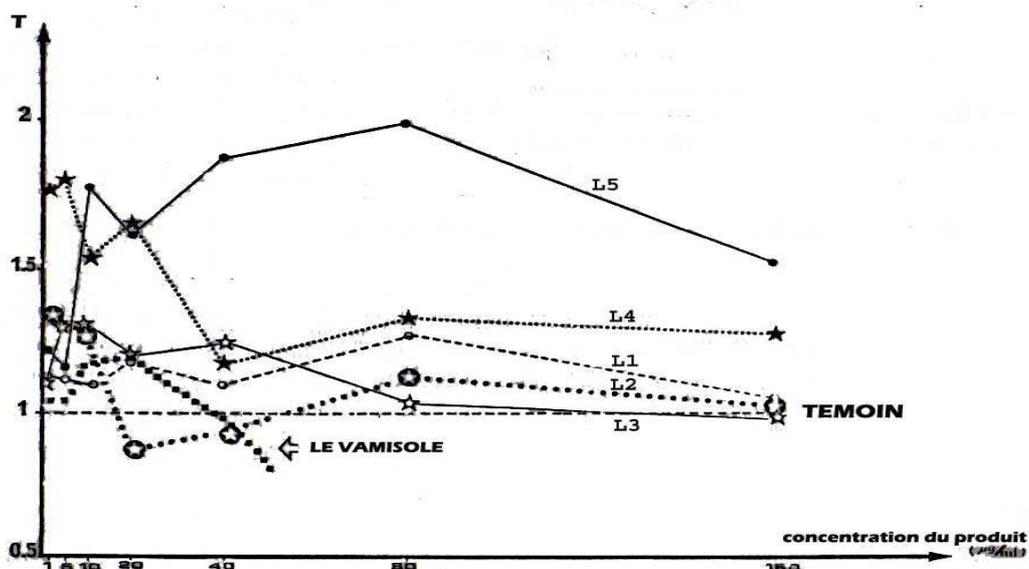


Figure 4 : Immunoréactivité des composés L sur des lymphocytes T humains activés par PHA

Enfin dans le cas des composés phénylés en -3 (L<sub>4</sub> et L<sub>5</sub>), la présence d'un substituant supplémentaire en -4 (L<sub>5</sub>) apporte un supplément d'activité.

Ces observations confirment les premiers essais [2] et on doit également noter que la structure de L<sub>5</sub> peut être corrélée avec celle du produit étudié par Smith et coll. [7] (Figure 5).

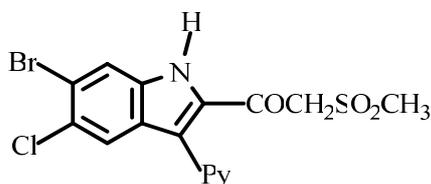


Figure 5 : Produit étudié par Smith et coll. [7]

### Approche théorique (Méthode DFT)

La volonté de préparer des composés originaux susceptibles de présenter une activité nouvelle et donc des propriétés immuno-modulatrices importantes, nous a poussés à effectuer cette étude théorique limitée pour chaque classe de molécules dérivées du 2-éthoxycarbonyl-5-phényl-pyrrole et portant en position -3 soit un groupement alkyle soit un groupement aryle. Ainsi, elle a été entreprise afin d'évaluer, d'une part, le rôle structural et électronique de ces substituants et d'autre part, de faire l'approche avec les résultats expérimentaux à savoir les activités pharmacologiques décrites dans la partie II.

Afin d'atteindre ce but, des méthodes de mécanique quantique sont mises en œuvre pour obtenir des descriptions électroniques structurales et énergétiques de ces composés. La théorie de la fonctionnelle de la densité (DFT) est devenue un outil incontournable de la chimie quantique pour une modélisation précise applicable à la chimie moléculaire [8].

### Méthodologie du travail

Tous les calculs sont effectués par la série des programmes Gaussian 03 [9]. L'optimisation des géométries a été réalisée par la théorie de la fonctionnelle de la densité en utilisant la méthode hybride B3LYP avec la base 3-21G\*) [10]. Tous les paramètres des géométries introduites sont optimisés. Les paramètres géométriques, électroniques, les énergies des orbitales frontières (HOMO et LUMO) et le Gap ( $E_{LUMO-HOMO}$ ) sont déduits.

Dans un premier temps, nous avons soumis les molécules de A à H à une étude théorique (DFT) et avons rassemblé les résultats sur le tableau 2 suivant :

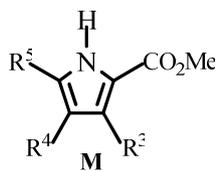
**Tableau 2** : Paramètres énergétiques et  $\lambda_{\max}$  des molécules étudiées en immunoactivité par Birouk et coll. [3,4] (**A-H**) et étudiées par la méthode DFT

Pyrrole	Et (Kcal/mol)	E <sub>HOMO</sub> (eV)	E <sub>LUMO</sub> (eV)	Gap (eV) (LUMO - HOMO)	E (Activation) (eV)	$\lambda_{\max}$ (nm)	f
<b>A(3R)</b>	-1201.2330	-6.4829	-1.3065	5.1764	3.8820	319.38	0.0139
<b>A(3S)</b>	-1201.2291	-6.4333	-1.1978	5.2355	3.8375	323.08	0.0021
<b>B</b>	-971.4493	-6.4671	-1.2292	5.2379	3.8787	319.66	0.0104
<b>C</b>	-1200.0063	-6.2141	-1.7558	4.4583	3.8892	318.79	0.0012
<b>D</b>	-1200.0345	-5.7986	-1.3356	4.4630	3.4814	356.13	0.4471
<b>E</b>	-970.2640	-5.9051	-1.4154	4.4895	3.4283	361.65	0.4005
<b>F</b>	-970.2538	-5.8678	-1.2202	4.6476	3.5785	346.47	0.6265
<b>G(2S,3S)</b>	-935.5092	-6.3743	-1.1483	5.2260	3.8864	319.02	0.0052
<b>G(2R,3R)</b>	-935.5092	-6.3743	-1.1480	5.2263	3.8864	319.02	0.0052
<b>G(2S,3R)</b>	-935.5108	-6.4410	-1.2240	5.2170	3.8970	318.16	0.0173
<b>G(2R,3S)</b>	-935.5108	-6.4404	-1.2259	5.2145	3.8967	318.18	0.0173
<b>H</b>	<b>-934.3264</b>	<b>-4.7470</b>	<b>-1.0421</b>	<b>3.7049</b>	<b>3.4527</b>	<b>363.09</b>	<b>0.4997</b>

Nous avons constaté lors de l'étude expérimentale que le composé **H** manifestait une immunoactivité plus forte que celle des sept autres (**A-G**). Nos premiers résultats théoriques montrent que le composé **H** présente un Gap de 3.7049 (eV) plus faible que celui des autres et une valeur de maximum d'absorption  $\lambda_{\max}$  de 363.09 nm plus forte que celle des autres (tableau 2).

Ensuite, nous avons soumis les produits **L** (**L<sub>1</sub>**, **L<sub>2</sub>**, **L<sub>3</sub>**, **L<sub>4</sub>** et **L<sub>5</sub>**) à une étude DFT, on constate également que le composé **L<sub>5</sub>** présente une plus grande activité par rapport aux quatre autres pyrroles (**L<sub>1</sub>**, **L<sub>2</sub>**, **L<sub>3</sub>**, **L<sub>4</sub>**) (tableau 3). Ce dernier présente un Gap faible et un  $\lambda_{\max}$  fort.

Les résultats précédents nous ont incités à proposer une étude théorique (DFT) dans le but de mieux comprendre la relation structure-activité et les phénomènes mis en jeu. Nous avons donc effectué des calculs sur de nouvelles molécules **M** dérivées du pyrrole en faisant varier les substituants  $R^3$ ,  $R^4$  et  $R^5$  afin de prédire la forme éventuelle qui puisse avoir une activité encore plus forte que celle obtenue pour **L<sub>5</sub>**.

**Figure 6** : Composés dérivés du pyrrole étudiés par la méthode DFT

### 3. Résultats et discussion

Les propriétés quantiques dépendent des conformations des structures et comme approximation, on suppose toujours que la conformation la plus probable est celle correspondant à l'énergie globale minimum. Une minimisation plus sophistiquée est donc obtenue par la méthode DFT en utilisant la méthode hybride B3LYP avec la base 3-21G\*. Nous avons donc effectué des calculs théoriques sur les structures des différents composés étudiés **M**. Les résultats sont rassemblés sur le tableau 3.

L'examen des valeurs du Gap et de  $\lambda_{\max}$  représentés dans ce tableau, nous permet de relever la valeur la plus faible du Gap (2.9329) et la valeur la plus forte de  $\lambda_{\max}$  (376.09) qui correspondent au composé **L<sub>5</sub>** qui présente une plus grande activité expérimentalement.

En examinant donc les différents paramètres obtenus tels quels, les énergies LUMO et HOMO, l'énergie du Gap et le maximum d'absorption  $\lambda_{\max}$ , on peut conclure que les propriétés pharmacologiques détaillées dans la première partie sont fortement liées aux paramètres électroniques des molécules étudiées. Nous avons observé que dans le cas des molécules étudiées expérimentalement (**L<sub>1</sub>**, **L<sub>2</sub>**, **L<sub>3</sub>**, **L<sub>4</sub>** et **L<sub>5</sub>**), l'augmentation de l'activité immunostimulante entraîne :

- \* Une diminution de l'énergie du Gap ;
- \* Une augmentation du maximum d'absorption  $\lambda_{\max}$ .

Tableau 3 : Paramètres énergétiques et  $\lambda_{\max}$  des composés **M** étudiés par la méthode DFT

Pyrrole	R <sup>5</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>3</sup>	E <sub>t</sub> (Kcal/mol)	E <sub>HOMO</sub> (eV)	E <sub>LUMO</sub> (eV)	Gap (eV) (LUMO - HOMO)	E (Activation) (eV)	$\lambda_{\max}$ (nm)	f
1=L <sub>1</sub>	Ph	H	H	-661.8077	-5.6050	-2.3979	3.2071	3.4815	356.13	0.7189
2	Ph	Ph	H	-890.2824	-5.5288	-2.4452	3.0836	3.3143	374.09	0.4789
3=L <sub>3</sub>	Ph	Me	H	-700.6990	-5.5200	-2.3230	3.1970	3.4225	362.26	0.6699
4=L <sub>4</sub>	Ph	H	Ph	-890.2842	-5.5966	-2.6506	2.9446	3.3149	371.13	0.4418
5=L <sub>2</sub>	Ph	H	Me	-700.7032	-5.5394	-2.3712	3.1682	3.4648	357.84	0.6877
6	Ph	Ph	Ph	-1118.7571	-5.5990	-2.5258	3.0732	3.2967	374.02	0.4055
7=L <sub>5</sub>	Ph	Me	Ph	<b>-929.1742</b>	<b>-5.5432</b>	<b>-2.6103</b>	<b>2.9329</b>	<b>3.3408</b>	<b>376.09</b>	<b>0.4624</b>
8	Ph	Ph	Me	-929.1775	-5.4727	-2.3957	3.0770	3.3135	374.17	0.4690
9	Me	H	Ph	-700.7003	-5.5475	-2.3262	3.2213	3.5180	352.43	0.1283
10	Me	H	H	-472.2250	-5.6600	-1.8064	3.8536	3.6216	342.34	0.0004
11	Me	Ph	H	-700.6989	-5.6254	-1.9344	3.6910	3.6151	342.96	0.0005
12	Me	Me	H	-511.1145	-5.4931	-1.7497	3.7434	3.6126	343.20	0.0004
13	Me	H	Me	-511.1188	-5.5500	-1.7473	3.8027	3.6364	340.95	0.0004
14	Me	Ph	Ph	-929.1741	-5.6200	-2.2963	3.3237	3.5301	351.22	0.1393
15	Me	Me	Ph	-739.5898	-5.5260	-2.1473	3.3787	3.5434	349.90	0.1630
16	Me	Ph	Me	-739.5937	-5.5113	-1.8625	3.6488	3.6299	341.56	0.0005
17	Ph	Me	Me	-739.5944	-5.4542	-2.2761	3.1781	3.4285	361.63	0.6585
18	H	H	H	-433.3315	-5.9266	-1.8870	4.0396	3.6630	338.48	0.0003
19	H	Me	Me	-511.1131	-5.6224	-1.7147	3.9077	3.6882	336.16	0.0003
20	H	Ph	Ph	-890.2795	-5.6734	-2.3815	3.2919	3.5488	349.37	0.0156
21	H	H	Me	-472.2236	-5.7444	-1.7857	3.9587	3.6958	335.48	0.0003
22	H	Me	H	-472.2199	-5.7360	-1.8176	3.9184	3.6557	339.15	0.0003
23	H	Ph	H	-661.8054	-5.6892	-2.0738	3.6154	3.5965	344.74	0.0004
24	H	H	Ph	-661.8077	-5.6968	-2.4066	3.2902	3.5152	352.71	0.0087
25	H	Me	Ph	-700.6962	-5.7025	-2.2372	3.4653	3.5511	349.14	0.0144
26	H	Ph	Me	-700.6999	-5.6495	-1.9957	3.6538	3.6093	343.51	0.0004

Ces deux paramètres dépendent directement de la distribution électronique dans la molécule, cette distribution se traduit par une réactivité chimique ou biologique différente. Une augmentation de la densité électronique conduit à un renforcement de l'activité pharmacologique, en effet les molécules possédant des groupements riches en électrons (phényle) favorisent une forte activité immunostimulante.

Les résultats montrent effectivement que les molécules ayant des groupements riches en électrons possèdent des énergies de Gap faibles et d'importantes valeurs de maximum d'absorptions c'est le cas par exemple des molécules **6** et **7(L<sub>5</sub>)**.

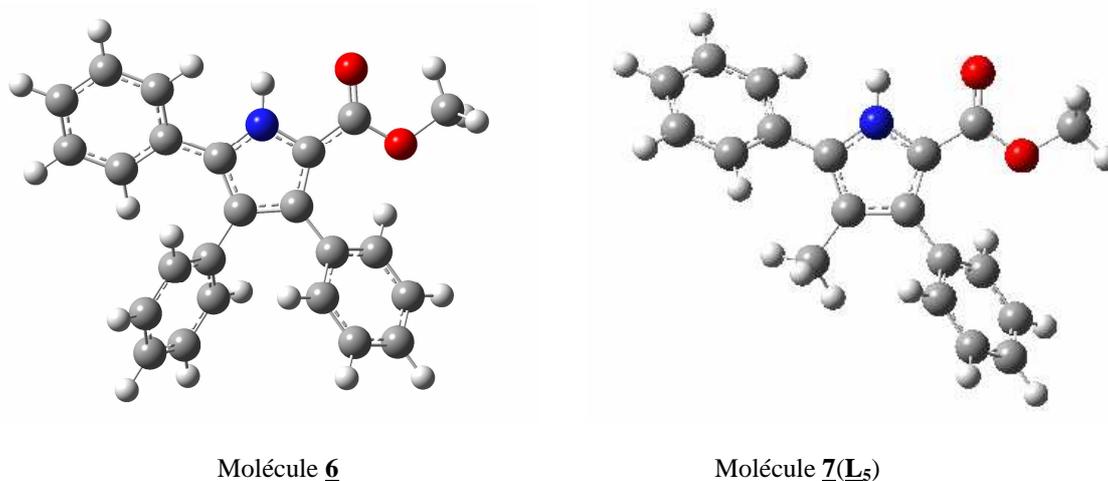
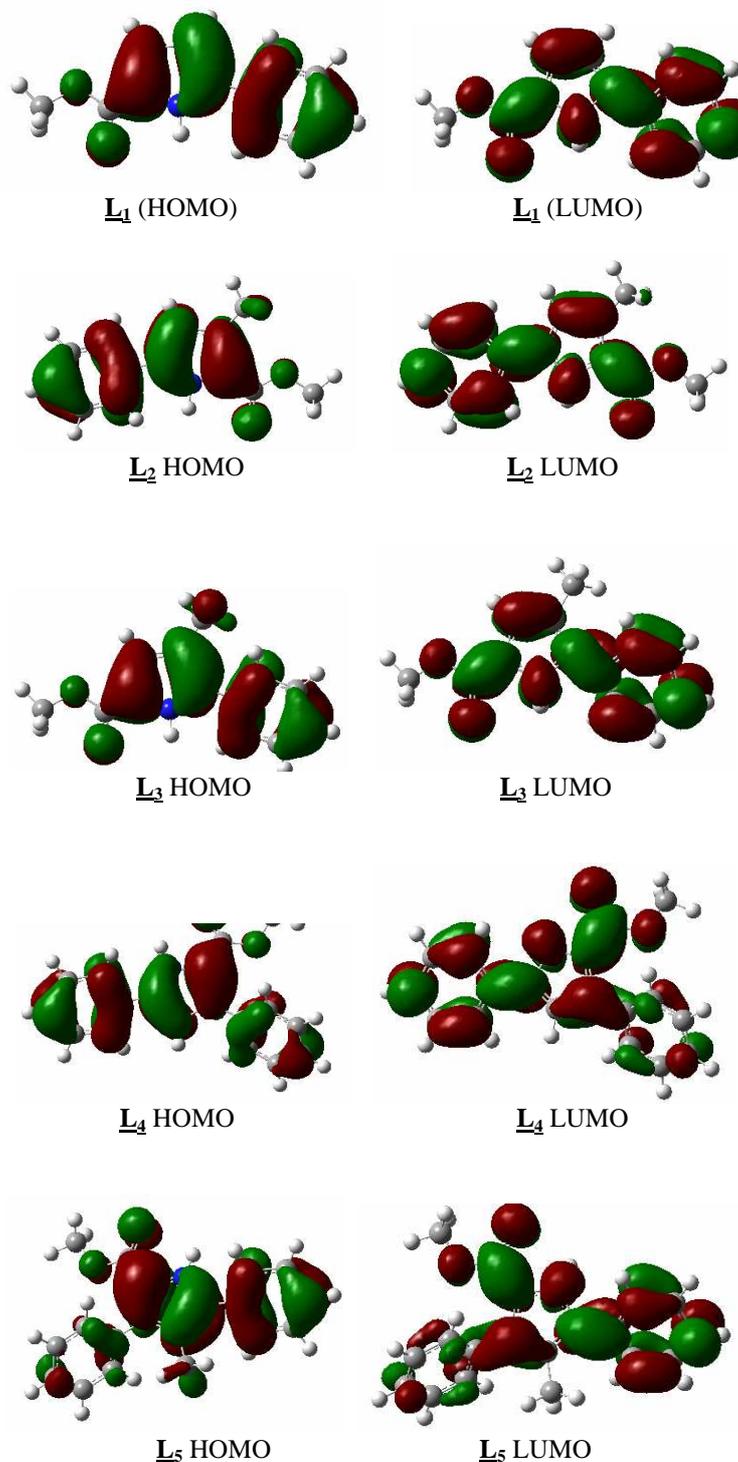


Figure 7 : La conformation la plus stable des molécules **6** et **7(L<sub>5</sub>)** obtenue après optimisation par la méthode B3LYP/3-21G\*

D'autre part nous avons pensé que les orbitales HOMO et LUMO ont une relation avec l'activité biologique puisque généralement, ces orbitales peuvent participer aux réactions d'oxydoréduction. Pour cela nous avons déterminé les distributions de la densité électronique sur le squelette moléculaire, les résultats sont représentés sur la figure 6.

Nous observons d'une part que cette densité est délocalisée sur tout le squelette, d'autre part les orbitales HOMO possèdent un caractère  $\pi$  liant au sein des unités aromatiques alors qu'elles possèdent un caractère  $\pi$  antiliant entre deux unités consécutives. Un phénomène inverse est observé pour les orbitales LUMO.



**Figure 8 :** Distribution électronique des orbitales frontières HOMO et LUMO des molécules étudiées expérimentalement ( $\underline{L}_1$  -  $\underline{L}_5$ )

## 4. Conclusion

Dans les molécules étudiées qui sont à base du pyrrole, nous avons montré par une étude théorique (méthode DFT) des propriétés électroniques, que l'introduction d'un noyau benzénique en position -5 du pyrrole modifie les propriétés physiques et chimiques des molécules étudiées, ce qui a des répercussions profondes sur leur activité biologique et plus spécialement sur l'activité immunomodulatrice. La substitution d'atomes d'hydrogène par des groupements aromatiques riches en électrons peut modifier la conformation d'une molécule, du fait de leurs tailles différentes et des propriétés électroniques apportées par le cycle aromatique du benzène. Ainsi les énergies LUMO, HOMO et le Gap sont notablement modifiés par la présence de ces substituants (aromatiques), ce qui se répercute sur les propriétés physiques et par la suite sur les activités biologiques citées dans la partie II.

## Remerciements

Les auteurs remercient l'Association Marocaine des Chimistes Théoriciens" (AMCT) et le laboratoire de chimie organométallique de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier pour leur aide au niveau des programmes et des logiciels de calcul.

## Références

1. Lakhlifi T., Sedqui A., Fathi T., Laude B., Robert J-F., *Can. J. Chem.* 72, (1994) 1417.
2. Lakhlifi T., Thèse de Doctorat ès-Sciences Physiques, Besançon, France (1989).
3. Birouk M., Thèse de Doctorat ès Sciences Physiques, Besançon (1988).
4. Birouk M., Harraga S., Panouse-Perrin J., Robert J-F., Damelin-court M., Theobald F., Mercier R., Panouse J-J., *Eur. J. Med. Chem.*, 26 (1991) 91.
5. Harraga S., Birouk M., Panouse J-J., Robert J-F. et Panouse-Perrin J., 24èmes Rencontres Internationales de Chimie Thérapeutique, Strasbourg, France (1988).
6. Lakhlifi T., Harraga S., Laude B., Robert J-F., Panouse J-J. et Panouse-Perrin J., 25èmes Rencontres Internationales de Chimie Thérapeutique, Grenoble, France (1989).
7. Smith S. R., Terminelli C., Epps S., Watnick A. et Umland S., *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 9, (1987) 333.
8. Grozema F. C., Candeias L.P., Swart M., Van Duijnen P., Wildemen J., Hadzianon G., *J. Chem. Phys.*, 117 (24) (2002) 11366 ; Briere J-F. and Cote M., *J. Phys. Chem. B*, 108 (10) (2004) 3123 ; Yunqiao Ding, Dacheng Feng, Shengyu Feng, Jie Zhang and Ju Xie, *Polymer*, 47 (2006) 368 ; Kotaro Honda, Yukio Furukawa and Hiroyuki Nishide, *Vibrational Spectroscopy*, 40 (2006) 149 ; Bouzakraoui S., Bouzzine S. M., Bouachrine M., Hamidi M., *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)*, 725 (2005) 39 ; Bouzzine S. M., Bouzakraoui S., Bouachrine M., Hamidi M., *J. Mol. Struct. (THEOCHEM)*, 726 (2005) 26.
9. Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Zakrzewski V. G., Montgomery J. A., Stratmann R. E., Burant J. R., Dapprich S., Millam J. M., Daniels A. D., Kudin K.N., Strain M. C., Farkas O., Tomasi J., Barone V., Cossi M., Cammi R., Mennucci B., Pomelli C., Adamo C., Clifford S., Ochterski J., Petersson A., Ayala P. Y., Cui Q., Morokuma K., Malick D. K., Rabuck A. D., Raghavachari K., Foresman J. B., Cioslowski J., Ortiz J. V., Stefanov B. B., Liu G., Liashenko A., Piskorz P., Komaromi I., Gomperts R., Martin R. L., Fox D. J., Keith T., Al-Laham M. A., Peng C. Y., Nanayakkara A., Gonzalez C., Challacombe M., Gill P. M. W., Johnson B. G., Chen W., Wong M. W., Andres J. L., Head-Gordon M., Replogle E. S., Pople J. A., *GAUSSIAN98, Revision A 7, Gaussian Inc., Pittsburgh, PA*, (2003).
10. Lee C., Yang W., R. G., Parr, *Phys. Rev.*, B 37 (1993) 785.