

N° D'ORDRE

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI, TIZI-OUZOU

FACULTÉ DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



MEMOIRE DE MASTER2

Spécialité : Chimie

Option : Chimie Pharmaceutique

Présenté par :

M^{elle} Hayat AYACHE et M^{elle} Lynda SAIDI

Thème :

**Conception, Synthèse et Évaluation par
UV-VISIBLE et Fluorescence de Dérivés
Coumariniques en tant que Sondes**

Soutenue le Juin 2014 devant la commission d'examen :

M^{me} S.DELLAH

Maître de conférences A UMMTO

Présidente

M^{me} M.CHEBLI

Maître de conférences A UMMTO

Promotrice

Epouse MAKHLOUFI

M^{elle} DERMECHE

Maître de conférences A UMMTO

Examinatrice

M^{me} OUKACHA

Maître de conférences B UMMTO

Examinatrice

Epouse D.HIKEM

Remerciements

Nous tenons à remercier le Dieu pour le courage qu'Il nous a donné afin de mener ce travail à terme.

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Chimie organique du Département de Chimie, Faculté des Science de l'Université U.M.M.T.O De Tizi Ouzou, dirigé par Madame Chebli épouse Makhloufi Malika, que nous remercions chaleureusement de nous avoir encadrées, avec beaucoup de compétence, d'enthousiasme et de disponibilité. Merci Madame pour vos conseils, votre optimisme et la confiance que vous nous avez accordés et permis de réaliser ce travail de recherche.

Nous adressons avec tous nos respects et nos remerciements au personnel du laboratoire de chimie organique du Département de chimie, Faculté des sciences de l'Université de Mouloud Mammeri ainsi que le laboratoire de chimie de monsieur TAZKRAIT.

Nos remerciements vont également

A Madame S. DELLAH, Maitre de conférence à l'U.M.M.T.O., pour son accueil dans son laboratoire de recherche et d'avoir mis à notre disposition tout le matériel nécessaire pour effectuer ce travail. Ca nous a fait un grand honneur d'accepter de présider notre travail.

A M^{elle} DERMECHE et M^{me} OUKACHA épouse D. HIKEM qui ont accepté de juger ce travail.

A Monsieur ADKHIS et L.ABANNE, pour leur accueil dans le laboratoire de recherche.

Toute notre reconnaissance et notre gratitude les plus sincères à notre enseignant Monsieur M.A.BENMANSOUR pour ses conseils avisés.

Enfin nous tenons à exprimer nos profonds remerciements à tous ceux qui nous ont soutenues de près ou de loin pour la réalisation de ce travail.

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail,

A mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, et qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. J'espère qu'ils trouveront dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour.

A mon fiancé qui n'a jamais cessé de croire en moi et de m'encourager, merci Pour le soutien moral.

A mon petit frère Aghiles, et mes chères sœurs : Lylia et Nassima.

A mes grands parents, et à toutes mes tantes et oncles.

A toute la famille Ayache et Iklef.

A mon binôme Lynda et toute sa famille.

A toutes mes enseignants et amis chimistes.

A mes meilleurs amies : Hesna, Aldjia, Yasmine, Karima, Ikram.

Hayet

DEDICACE

Je dédie ce travail,

A ma défunte grand-mère « AZIZOU » pour tout le sacrifice qu'elle portait à mes études. Que sa terre lui soit légère !

A mes parents en témoignage de mon profond Amour, en reconnaissance de l'éducation et de Patience ;

A mon frères : Lounes et mes sœurs : Rachida, Dilia et Mérieme pour tout le soutien morale qu'ils m'ont apporté;

A toute ma Famille en particulier : mes tantes; ma grand-mère « MALHA » ; mes oncles; mes cousines et cousins ;

A toute la famille SAIDI

A la personne qui n'a jamais cessé de croire en moi : HACHEROUF Abdellah et toute la famille HACHEROUF.

A mon binôme Hayat et toute sa famille.

A tous mes enseignants et mes Amis.

A mes chers regrettés : mon oncle AMROUN Abdellah ; ma tante Sadia et ma petite cousine Kenza

Lynda



SOMMAIRE

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

Partie I

Chapitre I : Fluorescence

I. Définition	3
II. Le fluorimètre.....	4
III. La spectroscopie de fluorescence.....	4
IV. Principe.....	5
V. Chronologie d'une émission de fluorescence	5
V.1 Absorption de la lumière UV-visible	6
V.2 Conversion interne.....	6
V.3 Emission.....	7
VI. Caractéristiques des fluorophores.....	7
VI.1 Absorption.....	8
VI.2 Coefficient d'extinction ϵ	8
VI.3 Emission.....	9
VI.4 La brillance.....	10
VI.5 Longueurs d'onde d'absorption et d'émission	10
VI.6 Déplacement de Stokes.....	11
VI.7 Temps de vie de fluorescence	11
VI.8 Stabilité.....	12
VI.9 Solubilité.....	12
VI.10 Accessibilité chimique.....	12
VII. Structure des Fluorophores organiques.....	13

VII.1 Les fluorophores polycycliques aromatiques carbonés.....	13
VII.2 Les quinolines.....	13
VII.3 Les indoles et les imidazoles.....	14
VII.4 Les Sondes nitrobenzoxadiazoles (NBD)	14
VII.5 Les coumarines.....	14
VII.6 Autres fluorophores excités dans l'UV.....	15
VII.6.1 La fluorescéine.....	15
VII.6.2 Les rhodamines.....	16
VII.6.3 Les sondes naphtoxanthènes.....	16
VII.6.4 Les oxazines.....	17
VII.6.5 L'acridine et ses dérivés.....	17
VIII. Facteur influençant la fluorescence	
VIII.1 La polarité de solvant.....	17
VIII.2 Le PH.....	18
VIII.3 Concentration ou agrégation.....	18
VIII.4 Température.....	19
VIII.5 Quenching.....	19
VIII.6 Influence de solvant sur le spectre d'émission.....	19
VIII.7 Déplacement de Stokes	19
VIII.8 Effet de la structure moléculaire sur la fluorescence	
a) Extension du système d'électrons π	20
b) Hydrocarbures aromatiques substitués.....	21
IX. Application de la fluorescence	21
Chapitre II : Synthèse bibliographique sur les coumarines et leurs application	
I. Introduction.....	23
II. Répartition botanique et localisation.....	24

III. Structure chimique et classification.....	24
III.1 Les coumarines Simples.....	24
III.2 Les coumarines complexes.....	25
IV. Caractérisation	26
V. Dosage.....	26
VI. Propriétés des coumarines	
VI.1 Propriétés physico-chimique.....	26
VI.2 Propriétés pharmacologique et toxicité.....	26
VII. Utilisation et domaines d'application des coumarines	
VII.1 Intérêt biologique et médicale.....	27
VII.2 Autres applications	27
VIII. Coumarines et fluorescence	27
IX. Intérêt des coumarines fluorescente en biologie.....	28
X. Conclusion.....	28

Partie II

Chapitre I : Synthèses de quelques coumarines par action des aldéhydes aromatiques 2-hydroxylés sur la 4- hydroxycoumarine

I. Action du 2-hydroxybenzaldéhyde sur la 4-hydroxycoumarine	29
II. Action de 2,4-dihydroxybenzaldéhyde sur la 4-hydroxycoumarine	30
III. Action de 2-hydroxy naphtaldéhyde sur la 4-hydroxy coumarine	31
IV. Action du 2,3-dihydroxybenzaldéhyde sur la 4-hydroxycoumarine	32
V. Etude en chromatographie sur couche mince	33
VI. Etude en spectroscopie Infra Rouge IR	34
VII. Mécanisme de la réaction	35
VIII. Calcul semi empirique MINDO/3 des ΔH_f et interprétation du mécanisme	36

Conclusion	39
Partie expérimentale	40
Chapitre II : Valorisation des coumarines par UV /vis et fluorescence	
I. Introduction.....	42
II. Expérimental	
II.1 Matériel.....	44
II.2 Appareillage	44
III. Effet de solvant sur les spectres électroniques d'absorption et d'émission de fluorescence des coumarines	
III.1 Spectre d'absorption UV/ visible.....	44
III.2 Influence des solvants sur les spectres d'émission en fluorescence	46
IV. Calcul des rendements quantiques de fluorescence.....	47
V. Estimation des moments dipolaires par la méthode solvatochromique_basée sur la polarité des solvants	49
VI. Estimation des moments dipolaires à l'état fondamental et excité.....	50
VII. Conclusion.....	56
Conclusion Générale.....	58
Bibliographie.....	59

Liste des abréviations

UV	Ultra Violet
IR	Infra Rouge
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
HPLC	Chromatographie en Phase Liquide à Haute performance
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
ADN	Acide Désoxyribose Nucléique
PET	Electron Photo Induit
H ₂ PC	phthalocyanine
ZnPC	Zinc phthalocyanine
Glu	Glucose
DMSO	Diméthylsulfoxyde
GFP	La protéine fluorescente verte (green fluorescent protéine)
EDANS	(5-((2 Aminoethyl) amino) naphtalène-1-sulfonic acide)
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
NBD	nitrobenzoxadiazole
DDAO	1, 3-dichloro-7-hydroxy-9,9-dimethyl-2(9H)
NADH	enzyme d'oxydation présente dans toutes les cellules vivants

INTRODUCTION GENERALE

Actuellement le phénomène de la fluorescence retient de plus en plus l'attention des chimistes. La synthèse de nouveaux composés organiques fluorescents occupe une place de choix dans les laboratoires de synthèse grâce à de leur importante activité potentielle dans l'environnement et dans les champs bio-analytiques. Parmi les matières fluorescentes, un grand nombre appartient à la classe des composés hétérocycliques.

Beaucoup de dérivés de la coumarine appartiennent à des classes thérapeutiques diverses, d'autres sont utilisés comme sondes fluorescentes dans de nombreux domaines (physique, chimie, biochimie, environnement, industrie pharmaceutique). L'importance de ces applications nous a incité à entreprendre la synthèse et l'étude de la réaction de tranlactonisation de quatre dérivés de la 4-hydroxycoumarine afin de mettre au point une stratégie de synthèse. Pour toutes les étapes de cette étude nous avons cherché à travailler selon les principes de la « chimie verte ». Ainsi pour la partie nomenclature, structure, propriétés et même réactivité nous avons fait appel à l'ensemble des techniques basiques de la chimie théorique mis à notre disposition. L'apport de ces techniques et en particulier leur capacité de prédictions nous ont permis un gain de temps appréciable et une économie de réactifs et de solvants non négligeable. Ainsi les coumarines jugées non adaptées à la réaction recherchée ont pu être éliminées du pool de l'expérience ce qui a contribué à la limitation des expériences inutiles. Toutes les études préliminaires ont été effectuées dans le but d'optimiser la réaction de tranlactonisation ainsi que les conditions opératoires meilleures.

Les travaux réalisés dans ce mémoire ont eu comme objectif de développer les méthodes optiques pour des études en biologie avec comme point de départ la synthèse chimique de sondes fluorescentes.

Ce travail est constitué de deux parties :

La première partie est consacrée à une étude bibliographique sur la technique de fluorescence et sur quelques coumarines d'applications connues dans le domaine médical et pharmaceutique et à l'étude de quelques coumarines comme fluorophores.

Introduction générale

La deuxième partie est consacrée à la synthèse de quatre coumarines et à une valorisation par UV-visible et fluorescence par la technique solvathochromique basée sur la polarité des solvants.

Fluorescence

I. Définition:

La fluorescence est la propriété que possèdent certaines molécules d'absorber la lumière à certaines longueurs d'ondes (c'est à dire correspondant à une certaine couleur) et de réémettre une lumière à une autre longueur d'onde. Ces molécules, à l'état fondamentale (niveau d'énergie E_0) ont la propriété d'absorber 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 original 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 : $E = h c/\lambda$

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 fluoescéine 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).

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 le solvant.

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 S_1 à l'état fondamental S_0 se fait avec libération d'un photon d'énergie inférieure E_1 donc de longueur d'onde supérieure à celui qui a été absorbé ($\lambda_1 > \lambda_2$)

IV. Principe

La fluorescence est un phénomène physique dans lequel une molécule absorbe de l'énergie E_2 provenant d'une source lumineuse (laser, lampe à vapeur de mercure...). Il y a ainsi passage d'un état fondamental S_0 à un état excité S_2 avec changement d'orbitale des électrons. Cet état excité S_2 a une durée de vie très courte.

Des changements conformationnels font passer la molécule de l'état excité S_2 à un état excité plus stable S_1 : c'est la conversion interne (CI).

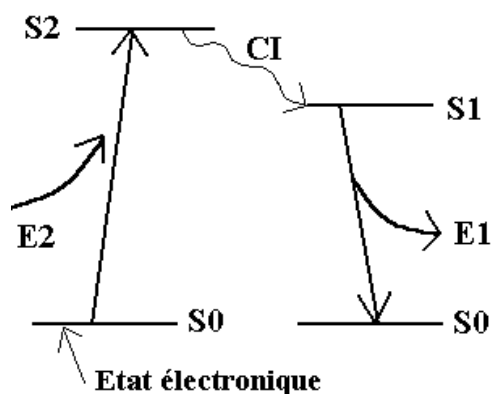


Figure 1 : Diagramme d'énergie.

V. Chronologie d'une émission de fluorescence :

Le phénomène de fluorescence peut être représenté par un diagramme de Jablonski (figure 2), qui représente les états d'excitations électroniques d'une molécule, les états singulets 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

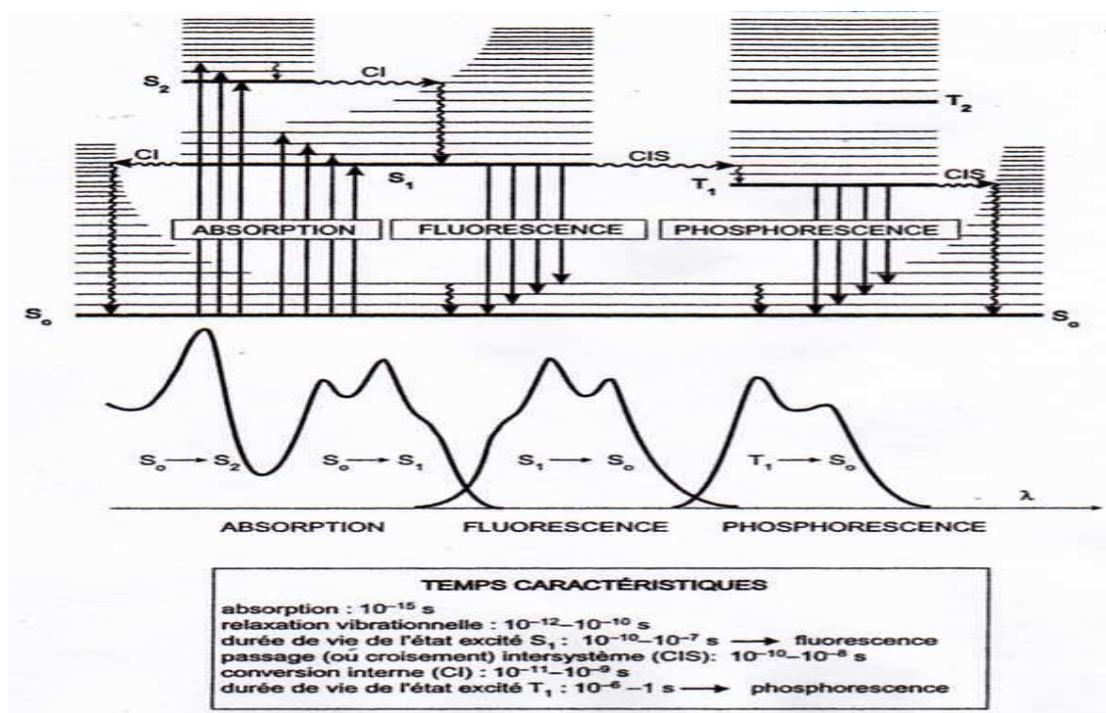


Figure 2 : diagramme de Perin-Jablonski et illustration de la position relative des spectres d'absorption, de fluorescence et de phosphorescence^[36]

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 fondamentale 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_1V_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 ^[1].

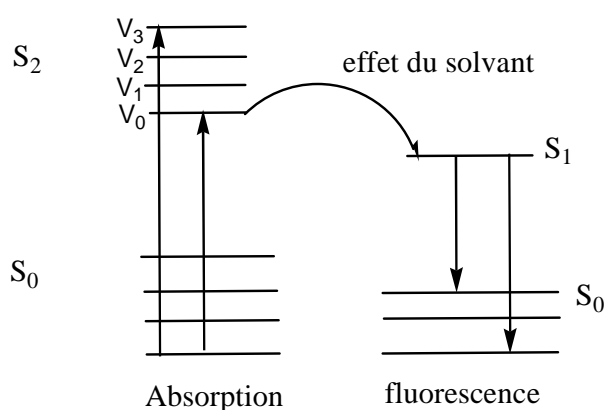


Figure 3 : Effet du solvant. La perte d'énergie due à la réorientation des moments dipolaires du fluorophore et des molécules de solvant induit une relaxation des états d'énergie

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 ^[2]. 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 consécutivement à l'absorption d'un photon de longueur d'onde λ' . Les fluorophores les plus utilisés comme marqueurs de protéines sont les protéines fluorescentes,

dérivées de la **GFP** (protéine fluorescente verte) et les fluorophores organiques de petite taille. Ces composés sont caractérisés par différentes paramètres.

VI.1. Absorption

La première caractéristique d'un fluorophore est sa capacité à absorber un photon incident, afin d'atteindre son état excité. L'efficacité de l'absorption de lumière est déterminée par le coefficient d'extinction molaire ϵ du composé. Ce coefficient est déterminé à une longueur d'onde donnée et permet de comparer l'efficacité d'absorption de plusieurs fluorophores. Il est généralement donné à la longueur d'onde maximale d'absorption du fluorophore.

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

Il relie la quantité de lumière absorbée, pour une longueur d'onde donnée 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 :

$$A(\lambda) = \log \frac{I_{\lambda}^o}{I_{\lambda}} = \epsilon(\lambda).l.c \quad (A.1)$$

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. En théorie classique, l'absorption de la lumière peut être décrite en considérant la molécule comme un dipôle oscillant, ce qui conduit à introduire une quantité appelée force d'oscillateur qui est directement reliée à l'intégrale de la bande d'absorption de la façon suivante :

$$f = \frac{mc_0}{N_A e^2 n \pi} \int \epsilon(\bar{\nu}) d(\bar{\nu}) = \frac{4.32 \times 10^{-9}}{n} \int \epsilon(\bar{\nu}) d(\bar{\nu}) \quad (A.2)$$

Où m et e sont respectivement la masse et la charge de l'électron, c_0 la vitesse de la lumière (3×10^8 m/s), n l'indice de réfraction, $\bar{\nu}$ est le nombre d'onde (en cm^{-1}), et N_A est le nombre d'Avogadro (en mol^{-1}), f est une quantité sans dimension et les valeurs de f sont normalisées de sorte que la valeur maximum soit 1. Pour des transitions $n-\pi^*$, les valeurs de ϵ sont de l'ordre de quelques centaines ou moins, et les valeurs de f ne dépasse pas 10^{-3} environ. Pour les transitions $\pi - \pi^*$, les valeurs de ϵ et f sont en principe beaucoup plus grande (excepté pour

les transitions interdites pour des raisons de symétrie). Pour certains composés, f est voisin de 1 ce qui correspond à des valeurs de ϵ de l'ordre de 10^5 . Le tableau VI-1 donne des exemples de valeurs de ϵ .

Tableau VI-1 Exemples de coefficients d'absorption molaires (à la longueur d'onde correspondant au maximum de la bande de plus basse énergie). Puisque les valeurs de ϵ dépendent de très faiblement des solvants du solvant, seule une valeur approximative est donnée ici.

Composé	$\epsilon/M^{-1} \text{ cm}^{-1}$	Composé	$\epsilon/ M^{-1} \text{ cm}^{-1}$
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		

VI.3. Emission

La deuxième caractéristique d'un fluorophore est d'émettre un photon de manière efficace. L'émission d'un composé est caractérisée par une longueur d'onde maximale d'émission, notée λ_{em} et le rendement quantique de fluorescence Φ_f , calculé de la manière suivante :

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

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 le composé de référence, dont on connaît la valeur du rendement quantique (le sulfate de quinine est souvent utilisé). Pour cela, on mesure, pour l'inconnu X et la référence S, l'absorbance A_X et A_S pour une longueur d'onde donnée, ainsi que l'aire F_X et F_R pour les deux solutions par intégration de la bande d'émission obtenue. On obtient alors :

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

Où

A= 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 « R » 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 (Γ , NO_3^- , Ce^{3+} 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. La brillance

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

$$B = \epsilon \cdot \Phi_f$$

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 du marquage fluorescent. Il est généralement reconnu qu'une brillance de $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 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

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 a fortiori un organe ou un organisme entier, possède nativement de nombreux composés endogènes, dont un certain nombre sont des fluorophores. Trois acides aminés, le tryptophane et, 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 $800\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ environ) [3].

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

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 présentent 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.

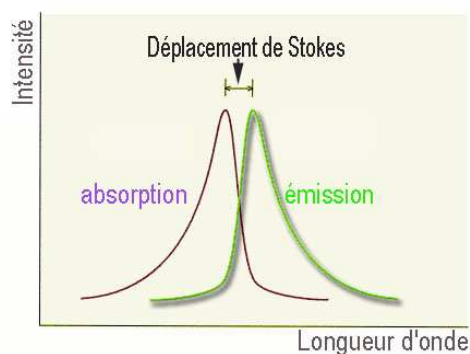


Figure 4 : déplacement de stokes

VI.7. Temps de vie de fluorescence

Temps 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 :

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

$I(t)$ = 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 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 reliées 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. Structures des fluorophores organiques

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

VII.1. Fluorophores polycycliques aromatiques carbonés :

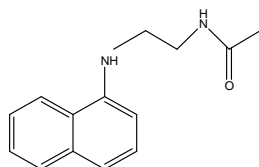


Figure 5. EDANS

Une catégorie classique de marqueurs de biomolécules regroupe les dérivés du naphthalène cette famille comprend l'acide 5-(diméthylamino) naphthalène-1-sulfonique (dansyl) ^[7], ainsi que ses dérivés ^[8,9]. Ces composés présentent une $\lambda_{(ex)}$ d'environ 335 nm, $\lambda_{(em)}$ 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 ^[10].

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 $32000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ^[11,12]

Des dérivés de l'anthracène ont également été synthétisés et utilisés pour la détection d'anion comme les pyrophosphates ^[13]. Des structures issues du pérylène ont montré de hauts rendements quantiques en solvants organiques ^[14], mais leur utilisation semble limitée en solution aqueuse ^[15].

VII.2. Les quinolines :

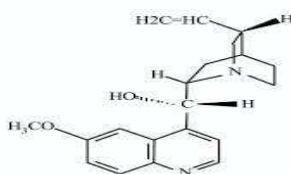


Figure 6. Quinine

Le composé chef de cette classe est la quinine, fluorophore historique qui est toujours utilisé comme standard de fluorescence ^[16,17].

VII.3. Les indoles et les imidazoles :

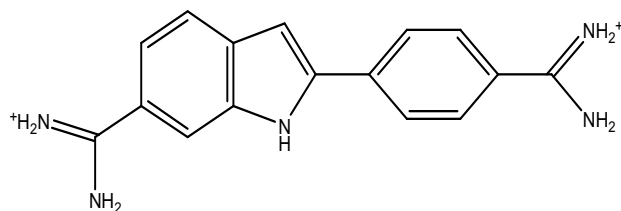


Figure 7.DAPI

VII.4. Les Sondes nitrobenzoxadiazoles (NBD) :

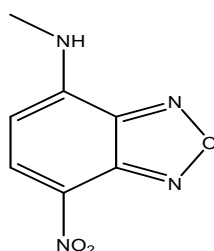


Figure 8. NBD.

VII.5. Les coumarines

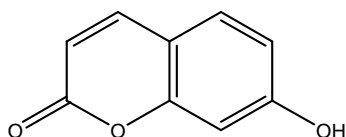


Figure 9. 7-hydroxycoumarine

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 ^[18]. 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 facile à substituées afin de fonctionnaliser le fluorophore par différents groupements réactifs ^[12]. Les propriétés spectrales des dérivés 7-aminocoumarines peuvent être modulées par différentes substitutions de l'atome d'azote ^[19] 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 ^[20].

VII.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 ^[12,21], sont utilisés comme marqueurs fluorescents. Le cascade yellow présente un déplacement de Stokes de 149 nm ($\lambda_{\text{ex}}=409\text{nm}$ et $\lambda_{\text{em}}=558 \text{ nm}$) ainsi une brillance de $13000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

VII.6.1. La fluorescéine

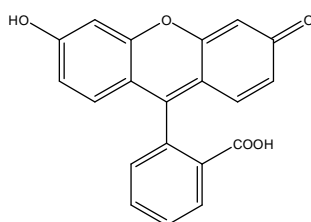


Figure10. Fluorescéine

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 : $\lambda_{\text{ex}}=490 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}}=514 \text{ nm}$ et affichant une excellente brillance de $88000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ^[1,12].

La sensibilité de la fluorescéine aux variations de pH a permis le développement d'indicateurs de pH.

VII.6.2. Les Rhodamines

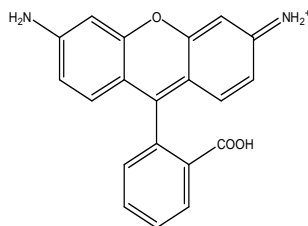


Figure11. Rhodamine 110

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 fluorecéine ($\lambda_{\text{ex}}=496 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}}=517 \text{ nm}$; brillance de $68000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ en solution aqueuse) [22].

VII.6.3. Les sondes naphtoxanthènes

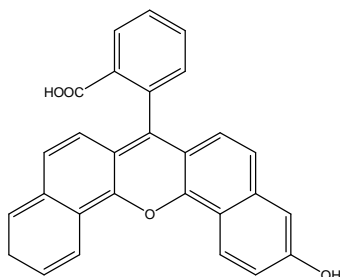


Figure 12. Naphtofluorescéine

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. En contrepartie, son pKa augmente à 8, soit un log au dessus du pH physiologique et sa brillance diminue de façon dramatique ($6000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [23].

VII.6.4 Les oxazines

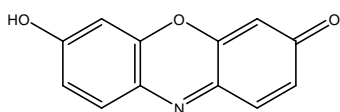


Figure13. Résorufine.

VII.6.5 Acridine et ses dérivés

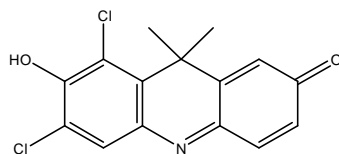


Figure14. Fluorophore DDAO

VIII. Facteurs influençant sur le spectre d'émission

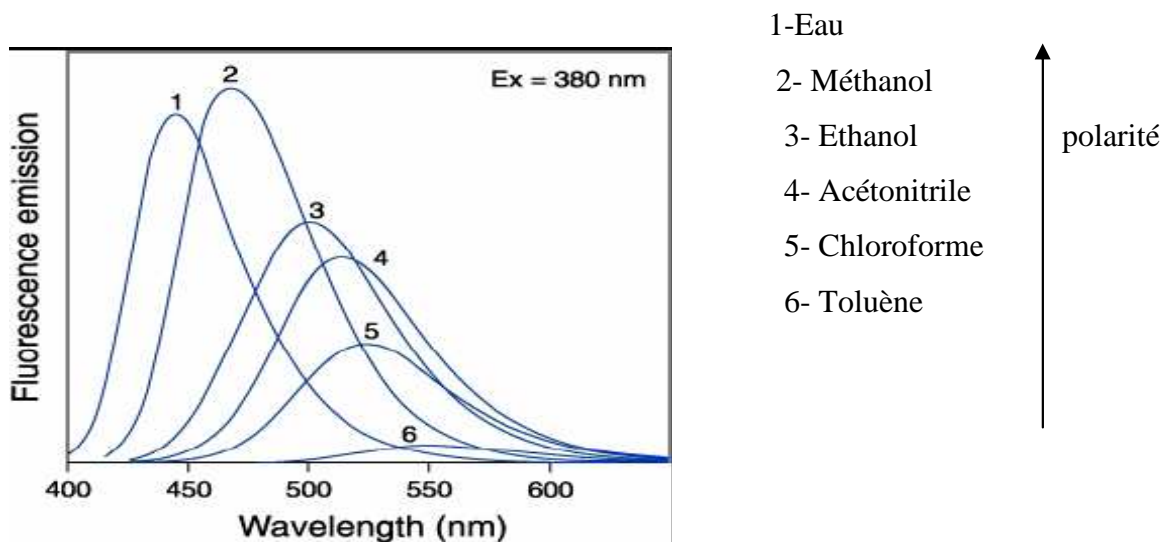
Les différentes caractéristiques de l'émission de fluorescence : spectre, polarisation, rendement quantique et durée de vie de fluorescence ne constituent la signature d'une molécule que sous certaines conditions. En effet, ces paramètres dépendent fortement de l'environnement de la molécule.

Le spectre de fluorescence d'un fluorochrome dépendra de son environnement physico-chimique.

VIII.1. 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. Les interactions solvant/état excité diminuent l'énergie de l'état excité, cet effet augmente avec la polarité du solvant :

La polarité du solvant influence beaucoup l'émission des molécules polaires, mais peu celle des molécules non polaires.



Exemple d'émission de fluorescence du 6-bromoacétyl-2-diméthylamino naphthalène

Quand la polarité augmente, l'intensité augmente et la longueur d'onde d'émission diminue.

VIII.2. Le pH

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.

VIII.3. 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.

VIII.4. 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.

VIII.5. Quenching

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, l'énergie électronique sera convertie en énergie cinétique et de vibrations, c'est le quenching dynamique. Le quenching statique est observé lors de la formation de complexes non fluorescents. Dans les deux cas, la valeur du rendement quantique va décroître et la fluorescence sera faible.

VIII.6. Influence du solvant sur le spectre d'émission

Le moment dipolaire d'une molécule à l'état excité est supérieur à celui de la molécule à l'état fondamental.

Lorsque la polarité du solvant augmente, l'énergie de l'émission diminue donc la longueur d'onde de l'émission augmente.

La polarité du solvant influe plus l'émission des molécules polaires.

VIII.7. Déplacement de Stokes

Le déplacement de Stokes est l'écart entre la position du maximum de la première bande d'absorption et celle du maximum du spectre de fluorescence (exprimées en nombres d'ondes),

$$\Delta \bar{\nu} = \bar{\nu}_{ab} - \bar{\nu}_{em}$$

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.

VIII.8. Effet de la structure moléculaire sur la fluorescence

A/ Extension du système d'électrons π . Nature de la transition de plus basse énergie

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.

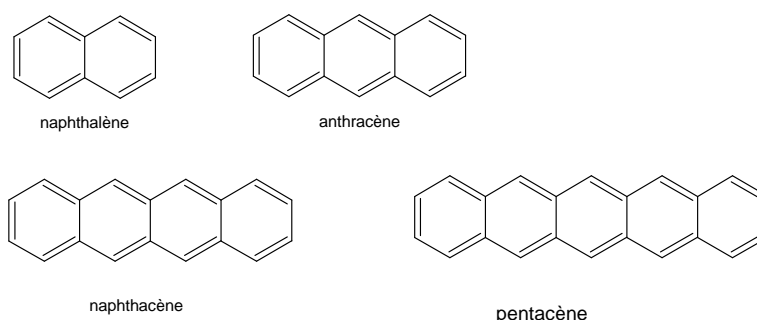


Figure : quelques substituant qui augmentent le système π

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.

*La nature ainsi que la position du substituant des hydrocarbures aromatiques peut modifier ces caractéristiques. 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.

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

IX- 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 de composés organiques dans tout milieu transparent (solutions, films,...) et sous conditions 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:

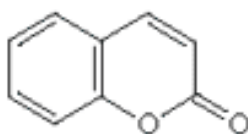
- lasers à colorants,
- Capteurs optiques chimiques, biocapteurs optiques (optodes),
- lampes fluorescentes,
- marquage de sécurité de documents (ex : billets de banque),
- azurants optiques,
- contrôle non destructif,
- hydrologie,
- criminologie,
- décoration, spectrale, ...etc.

Synthèse bibliographique sur les Coumarines et leurs applications

I. Introduction :

La **coumarine** est une substance naturelle organique aromatique connue dans la nomenclature internationale comme 2H-1-benzopyran-2-one qui peut être considérée en première approximation, comme une lactone de l'acide 2-hydroxy-Z-cinnamique. Son odeur de foin fraîchement coupé a attiré l'attention des parfumeurs sur elle dès le XIX^e siècle.

Les coumarines existent sous plusieurs structures différentes. Ils constituent une classe importante d'agents pharmacologiques possédant une gamme de différentes activités physiologiques, elles font objet de la recherche intense dont la possibilité que cette classe de molécules pourrait être une source de médicaments pour le traitement de plusieurs maladies.



Structure générale de la coumarine

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)^[24]. 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...^[24].

La coumarine est stockée dans la plante sous la forme de glucoside de l'acide coumarinique qui se transforme en coumarine sous l'action d'enzymes ou du soleil^[25]. Elles sont formées dans les feuilles et s'accumulent surtout dans les racines et les écorces, ainsi que dans les tissus âgés ou lésés^[25].

II. Répartition botanique et localisation

Les coumarines sont surtout présentes chez les Dicotylédones et abondantes dans certaines familles : Rutaceae, Fabaceae, Apiaceae, Oléaceae, Loganiaceae, Solanaceae, Asteraceae et Hippocastanaceae ^[25].

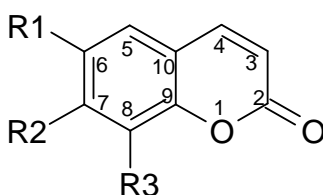
III. Structure chimique et classification

Ces constituants possèdent une ou plusieurs fonctions phénoliques, étherifiées ou non (à l'exception de la coumarine proprement dite) ; c'est pourquoi on les rattache souvent aux polyphénols. On les divise en :

Coumarines simples et Coumarines complexes où un noyau furanne ou pyranne est associé au noyau benzopyran-2-one ^[26].

III.1. Les coumarines simples

Les coumarines les plus répandues dans le règne végétal possèdent des substitutions (OH ou OCH₃) en 6 et 7 ^[25]. Exemples :



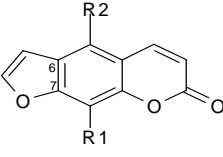
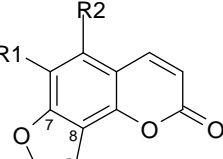
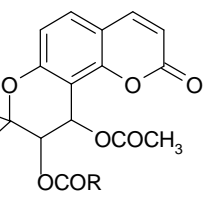
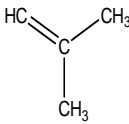
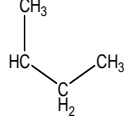
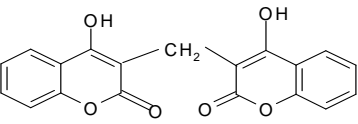
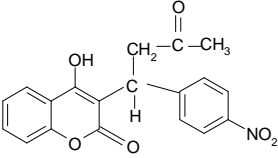
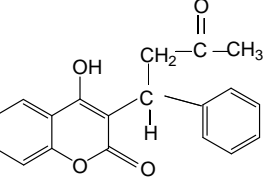
Les génines

Coumarines	R1	R2	R3
Ombelliféronne	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 (=Esculine)	O-Glu	OH	H
Cichorioside(=Cichorine)	OH	O-Glu	H
Scopoloside(=Scopoline)	OCH ₃	O-Glu	H
Fraxoside	OCH ₃	O-Glu	OH

III.2. Les coumarines complexes :On distingue ^[25] :

Coumarines	dérivé	R1	R2	Nom
Furocoumarines ou furanocoumarines	6,7-furocoumarines (linéaires)	H	H	psoralène
		H	OCH ₃	bergaptène
		OCH ₃	H	xanthotoxine
		OCH ₂ -CH=(CH ₃) ₂	H	impératorine
		7,8-furocoumarines (angulaires)	H	H
		OCH ₃	OCH ₃	pimpinelline
pyrannocoumarines				Samidine
		R=		
		R=		Visnadine
Antivitamines K				
	Le Dicoumarol	Acénocoumarol SINTROM ^R		
		la Warfarine		

IV. Caractérisation

- Les coumarines ont un spectre UV caractéristique modifié en milieu alcalin.
- En CCM la coloration des taches des coumarines est exaltée en présence d'ammoniac. ^[25]

V. Dosage

Le dosage des coumarines peut être réalisé par la Spectrofluorométrie, par la spectrophotométrie UV/vis et par l'HPLC.

VI. propriétés des coumarines

VI.1. Propriétés physico-chimiques

- Les coumarines sont des solides cristallisés blancs ou jaunâtres de saveur généralement amère ; certaines sont sublimables.
- Les hétérosides sont assez solubles dans l'eau et solubles dans l'alcool.
- Les génines sont solubles dans l'alcool et les solvants organiques
- Les coumarines hydroxylées possèdent une intense fluorescence bleue en lumière ultraviolette. Leur spectre U.V est également caractéristique et sert à leur identification.
- Les propriétés chimiques sont principalement dues à la fonction lactone insaturée, notamment l'ouverture de l'anneau lactonique en milieu alcalin.
- Avec les sels de plomb, on obtient des combinaisons insolubles.

VI.2. Propriétés pharmacologiques et toxicité des coumarines

Les coumarines augmentent la résistance et diminuent la perméabilité des veines et des capillaires (propriété vitamine P). Les coumarines complexes sont surtout responsables d'accidents photosensibilisants. Cela se présente parfois par une hyper-pigmentation de la peau.

La coumarine n'est pas cancérigène aux doses habituelles dans la nourriture (0,25%). Cependant on a trouvé une toxicité hépatique et des tumeurs chez le rat à 100 mg / kg / jour et une toxicité pulmonaire et des tumeurs chez la souris à 200 mg / kg / jour et ceci a entraîné son interdiction dans les aliments. On n'observe aucun effet à des doses inférieures. Les études sont compliquées par le fait que le métabolisme est différent selon les espèces animales et même selon les doses pour une espèce donnée. Les doses les plus faibles sont encore environ 100 fois supérieures à celles qui sont utilisées en parfumerie où l'on peut

considérer la coumarine comme sans danger. Elle est cependant interdite dans les rouges à lèvres ^[24].

Les dérivés coumariniques ayant des propriétés anticoagulantes, sont toxiques par ingestion et contact. Le port des gants au cours de la manipulation est fortement recommandé et le port des lunettes de protection est obligatoire pendant toute la présence au laboratoire.

VII. Utilisation et domaines d'application des coumarines

VII.1. Intérêt biologique et médicale des coumarines

Les coumarines qui sont des composés phénoliques avec une structure commune de 2-H-benzopyran-2-one possèdent des activités biologiques multiples, telles que l'anti-inflammatoire, anticoagulant, antibactérien, antifongique, antiviral, anticancéreux, antihypertenseur, antituberculeux, anticonvulsivant, anti-hyperglycémiant, antioxydant, des propriétés neuroprotectrices, et anti- VIH (virus de l'immunodéficience humaine) ^[27].

VII.2. Autres applications

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

Ils augmentent le nombre de mélanocytes et accroissent la production de mélanine par ceux-ci ; c'est à ce titre qu'ils assurent une meilleure protection contre les radiations UV ^[25].

Aujourd'hui, la coumarine entre dans environ 90% des compositions et, à une concentration supérieure à 1%, dans 60% des compositions. Ce succès est dû à la capacité de la coumarine à s'associer avec d'autres produits.

VIII. Coumarines et fluorescence

Il a été montré que de nouvelles sondes dérivées de la coumarine sont utiles à l'imagerie médicale ^[28]. Les aminocoumarines ont été conçues pour les ions des métaux lourds comme : Zn^{+2} , Mg^{+2} , Hg^{2+} et le Co^{+2} , la quantification est basée sur le mécanisme de transfert d'électrons photo-induit (PET). Ces sondes détectent sélectivement et de manière sensible ces ions en solution aqueuse avec une large plage de pH et une grande augmentation de la fluorescence (13 fois) a été observée ^[28].

Des études récentes rapportent de nouveaux ligands comme le : 6-hydroxy-3-[p-(3',4'-dicyanophénoxy) phényle] coumarine, et son fluorescent phtalocyanine tétra substituée {M [PC (OBzCou)₄], M = 2H, Zn (II), Co (II); Bz : benzène}. En effet; l'effet du dérivé de

coumarine, sur l'intensité des spectres de fluorescence de la phtalocyanine, exempte de métal (H₂PC) et des dérivés du zinc (ZnPC) a été étudiée au moyen de la spectroscopie de fluorescence à l'état stationnaire ^[29].

IX. Intérêt des coumarines fluorescentes en Biologie ^[27]

- 1- Localisation subcellulaire de lipides et de protéines (*ex vivo*)
- 2- Etude dynamique du trafic intracellulaire
- 3- Etude des interactions moléculaires
- 4- Etude de la viscosité membranaire
- 5- Etude du repliement d'une protéine (dénaturation / renaturation)
- 6- Etude du Séquençage de l'ADN
- 7-Analyse génétique par hybridation *in situ*

X. Conclusion

Ces propriétés porteront sur les progrès récents dans la synthèse et les mécanismes moléculaires et cellulaires de l'action de la coumarine impliqués dans la relation entre la structure et l'activité. Ces succès sont dus aux capacités des coumarines à s'associer avec d'autres produits.

Synthèse de quelques coumarines par action des aldéhydes aromatiques 2-hydroxylés sur la 4-hydroxycoumarine

Les coumarines occupent une importante classe des produits naturels et synthétiques qui manifestent des propriétés variées. Elles sont utilisées comme marqueurs fluorescents en biochimie, Leur application dans de nombreux domaines de la médecine humaine, animale et phytochimie a permis le développement d'une recherche intense utilisant comme structure de base la 4-hydroxycoumarine. Dans notre travail nous avons réalisé quelques réactions de condensation des aldéhydes aromatiques avec la 4-hydroxycoumarine.

La condensation des aldéhydes aromatiques vis-à-vis de la 4-hydroxy coumarine a fait l'objet de nombreux travaux dans la littérature [30, 31, 32, 33]. Ces auteurs montrent que la 4-hydroxycoumarine réagit avec les aldéhydes aromatiques α -hydroxylé par une translactonisation intramoléculaire [34], seuls trois aldéhydes aromatiques sont déjà étudiés à ce jour. Nous avons repris ces réactions par la voie de synthèse par chauffage à reflux avec une étude spectroscopique dans le but d'une part de confirmer la structure du produit qui se forme dans un solvant apolaire aprotique en présence d'une amine tertiaire (toluène) et dans un solvant polaire protique (éthanol) et d'autre part comparer le rendement du produit obtenu.

I. Action du 2-hydroxybenzaldéhyde sur la 4-hydroxycoumarine

La condensation du salicylaldéhyde **2a** sur la 4-hydroxycoumarine **1** décrite dans la littérature par W.R. Sullivan [31] au reflux de l'éthanol, montre que cette dernière conduit à la formation du produit **A**, dont il donne seulement l'analyse élémentaire et les résultats sont aussi comparables avec **3b**.

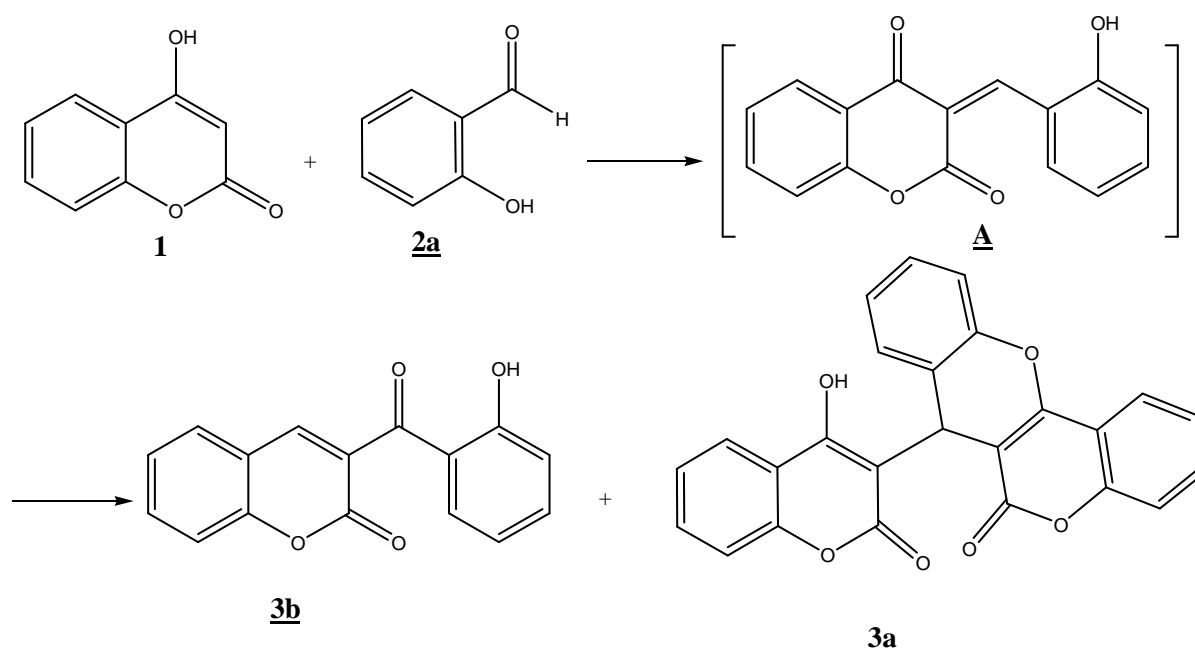
Cette réaction a été reprise en 1984 par P. de March et al [35] en réalisant la spectrométrie de masse, RMN du proton et RMN du carbone-13, ce dernier exclu la structure **A** par apparition des pics caractéristiques de la structure **3b** et en 1987 J. Cervello et al [30] en réalisant le spectre RMN du proton et du carbone-13 ainsi que l'effet NOE montre que le produit **A** n'est qu'un intermédiaire.

Plus récemment, cette réaction a été reprise par M. MAKHLOUFI et al [36] au reflux du toluène et en présence d'un catalyseur basique où les auteurs ont confirmé la formation du composé **3b**.

Nous avons entrepris cette réaction dans les deux solvants, au reflux de l'éthanol ou du toluène en présence d'un catalyseur basique la triéthylamine, et après 90 mn de reflux, nous avons séparé dans chaque solvant deux produits dont un est séparé à chaud et lavé avec du méthanol chaud **3a**, et l'autre après refroidissement de la phase méthanolique **3b**.

Nous avons remarqué que la quantité de **3a** est beaucoup plus élevée que celle de **3b** dans le toluène et inversement dans l'éthanol.

La pureté des produits est confirmée par la chromatographie sur couche mince CCM). Une étude spectroscopique en IR et UV/Visible est faite pour ces produits à fin de déterminer leurs structures exactes.



II. Action de 2,4-dihydroxybenzaldéhyde sur la 4-hydroxycoumarine

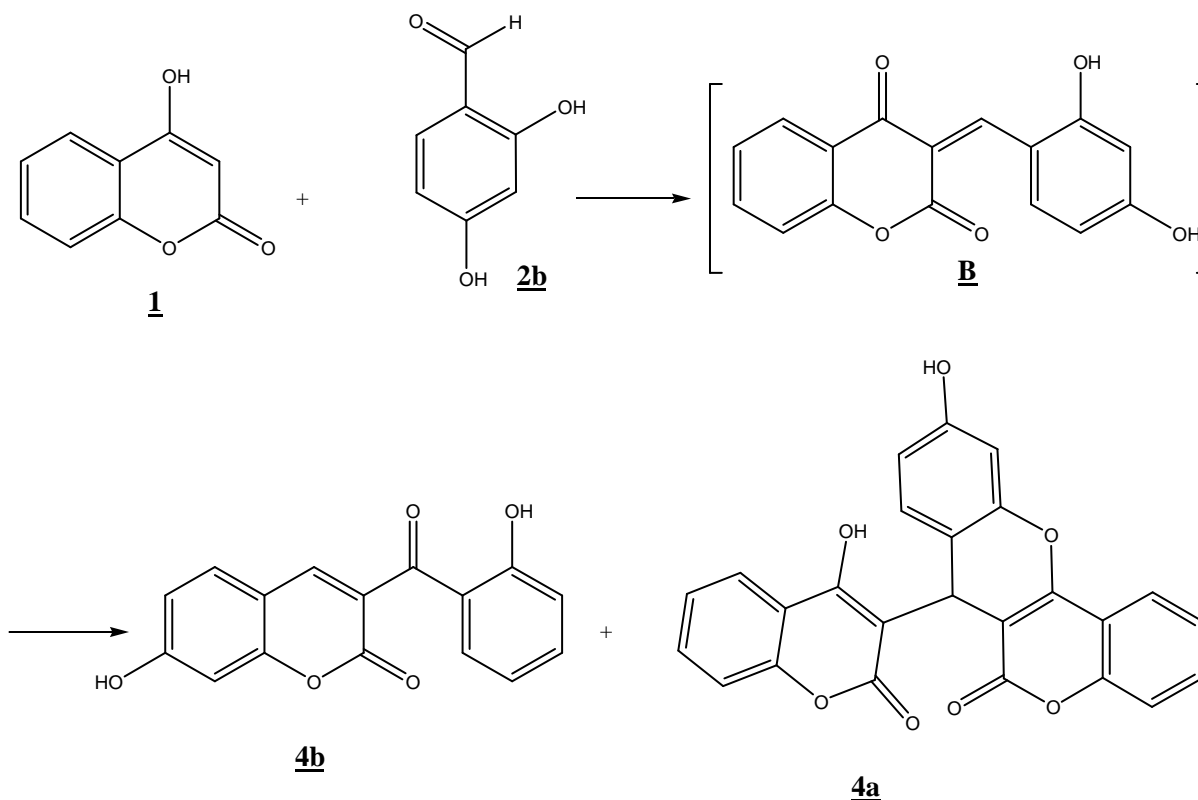
La condensation de 2,4-dihydroxybenzaldéhyde **2b** vis-à-vis de la 4-hydroxycoumarine **1** est décrite dans la littérature avec des analyses incomplètes ^[31], ces auteurs montrent que la réaction aboutit à la formation du produit **B**.

Cette réaction a été reprise en 2008 par M. Makhloufi et al ^[36] en réalisant la spectrométrie de masse, RMN du proton et RMN du carbone-13, ce dernier exclu la structure **B** par apparition des pics caractéristiques de la structure **4b** et montre que le produit **B** n'est qu'un intermédiaire.

Nous avons entrepris cette réaction par les mêmes méthodes citées précédemment, dans l'éthanol et dans le toluène, nous avons séparé dans chaque solvant deux produits dont

un est séparé à chaud et lavé avec du méthanol chaud **4a**, et l'autre après refroidissement de la phase méthanolique **4b**.

Comme dans le cas du salicylaldéhyde, nous avons obtenu plus de quantité de **4a** que de **4b** dans le toluène et inversement dans l'éthanol.

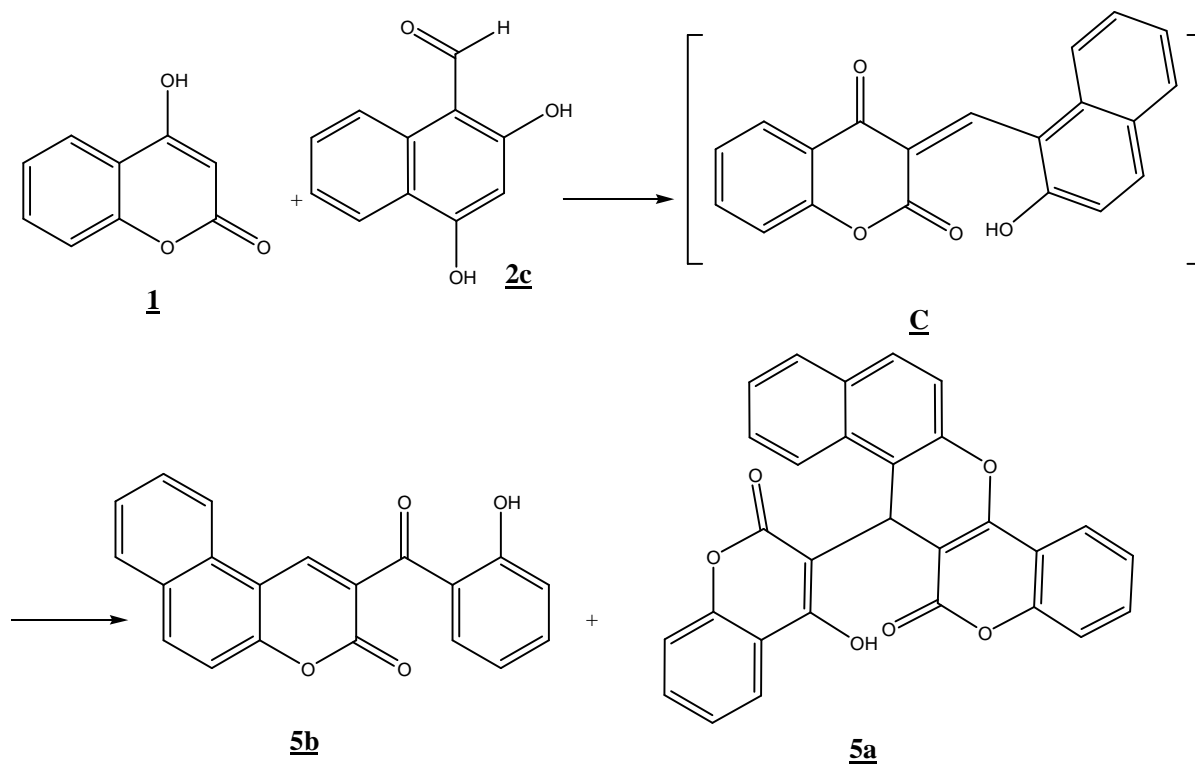


III. Action de 2-hydroxy naphthalaldéhyde sur la 4-hydroxy coumarine

L'action du 2-hydroxy naphthalaldéhyde **2c** vis-à-vis de la 4-hydroxycoumarine **1** est décrite dans la littérature ^[36] par la méthode de chauffage au reflux du toluène et en présence de la triéthylamine. Ces auteurs ont montré que la réaction conduit à la formation du composé **5b** en passant par l'intermédiaire **C** qui n'est pas isolé.

Nous avons entrepris cette réaction par les mêmes méthodes citées précédemment, dans l'éthanol et dans le toluène, nous avons séparé dans chaque solvant deux produits dont un est séparé à chaud et lavé avec du méthanol chaud **5a**, et l'autre après refroidissement de la phase méthanolique **5b**.

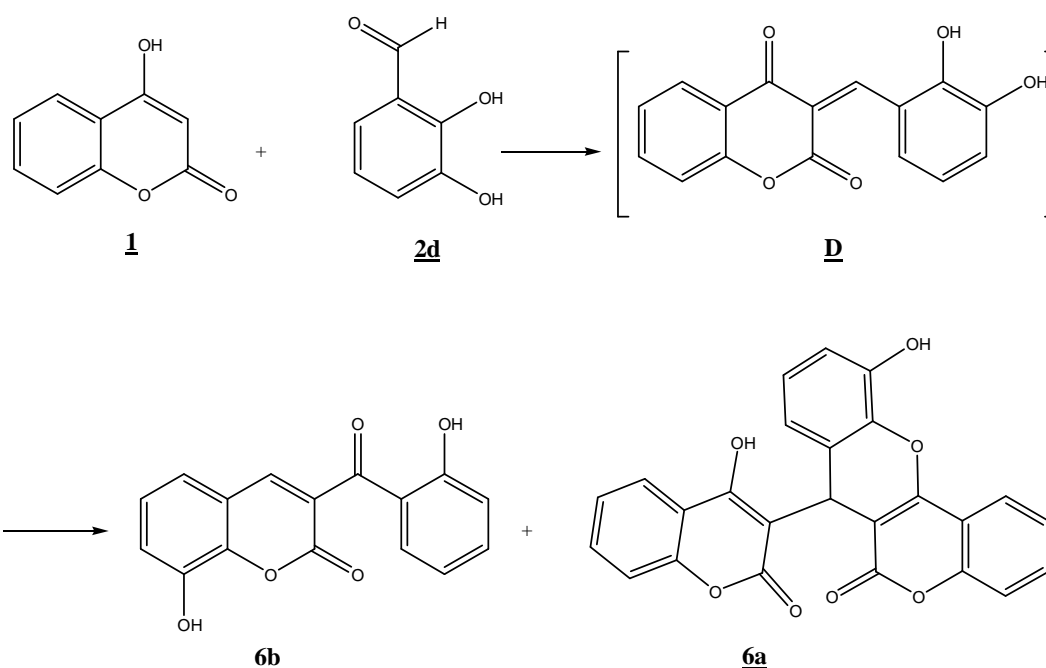
Contrairement aux deux cas précédents, dans ce cas la quantité du composé **5b** est plus importante par rapport à celle de **5a**, aussi bien dans l'éthanol que dans le toluène.



IV. Action du 2,3-dihydroxybenzaldéhyde sur la 4-hydroxycoumarine :

Parmi les réactions de condensation des aldéhydes aromatiques sur la 4-hydroxycoumarine de la littérature, nous n'avons pas relevé celle qui décrit l'action de 2,3-dihydroxybenzaldéhyde.

Dans les mêmes conditions opératoires que les produits précédents et par les différentes voies de synthèse, nous avons isolé deux produits **6a** et **6b**.



V. Etude en chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse. Elle s'applique aux molécules pures, aux extraits (mélange complexes de métabolites) et aux échantillons biologiques. La phase stationnaire est constituée d'une couche mince et uniforme de 0,25mm d'épaisseur, d'une substance séchée et finement pulvérisée, appliquée sur un support approprié ; dans notre cas, nous avons utilisé des plaques de gel de silice 60 F254 (phase normale) prêtent à l'emploi à support en aluminium, La phase mobile ou éluant (généralement un mélange binaire ou ternaire de solvant) migre à la surface de la plaque par capillarité.

La CCM n'est pas suffisante pour identifier un produit mais elle apporte des renseignements susceptibles d'orienter vers une hypothèse de structures, Par exemple: fluorescence, coloration, Rapport frontal (Rf).

L'étude en chromatographie sur couche mince (CCM) a été réalisée dans un éluant constitué d'un mélange de solvants chloroforme-méthanol. Nous avons obtenus une seule tache différente de celle du produit de départ dont le Rf obtenu est donnée par la relation suivante :

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par le composé}}{\text{Distance parcourue par le solvant}}$$

Les produits obtenus que ce soit dans l'éthanol ou dans le toluène présentent le même R_f .

VI. Etude en spectroscopie Infra Rouge IR

La spectroscopie infrarouge est une classe de spectroscopie qui traite de la région infrarouge du spectre électromagnétique. Elle recouvre une large gamme de techniques, la plus commune étant un type de spectroscopie d'absorption, elle peut être employée pour l'identification de composés ou pour déterminer la composition d'un échantillon. Une table de corrélation de spectroscopie infrarouge présente dans la littérature scientifique ^[37] est utilisée pour déterminer les bandes caractéristiques

Les spectres IR sont réalisés dans un appareil de type BOKER et sans utilisation du KBr. Les bandes principales enregistrées dans chaque cas sont données dans le tableau I-1 suivant :

Tableau I-1: Résultats des spectres IR enregistrés

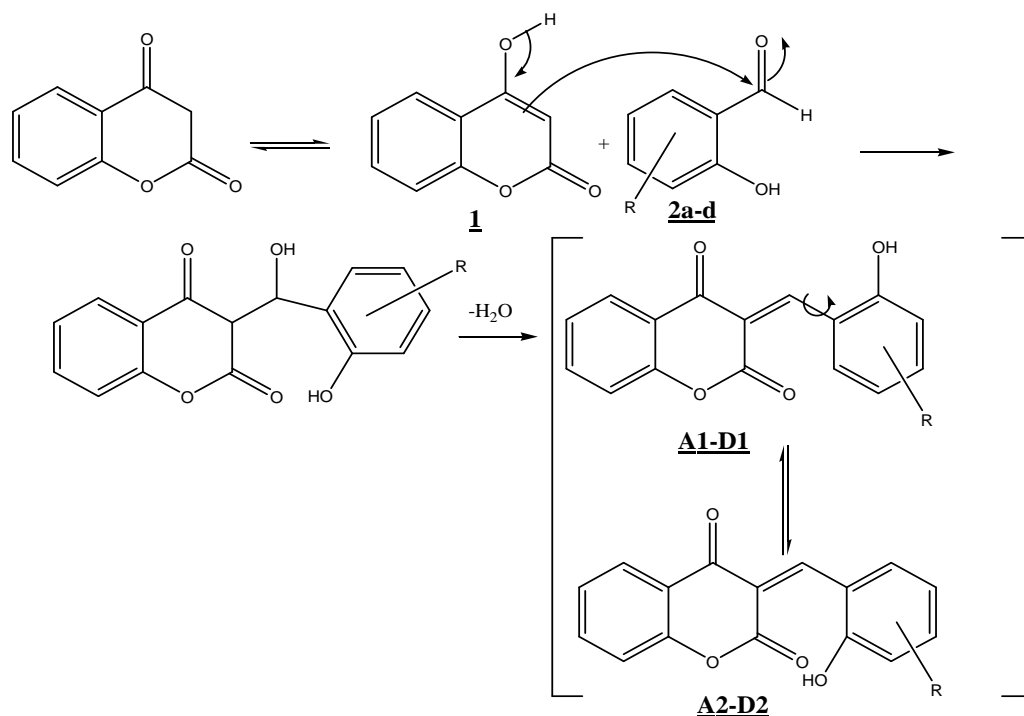
N° du composé	ν (cm ⁻¹)
3a	1750 (C=O), 3620-3650 une bande variable et fine (OH libre), 1745 (O=C-O).
3b	3200-3400 (OH associé), 1745 (O=C-O)
4a	1750 (C=O), 3600-3650 une bande variable et fine (OH libre),
4b	1670-1700 quatre bandes variables (C=C-aromatique), 1745 (O=C-O). 3200-3400 (OH associé), 1745 (O=C-O)
5a	1750 (C=O), 3400-3600 une bande variable et fine (OH libre), 1700 (O=C-O).
5b	3650-3590 (OH libre), 1500-1600 (C=C-aromatique), 1745 (O=C-O).
6a	1750 (C=O), 3600-3650 une bande variable et fine (OH libre), 1670-1700 quatre bandes variables (C=C-

6b	aromatique), 1745 (O=C-O). 3600-3650 (OH libre), 1700 quatre bandes variables (C=C-aromatique), 1745 (O=C-O)
-----------	---

VII. Mécanisme de la réaction

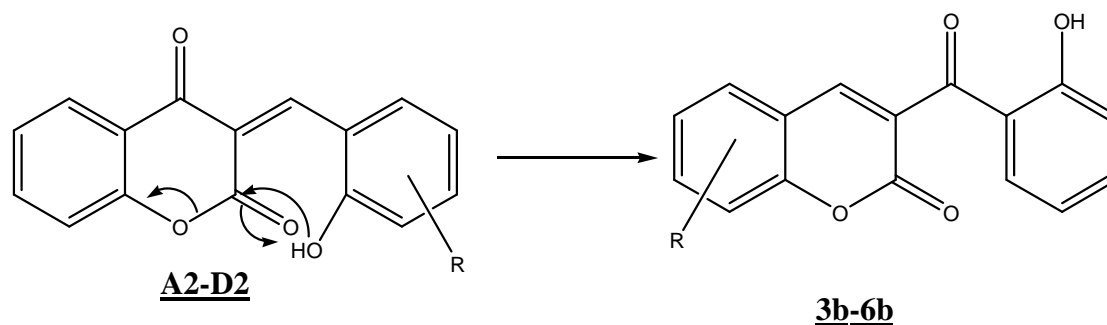
La synthèse a été effectuée à partir du 4-hydroxycoumarine **1** et divers aldéhydes aromatiques. La première étape de la synthèse est une condensation aldolique, suivie par la déshydratation, ce qui a entraîné la création d'une chromone stable **A-D** qui peut présenter deux formes tautomères **A1-D1** et **A2-D2** due à la libre rotation de la liaison σ . Dans la dernière étape, la chromone conjuguée subit deux types de réactions selon la forme de l'intermédiaire : une translactonisation intramoléculaire qui donne les composés **3b-6b** et en présence de la deuxième molécule de la 4-hydroxycoumarine, donne des dimères de type 3,3'-(benzylidene)bis(4-hydroxycoumarine) **3a-6a**.

Première étape

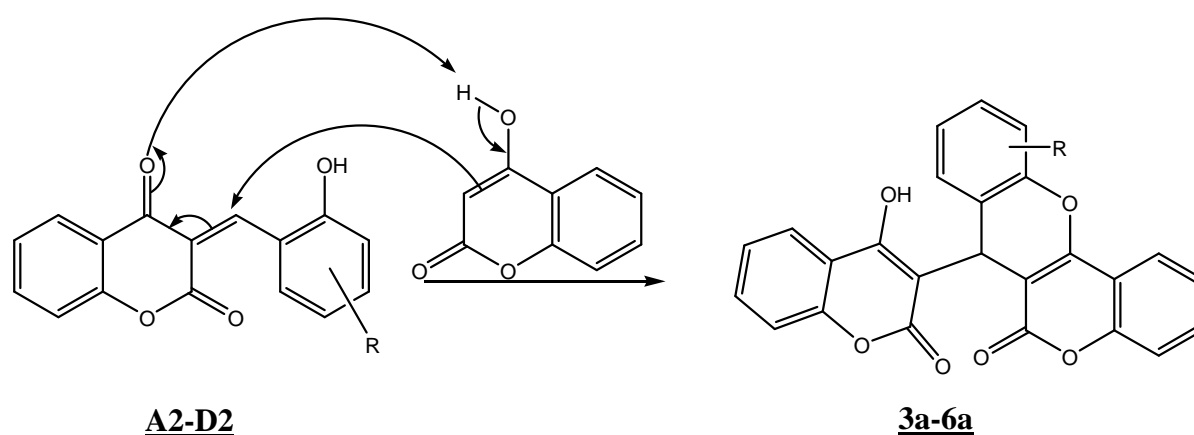


Deuxième étape

a/ Traslactonisation intramoléculaire

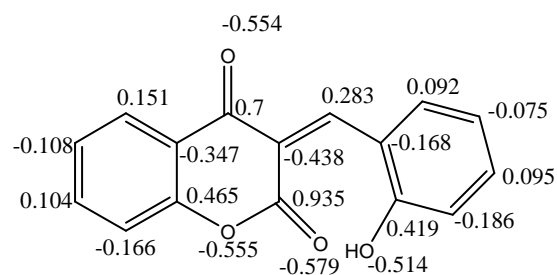


b/ Addition d'une deuxième molécule de 4-hydroxycoumarine

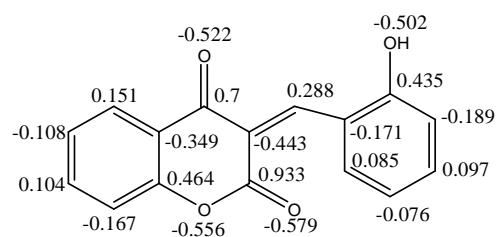
VIII. Calcul semi empirique MINDO/3 des ΔH_f et des Charges de Mulliken.

Interprétation du mécanisme

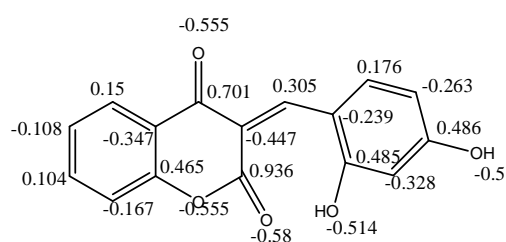
Dans le but d'expliquer la formation des deux produits, nous avons effectué le calcul semi-empirique MINDO/3 des enthalpies de formation ΔH_f et le potentiel électrostatique des charges pour les deux formes **A1-D1** et **A2-D2** en utilisant ChemOffice-Chem3D Ultra ^[38].

**A2**

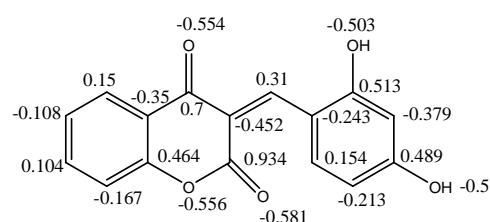
$$\Delta H_f = -117.22372 \text{ kcal/mole}$$

**A1**

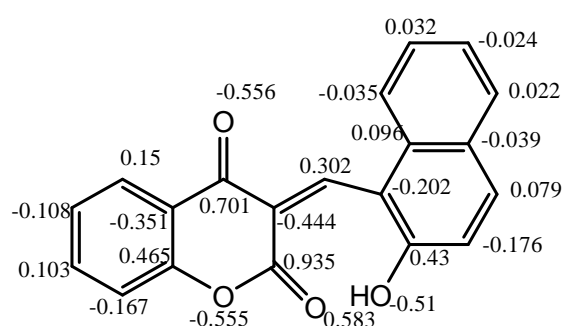
$$\Delta H_f = -117.20852 \text{ kcal/mole}$$

**B2**

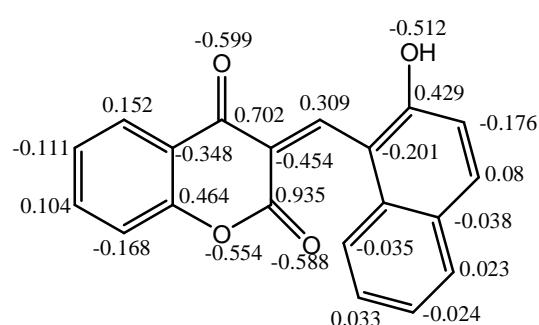
$$\Delta H_f = -177.36413 \text{ kcal/mole}$$

**B1**

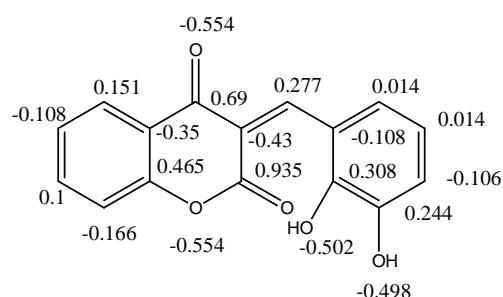
$$\Delta H_f = -176.39109 \text{ kcal/mol}$$

**C2**

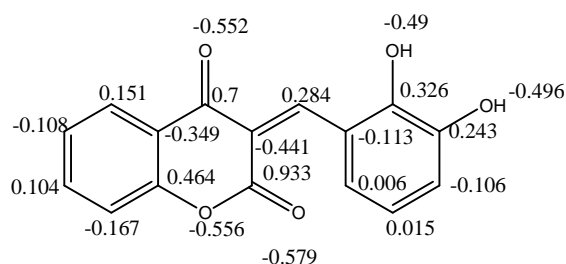
$$\Delta H_f = -86.92074 \text{ kcal/mole}$$

**C1**

$$\Delta H_f = -87.70407 \text{ kcal/mole}$$

**D2**

$$\Delta H_f = -169.1558 \text{ kcal/mole}$$

**D1**

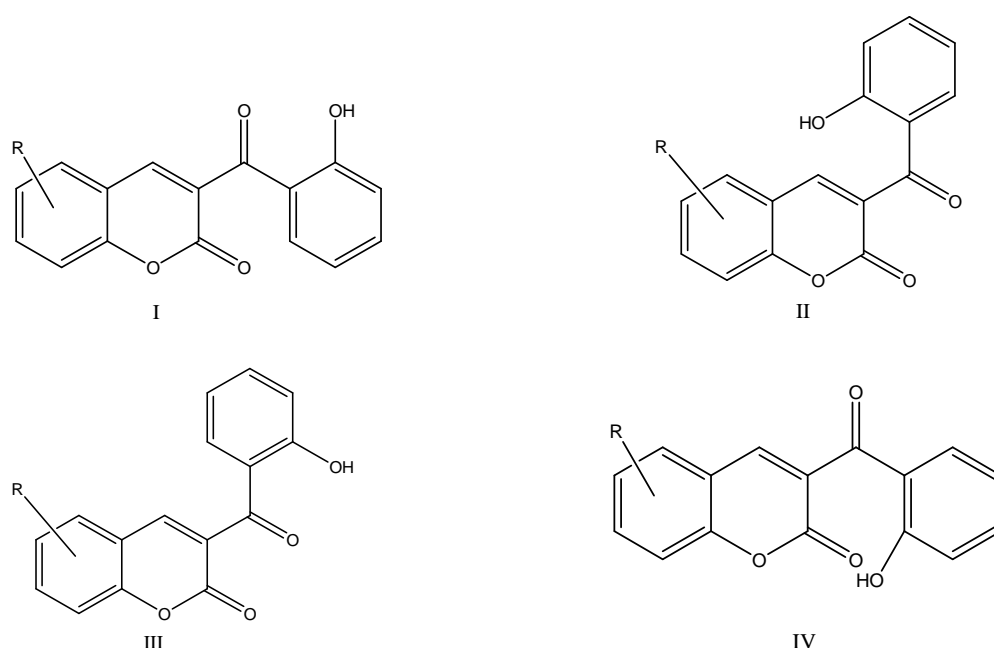
$$\Delta H_f = -168.40312 \text{ kcal/mole}$$

D'après les valeurs des enthalpies de formation des deux formes de chaque intermédiaire, nous remarquons que les formes A2, B2 et D2 donnent les valeurs les plus basses contrairement à C2, ce qui laisse supposer la facilité de la translactonisation par rapport à la double condensation et l'augmentation du rendement des composés **3b**, **4b** et **6b** par

rapport à **3a**, **4a** et **6a**. Contrairement au composé 5b qui aura un rendement inférieur à celui de 5a.

D'autres part, si nous regardons les valeurs des charges de Mulliken de l'atome de carbone C de la liaison C=O en position 2 du noyau coumarinique, cette dernière est plus positive dans les formes A2-D2 que dans les formes A1-D1, ce qui favorise l'approche du solvant polaire et facilite la transactonisation contrairement au solvant apolaire.

Les composés **3b-6b** peuvent exister sous quatre formes isomères, pour identifier la plus stable nous avons calculé les enthalpies de formations pour chaque forme et pour chaque molécule les résultats sont donnés dans le tableau I-2 suivant :



Les formes I, III et IV sont stabilisés par la liaison hydrogène ce qui va leur donner une plus grande stabilité.

Tableau I-2. Valeurs d'enthalpies de formations des composés 3b-6b

N° du composé	ΔH_f (Kcal/mole)			
	Forme I	Forme II	Forme III	Forme IV
3b	-118.46633	-116.44048	-116.97495	-120.70731
4b	-179.00466	-176.38021	-176.65839	-180.90044
5b	-91.11809	-90.83136	-93.00515	-93.00273
6b	-171.13858	-169.27478	-168.77594	-173.06294

D'après les valeurs de ΔH_f , la forme **IV** est la plus stable pour les composés **3b**, **4b** et **6b** par contre dans le cas du composé **5b** la forme **III** est plus stable que **IV** car en plus de la liaison hydrogène, la position et l'angle formé entre le deuxième noyau benzénique et la coumarine stabilise le composé par la délocalisation des électrons π .

Conclusion

Dans ce chapitre le but que nous étions fixé est de réaliser la synthèse des coumarines a été atteint. La pureté des composés a été confirmée par la chromatographie sur couche mince et les points de fusion.

Partie expérimentale

I. Appareillage

Les points de fusions sont déterminés par un appareil scientifique SPM3 équipé d'un microscope et un appareil banc à tube capillaire de marque SPM11.

Les plaques CCM utilisées sont des plaques de gel de silice 60 F254 apportées par le laboratoire MACHEREY-NAGEL.

Les résultats obtenus en IR ont été réalisés sur un appareil de type BOKER.

II. Matériels

Pour la synthèse, le toluène utilisé est apporté du laboratoire de BIOCHEM, Le méthanol celui du laboratoire de CARLO ERBA, l'éthanol est issu du laboratoire SIGMA-ALDRICH, Les aldéhydes aromatiques utilisés sont commerciaux, et La 4-hydroxy coumarine utilisée apporté par FLUKA.

III. Manipulation

Dans un ballon de 250ml, on introduit 0.81g ($5 \cdot 10^{-3}$ moles) de 4-hydroxycoumarine et 20ml d'éthanol puis on additionne $5 \cdot 10^{-3}$ moles d'aldéhyde aromatique 2-hydroxylé.

A froid la 4-hydroxycoumarine est partiellement soluble et à chaud elle se dissout complètement, on met au reflux pendant 1 heure et 30mn, il se forme un précipité à chaud. Après filtration, le produit solide est lavé avec du méthanol chaud, et on sépare deux produits distincts dans chaque cas. Les produits insolubles dans le méthanol chaud sont notés 3a-6a et ceux récupérés après refroidissement du filtrat méthanolique sont notés 3b-6b.

Dans les mêmes conditions opératoires, nous avons remplacé l'éthanol (solvant polaire et protique) par le toluène (solvant apolaire aprotique) avec les mêmes quantités d'aldéhyde et 4-hydroxycoumarine en ajoutant la triéthylamine comme catalyseur basique. Nous avons obtenu les mêmes produits mais avec des rendements différents.

La pureté a été contrôlée par la chromatographie sur couche mince (CCM) qui donne une seule tache différente de celle du produit de départ.

IV. Chromatographie sur couche mince

Les conditions de réalisation de la CCM :

1°) Les substances pures ont été dissoutes dans le chloroforme.

A remarquer que les dérivés coumariniques **3a-6a** donnent des solutions incolores et **3b-6b** donnent des solutions colorées.

2°) Les plaques CCM utilisées sont à base de gel de silice sur des plaques d'aluminium

3°) Révélateur :

Nous avons appliqué un révélateur constitué de :

- 5g de K_2CO_3
- 0.75g de $KMnO_4$
- 75 ml d'eau
- 0.63 ml de NaOH 10%

4°) Solvants : l'éluant est constitué d'un mélange de deux solvants de polarités différentes (chloroforme-méthanol) (13/7 gouttes).

V. Résultats

Composé	Rendement (%)		Pf (°C)	Aspect physique
	éthanol	toluène		
3a	5	40	250	Poudre blanche
3b	30	4	175	Aiguilles jaunes
4a	10	20	270	Poudre blanche
4b	33	15	246	Poudre jaune
5a	10	8	290	Poudre blanche
5b	40	35	256	Poudre jaune

Valorisations des coumarines par spectroscopie UV/vis et fluorescence. Propriétés optiques et photophysiques

I. Introduction

La coumarine et ses dérivés, comme la plupart des hétérocycles, ont stimulé des recherches intéressantes en biologie comme rodenticides, en médecine comme anticoagulants [39], en photochimie comme indicateurs de fluorescence [40,41] et en spectroscopie comme colorants lasers [42,44]. De nombreuses recherches concernant la fluorescence des dérivés de coumarine en solution ont abouti à des résultats intéressants [45,49]. La connaissance des propriétés photophysiques des coumarines est d'un grand intérêt depuis leurs applications importantes dans le domaine du visible comme colorants laser [450,51]. En plus, les dérivés de coumarines sont utilisés comme agents sensibilisateurs dans quelques processus photochimiques [51]. Par exemple les dérivés de 7-aminocoumarine montrent une nouvelle redistribution de charge du système π du noyau aromatique à l'état excité [51]: ce phénomène explique les caractéristiques particulières de ces lasers. En effet ces études montrent qu'après excitation il y a transfert d'électrons du groupe amine vers le noyau, aboutissant ainsi à un transfert de charge intramoléculaire, caractéristique de l'état excité, favorisant ainsi la résonance mésomère (schéma 1). Pill Soon Song et ses collaborateurs ont étudié leurs spectres d'émission de fluorescence et de phosphorescence à basse température [43] où ils ont calculé les durées de vie des états excités et comparé avec celles calculées sur la base de la méthode de Pariser Parr Pople (PPP), en chimie quantique. Quelques ressemblances ont été observées entre les résultats expérimentaux et ceux obtenus par la théorie. Leurs résultats ont montré que le rendement quantique et la durée de vie expérimentale de l'état excité de fluorescence dépendent de la compétition entre l'émission directe et les autres processus de désactivation dont leurs natures sont encore sujettes de controverses très remarquables [52,54].

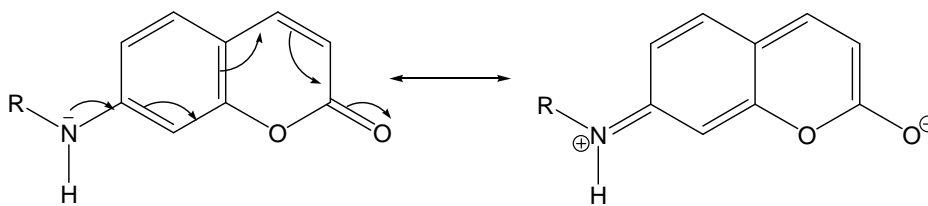


Schéma 1

Un grand nombre de coumarines substituées aminées ont suscité d'importantes recherches et nous ont donné des renseignements beaucoup plus détaillés sur l'effet de solvant et de la température ^[52,55].

Le moment dipolaire de la coumarine a été reporté par plusieurs groupes de chercheurs ^[56,58] et une étude des moments d'une série de 7-aminocoumarine a été publiée ^[57]. Pendant que Bauman et Nagy ont calculé les moments dipolaires de quatre coumarines substituées par mesure de fluorescence et d'absorption électrooptique ^[59], Giri et collaborateurs ont souligné les changements des moments dipolaires de sept coumarines substituées à partir de l'état excité en utilisant la méthode de déplacement solvatochromique ^[48,49]. Auparavant, Pill-Soon-Song et Gordon ^[52] ont calculé les moments dipolaires de la coumarine aux états excités, de même qu'à l'état fondamental.

Ainsi, les moments dipolaires des dérivés de coumarine ont été examinés par plusieurs chercheurs. Cependant aucune étude systématique n'a été observée en comparant, par exemple, les résultats expérimentaux et ceux obtenus par la théorie. De même, si qualitativement les coumarines substituées sont largement étudiées ^[52, 53,54], quantitativement leur effet sur les spectres électroniques d'absorption et d'émission de fluorescence n'a pas fait l'objet de recherches approfondies.

Dans ce présent travail nous nous proposons donc d'étudier les effets de solvant sur les spectres électroniques d'absorption et d'émission de fluorescence des trois coumarines **3b,4b et 5b** synthétisé dans le chapitre I de cette partie (schéma 2). Ces études nous permettent d'avoir des renseignements sur les interactions solvant soluté d'une part, et d'aboutir sur la mise en évidence d'autre part de transfert de charge intramoléculaire (TCI). Ce travail montre aussi le rôle que joue le substituant suivant son caractère électropositif ou négatif et sa position sur le noyau de la coumarine dans les divers processus d'émission de fluorescence et d'absorption électronique.

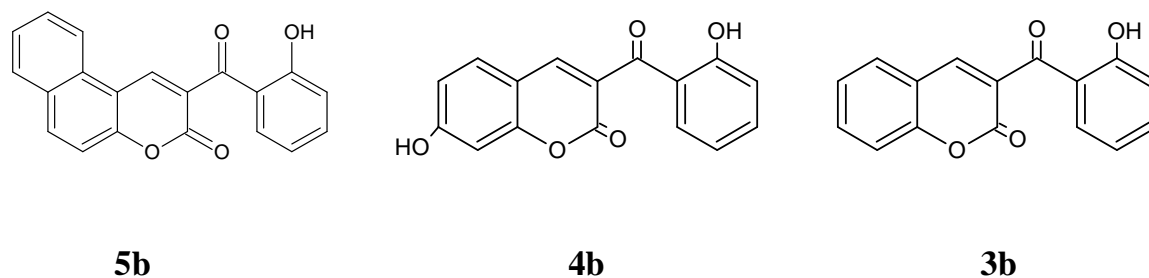


Schéma 2

II. Expérimentale

II.1. Matériels

Le diméthylsulfoxyde (DMSO), l'acétonitrile et le chloroforme utilisés pour l'absorbance en UV/Visible et la fluorescence sont des produits du laboratoire LABOSI

II.2. Appareillage

Les mesures en spectrophotométrie sont réalisées à température ambiante du laboratoire, mesurée avec un thermomètre I.R.

Les mesures d'absorbance ont été enregistrées sur un appareil UV/vis type JENWAY dans des cellules en quartz suprasil Hellma. L'estimation sur les erreurs expérimentales est de 2 nm sur le maximum des bandes et 5 % pour les coefficients d'extinction molaire.

Les mesures de fluorescence ont été réalisées sur un fluorimètre JASCO- FP 8200. Les solutions n'ont pas été dégazées, l'oxygène n'étant pas connu comme quencher des coumarines.

III. EFFET DE SOLVANT SUR LES SPECTRES ELECTRONIQUES D'ABSORPTION ET D'EMISSION DE FLUORESCENCE DES COUMARINES

III.1. Spectres d'absorption UV/Visible

L'influence de solvant est due aux interactions physiques solvant-soluté, qui modifient la différence d'énergie entre l'état fondamentale et l'état excité. L'étude des variations de λ_{\max} et des intensités des bandes d'absorption par effet de solvant peut aider dans certains cas à reconnaître le type de la transition suivant la polarité du solvant. Si on examine une bande d'absorption propre à une espèce en solution, il y a deux effets possibles: effet hypsochrome (λ_{\max} diminue) des solvants polaire sur la transition $n \rightarrow \pi^*$ du groupement carbonyle: cet effet est observé dans le cas des molécules polaires comme les cétones en solution où la polarité de chromophore devient plus faible à l'état excité. Ainsi, avant l'absorption, la polarisation de la liaison $C^{+\delta} = O^{-\delta}$ est stabilisé par la présence d'un solvant polaire par effet électrostatique; il faudra alors plus d'énergie pour provoquer la transition $n \rightarrow \pi^*$ d'où un déplacement de λ_{\max} vers les faibles valeurs (effet hypsochrome) et ce comparativement à ce qui se passerait dans un solvant moins polaire.

Effet bathochrome (λ_{\max} augmente) des solvants polaires sur la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ de la double liaison peu polaire. La présence de solvant polaire aura pour effet la stabilisation de la forme excitée. Ce qui favorise la transition et le déplacement de λ_{\max} vers les fortes valeurs (effet bathochrome) et ce comparativement à ce qui se passerait dans un solvant moins polaire.

Pour les spectres d'absorption U.V/Visible mesurés, les concentrations étaient de $5 \cdot 10^{-5}$ M. Les spectres d'absorption des trois composés **3b**, **4b** et **5b** sont réalisés juste après dissolution dans des solvants organiques qui donnent des bandes distinctes. Le choix du solvant repose sur la solubilité commune des trois composés.

Les trois composés **3b**, **4b** et **5b** donnent dans le DMSO, l'acétonitrile et le chloroforme une seule bande (Figure 1) attribuable à la transition $n \rightarrow \pi^*$ de la fonction cétone.

Comme les graphes UV /Vis le montre :

$$\lambda_{\max} \text{ chloroforme} > \lambda_{\max} \text{ acétonitrile} > \lambda_{\max} \text{ DMSO}$$

D'où: plus le solvant est polaire plus la longueur d'absorption maximale λ_{\max} des coumarines dans ce solvant est petite (effet hypsochrome).

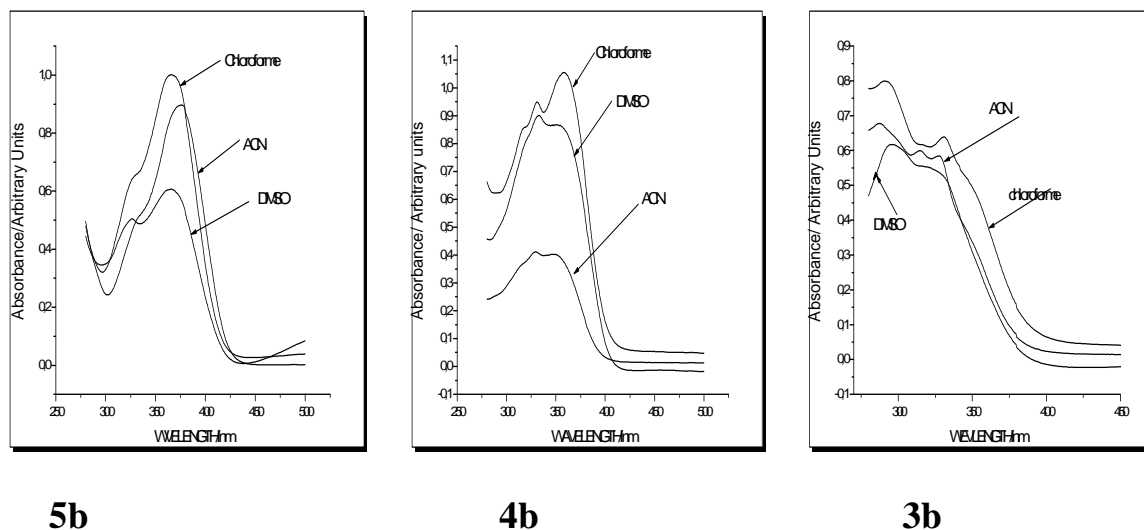


FIGURE 1 : Spectre UV/vis des composé 3b, 4b et 5b dans le DMSO, l'acétonitrile et chloroforme.

Solvant	Composé	Absorbance	λ_{abs} (nm)	$\bar{\nu}_{\text{abs}}$ (cm^{-1})	ϵ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
DMSO	5b	0.607329	365	27397	12146.58
	4b	0.902386	346	28902	18047.72
	3b	0.61732659	325	30769	12346.53
ACN	5b	1.00227464	366	27322	20045.50
	4b	0.4111064	348	28736	8222.128
	3b	0.6783347	327	30581	13566.70
Chloroforme	5b	0.9014	370	27027	18028.00
	4b	1.060179	350	28571	21203.58
	3b	0.802625	329	30395	16052.50

Tableau I : Caractéristiques spectroscopiques et photophysiques des composés 3b, 4b et 5b dans le méthanol à 5.10^{-5}M

ϵ est le coefficient d'extinction molaire (ou absorption molaire), exprimée en $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Ce coefficient varie sur une large plage ($0.05\text{-}2.5$) $10^5 \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, est caractéristique de la molécule absorbante à une valeur de la longueur d'onde et à une température pour un solvant donné, ce coefficient relie la quantité de lumière absorbée, pour une longueur d'onde donnée, à la concentration du fluorophore en solution.

D'après la Loi de Beer Lambert :

$$A(\lambda) = \epsilon(\lambda) \cdot l \cdot c$$

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

III.2. Influence des solvants sur les spectres d'émission en fluorescence

La fluorescence des trois composés **3b**, **4b** et **5b** dans les trois solvants sont observés à température ambiante du laboratoire et à 5.10^{-5}M .

Les spectres d'émission montrent un changement quand la polarité du solvant diminue, cependant, des variations larges ont été trouvées dans la forme des spectres et

l'intensité de la fluorescence selon le milieu. La polarité du solvant influence beaucoup l'émission des molécules polaires, mais peu celle des molécules non polaires. Quand la polarité augmente, l'intensité augmente et la longueur d'onde d'émission diminue ^[60].

- Le pic bouge légèrement de 412 nm dans le DMSO à 415 nm dans l'acétonitrile et à 420 nm dans le chloroforme pour le composé **5b** (Figure 2).
- Pour le composé **4b**, λ_{em} bouge de 406 nm dans le DMSO à 408 nm dans l'acétonitrile et à 410 nm dans le chloroforme. (Figure 2).
- Et pour le composé **3b**, λ_{em} bouge de 384 nm dans le DMSO à 3816 nm dans l'acétonitrile et à 388 nm dans le chloroforme (Figure 6).

Nous avons noté que les pics sont rapprochés dans le DMSO et dans l'acétonitrile et qu'ils sont loin de ceux observés dans le chloroforme pour les trois composés.

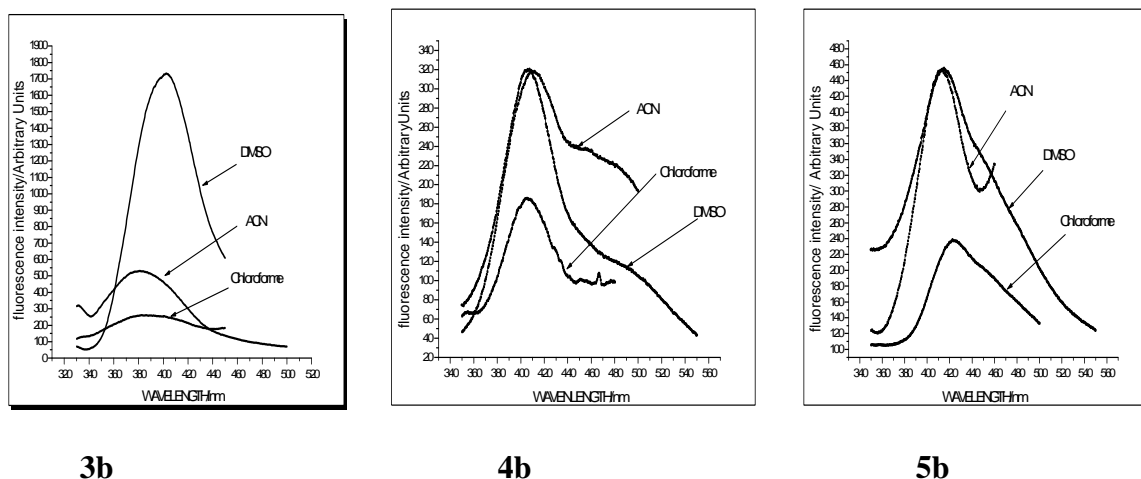


FIGURE 2: Spectres d'émissions des composés 3b, 4b et 5b ($5.10^{-5}M$) dans le DMSO, l'acétonitrile et le chloroforme.

Les longueurs d'ondes d'émission sont reportées sur le tableau II, selon le solvant utilisé. Cette variation de longueur d'onde et d'intensité de fluorescence est aussi liée à la nature du substituant lié à la coumarine. Le composé **5b** possède la plus grande longueur d'onde.

IV. Calcul des rendements quantiques de fluorescence

Les rendements quantiques de fluorescence se calculent par rapport à une référence adaptée. Les spectres d'absorption de l'inconnue 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'inconnue et de la référence, ainsi que le spectre d'émission du solvant. Après soustraction du spectre du solvant, l'aire des spectres de l'inconnue et de la référence est calculée, et le rendement quantique de l'inconnue est déterminé avec la formule suivante:

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

Où

A= 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 est utilisée comme standard dans notre travail, son rendement quantique de fluorescence est de 0.9, une absorbance de 0.0589, et on a enregistré un air sous la courbe de fluorescence de 32142.62545.

Les rendements quantiques Φ_f sont déterminés à la longueur d'onde d'excitation prise dans le spectre d'absorption pour chaque composé dans chaque solvant (Tableau II).

Tableau II : Rendements quantiques de fluorescence des composés 3b, 4b et 5b dans les différents solvants.

Solvant	Composé	λ_{ex}	λ_{em}	A_x	$\bar{\nu}_{em}$ (cm^{-1})	F_x	Φ_x
DMSO	5b	300	412	0.35017	24272	64058.25	0.374
	4b	300	406	0.5638	24631	46632.82	0.169
	3b	300	384	0.6072	26042	111196.83	0.374
Acétonitrile	5b	300	415	0.3299	24096	32895.50	0.168
	4b	300	408	0.29007	24510	32576.05	0.189
	3b	300	386	0.62532	25907	47806.24	0.129
Chloroforme	5b	300	420	0.2475	23809	21844.72	0.172
	4b	300	410	0.6678	24390	24848.56	0.072
	3b	300	388	0.7327	25773	24796.24	0.066

Généralement, pour les trois molécules **3b**, **4b**, **5b** le rendement quantique augmente avec la polarité du solvant utilisé, or les trois composés présentent un rendement quantique élevé dans le DMSO puis acétonitrile et en dernier le chloroforme.

Nos résultats sont comparables à ceux décrits dans la littérature où les auteurs ont montré que le rendement quantique du colorant des chromènes varie entre 10^{-1} et 10^{-2} [61].

3b, **4b** et **5b** sont donc caractérisés par une bonne efficacité de fluorescence dans les milieux polaires aprotiques.

V. Estimation des moments dipolaires par la méthode solvatochromique basée sur la polarité des solvants :

L'effet du solvant sur les propriétés d'absorption et de fluorescence des composés organiques a fait l'objet de travaux intéressants [62]. L'excitation d'une molécule par absorption de photons provoque une redistribution des charges qui induit à des changements conformationnels dans 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 comme celles étudiées dans ce travail, 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 [63] et le dichroïsme électriques [64] sont généralement considérés comme étant très précis, mais leur utilisation est limitée par la nécessité pour les équipements sensibles et les études ont jusqu'ici été relativement limitée à des molécules simples. Le procédé solvatochromique est basée sur le déplacement des

maximums de l'absorption UV / Vis et de la fluorescence dans des solvants de polarités différentes. Koutek ^[65] a 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 vaste expérience et études théoriques sur les moments dipolaires à l'état fondamental et à l'état excité d'une variété de composés organiques fluorescents tels que la coumarine ^[66,67].

Dans la présente étude nous reportons l'estimation des moments dipolaires de l'état fondamental et de l'état excité de trois coumarines **5b** (2-(2-hydroxybenzoyl)-3H-benzo[f]chromen-3-one), **4b** (7-hydroxy-3-(2-hydroxybenzoyl)-2H-chromen-2-one) et

3b (3-(2-hydroxybenzoyl)-2H-chromen-2-one), par la méthode solvatochromique basée sur la polarité des solvants.

VI. Estimation des moments dipolaires à l'état fondamental et excité

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. 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 ^[68] :

La différence $\bar{\nu}_{em}$:

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

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

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

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^[68]:

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

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

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

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^[68,69]. $a_0 = (3M / 4\pi\delta N)^{1/3}$,

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 $f(\epsilon, n)$ et $\Phi(\epsilon, n)$ respectivement, pour différents solvants.

Les déplacements de Stokes ont été calculés à partir des spectres d'absorption et d'émission (tableau IV). 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 III résume les valeurs des propriétés des solvants et des paramètres de polarité calculés $f(\epsilon, n)$ et $\Phi(\epsilon, n)$.

Solvants	μ (D)	ϵ	n	$f(\epsilon, n)$	$\Phi(\epsilon, n)$
DMSO	3.90	46.7	1.480	0.84	1.49
Acetonitrile	3.45	37.5	1.344	0.863	1.332
Chloroform	1.15	4.81	1.443	0.372	0.972

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

Solvents	$\lambda_{ex}(nm)$	$\lambda_a(nm)$	$\lambda_{em}(nm)$	$(\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_{em})$	$(\bar{\nu}_a + \bar{\nu}_{em})$
<u>DMSO</u>					
5b	300	365	412	3125	51669
4b	300	346	406	4271	53533
3b	300	324	381	4617	57111
<u>Acétonitrile</u>					
5b	300	366	415	3226	51418
4b	300	348	408	4226	53246
3b	300	328	386	4581	56395
<u>Chloroforme</u>					
5b	300	370	420	3218	50836
4b	300	350	410	4181	52961
3b	300	330	402	5427	55179

Tableau IV. Caractéristiques spectroscopiques et photophysiques des dérivés de coumarines **3b**, **4b**, **5b** dans des solvants différents.

La figure 3_{a-b} montre les graphiques de $(\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f)$ en fonction de $f(\epsilon, n)$, et la figure 4_{a-b} montre les graphiques de $(\bar{\nu}_a + \bar{\nu}_f)$ 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 V.

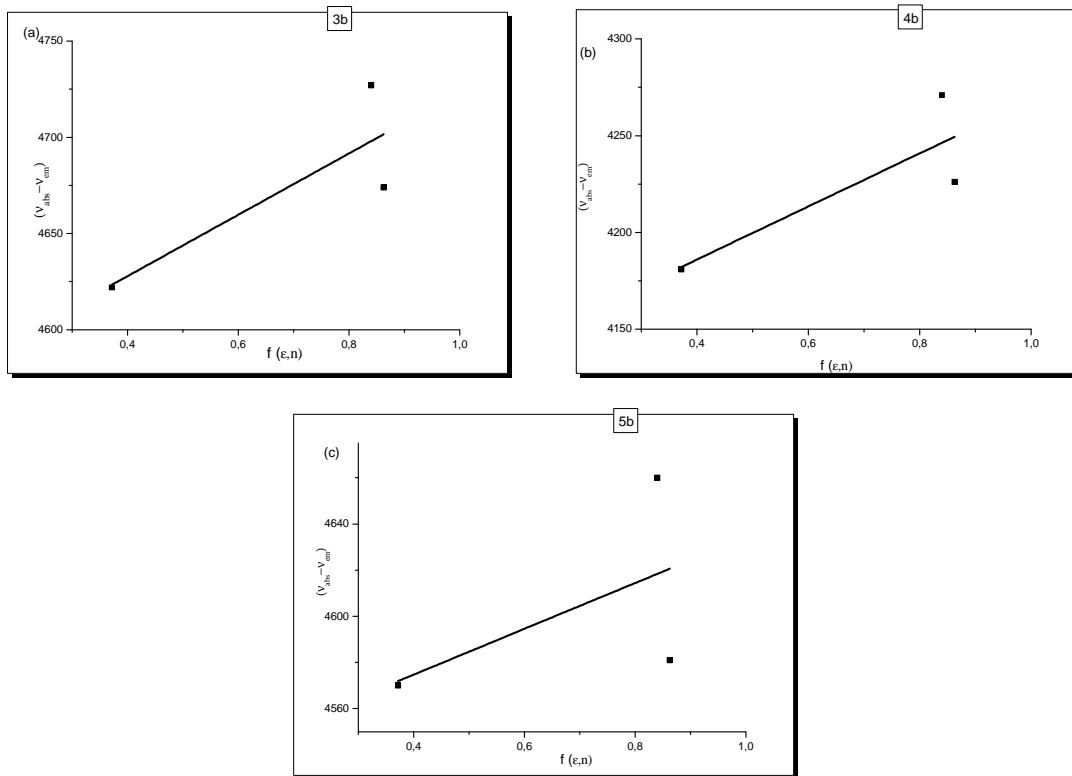


Figure 3(a-c): Variation des déplacements de Stokes en fonction de $f(\epsilon, n)$ en utilisant l'équation (1) dans différents solvants.

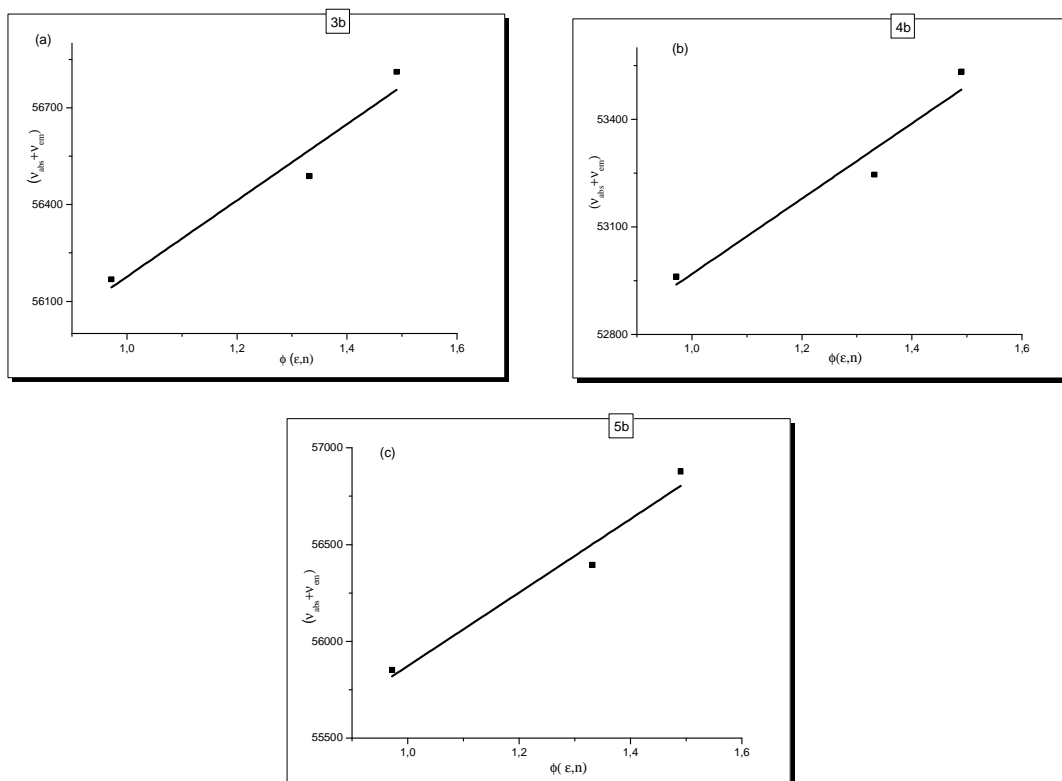


Figure 4(a-c) : Variation de la somme arithmétique des déplacements Stokes en fonction de $\Phi(\epsilon, n)$ en utilisant l'équation (2) dans différents solvants.

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 5. En outre, la variation du moment dipolaire ($\Delta\mu = |\mu_e - \mu_g|$) a été calculée à partir des valeurs estimées de μ_g et μ_e et représentée dans le tableau VI.

Composé	Pente	Ordonnée à l'origine (cm ⁻¹)	coefficient de Correlation	Nombre de données
Eq.(1) correlations				
5b	99	4535	0.56	3
4b	137	4131	0.84	3
3b	159	4564	0.84	3
Eq.(2) correlations				
5b	1899	53973	0.98	3
4b	1050	51918	0.97	3
3b	1181	54996	0.97	3

Tableau V. Traitement statistique des corrélations des déplacements spectraux des solvants des produits **3b**, **4b**, **5b**

Molécule	a_0 (A°)	μ_g^b (D)	μ_e^c (D)	$(\frac{\mu_e}{\mu_g})^d$	$\Delta\mu^e$ (D)
5b	4.46	14.33	15.90	1.11	1.57
4b	4.21	2.24	8.74	3.90	6.5
3b	4.22	7.65	10.03	1.31	2.38

Tableau VI. Rayon moléculaire, moment dipolaire de l'état fondamental, de l'état excité et la variation du moment dipolaire (en Debye, D) des dérivés 3-acétoacétylcoumarines ; **5b**, **4b**, **3b**

Avec:

1 Debye = 3.33564×10^{-30} C.m

μ_g^b : Moment dipolaire expérimentale de l'état fondamental calculé à partir de l'Eq (9).

μ_e^c : Moment dipolaire expérimentale de l'état excité calculé à partir de l'Eq. (10).

$(\frac{\mu_e}{\mu_g})^d$: Rapport de μ_e et μ_g calculé à partir de l'Eq. (11)

$\Delta\mu^e$: Variation du moment dipolaire calculé à partir de l'Eq. (7).

Le changement du solvant de faible à forte polarité induit une différence dans les déplacements de Stokes, et cette dernière varie entre 30395 et 5711 cm^{-1} qui est indicative d'une transition de transfert de charge.

À titre d'observation générale il ya une augmentation dans les valeurs des déplacements de Stokes avec l'augmentation de polarité du solvant, ce qui signifie qu'il existe une augmentation du moment dipolaire à l'état excité.

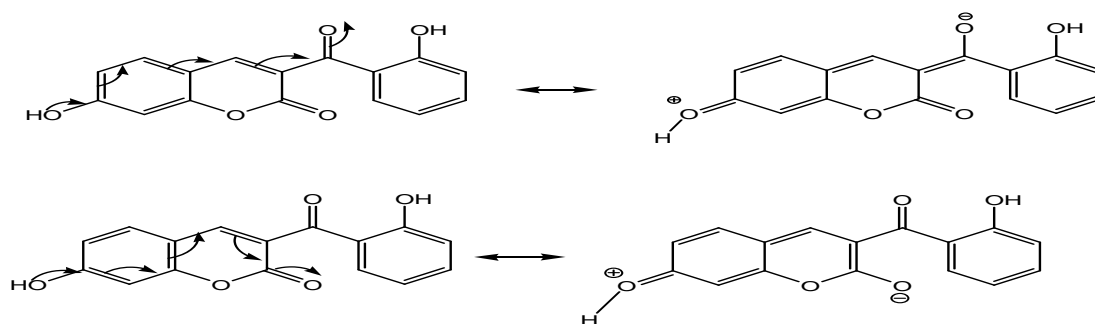
Les données solvatochromiques peuvent être utilisées pour identifier les transitions spectrales, appelée $\pi-\pi^*$, $n-\pi^*$, etc. Le tableau II montre que l'augmentation de la polarité du solvant entraîne la bande d'émission de fluorescence à subir un effet bathochrome, confirmant une transition $n-\pi^*$.

Le passage de la bande de fluorescence vers les grandes longueurs d'onde est due à la différence marquée sur la distribution de charge entre l'état excité et l'état fondamental du soluté, ce qui entraîne une forte interaction avec des solvants polaires à l'état excité.

Les moments dipolaires des trois composants sont plus élevés dans l'état excité par rapport à l'état fondamental.

Ces augmentations des moments dipolaires sont en fonction de la nature du substituant introduit sur la structure de la coumarine. Un accord équitable a été observé dans le changement du moment dipolaire ($\Delta\mu$) des molécules. Le changement du moment dipolaire de l'excitation suggère que l'état excité est provenu de nature transfert de charge intramoléculaire^[70].

Le composé **4b** donne le plus grand écart entre le moment dipolaire à l'état fondamental et excité que les deux autres dérivés ça est du au groupement hydroxyle électro-attracteur qui stabilise la molécule par effet mésomère.



VII. Conclusion

Ce travail a été réalisé uniquement dans trois solvants de polarité différente, ce dernier montre que la nature du substituant et la polarité de solvant influent beaucoup sur le rendement quantique de la fluorescence ces changements traduisent les interactions physiques solvant-soluté qui modifient la différence d'énergie entre état fondamental et état excité.

La polarité du solvant joue son rôle aussi sur l'intensité et la longueur d'onde d'émission.

Dans la présente étude, nous décrivons aussi l'estimation des moments par la méthode solvathochromique. Nous avons constaté que toutes les molécules possèdent des valeurs des moments dipolaires supérieures dans l'état excité que dans l'état fondamental et le moment dipolaire de la **4b** était plus élevé que les deux autres dérivés. Il convient de noter que les valeurs mesurées μ_g et μ_e des trois composés sont différents les uns des autres et cela peut être dû à des différences structurelles entre eux.

Conclusion générale

Au terme de ce mémoire, le but que nous étions fixés, à savoir la maîtrise de la méthode conventionnelle du chauffage à reflux de synthèse en chimie organique, a été atteint.

Les résultats essentiels obtenus ont été analysés comme suit :

En premier lieu, nous avons amélioré la réaction de translactonisation de 4-hydroxycoumarine vis-à-vis des aldéhydes aromatiques 2-hydroxylés en utilisant deux solvants de polarités différentes.

La synthèse des coumarines **3b-6b**, a été confirmée par les différents points de fusion et différentes techniques d'analyses structurales et qualitatives (CCM, IR, et UV-visible).

L'utilisation de la méthode semi-empirique MINDO/3 sous la chaîne de calcul MOPAC a renforcé notre étude de mécanisme de formation des composés coumariniques en calculant les enthalpies de formation des deux formes isomères de l'intermédiaire réactionnel.

L'étude des composé coumariniques **3b**, **4b** et **5b** en spectroscopie UV/vis et fluorescence nous a permis d'élaborer une nouvelle série de composés dans le cadre de la recherche de nouvelles sondes fluorescentes.

Bibliographie

- [1] Lakowicz, J. R. "Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd Edition." ; Springer, New York (2006).
- [2] Kasha, M. "Characterization of Electronic Transitions in Complex Molecules." ; Discuss. Faraday Soc.9, 14-19 (1950).
- [3] Lavis, L. D.; Raines, R. T. "Bright Ideas for Chemical Biology." ACS Chem. Biol. 2008, 3, 142-155 (2008).
- [4] Weber, G. "Intramolecular Transfer of Electronic Energy in Dihydrodiphosphopyridine Nucleotide." ; Nature, 180, 1409 (1957).
- [5] Whitby, L.G. "A New Method for Preparing Flavin-Adenine Dinucleotide." ; Biochem. J.54, 437-442 (1953).
- [6] Cavaluzzi, M.J.; Borer, P.N. "Revised UV Extinction Coefficients for Nucleoside-5'-Monophosphates and Unpaired DNA and RNA." ; Nucleic Acids Res.32, e13 (2004).
- [7] Weber, G. "Polarization of the Fluorescence of Macromolecules II. Fluorescent Conjugates of Ovalbumin and Bovine Serum Albumin." ; Biochem. J. 51, 155-167(1952).
- [8] Daniel, E.; Weber, G."Cooperative Effects in binding by Bovine Serum Albumin. i. The Binding of 1-Anilino-8-Naphthalenesulfonate. Fluorimetric Titrations. " Biochemistry. 5, 1893-1900 (1966).
- [9] Weber, G.; Farris, F. J. "Synthesis and Spectral Properties of a Hydrophobic Fluorescent Probe: 6-Propionyl-2-(Dimethylamino) Naphthalene." ; Biochemistry. 18, 3075-3078(1979).
- [10] Hudson, E. N.; Weber, G." Synthesis and Characterisation of Two Fluorescent Sulfhydryl Reagents." ; Biochemistry. 12, 4154-4161 (1973).
- [11] Karpovich, D.S.; Blanchard, G. J. "Relating the Polarity-Dependent Fluorescence Response of Pyrene to Vibronic Coupling. Achieving a Fundamental Understanding of the Pyrene Polarity Scale." ; J. Phys. Chem. 99, 3951-3958 (1995).

- [12] 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).
- [13] 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. 250, 3094 (2006).
- [14] Süßmeier, F.; Langhals, H ." Novel Fluorescence Labels: the synthesis of Perylene - 3,4,9-Tricarboxylic Imide." ; Eur. J. Org. Chem. 607-610, (2001).
- [15] Kohl, C; Weil, T.; Qu, J. ; Müllen, K. "Towards Highly Fluorescent and Water-Soluble Perylene Dyes." ; Chem. Eur. J. 10, 5297-5310, (2004).
- [16] Eaton, D. F. "Reference Materials for Florescent Measurement." ; Pure Appl. Chem. 60, 1107-1114,(1988).
- [17] Schulman, S. G.; Threatte, R. M.; Capomacchia, A. C.; Paul, W. L. "Fluorescence of 6-Methoxyquinoline, Quinine, and Aqueous Media." J. Pharm. Sci. 63, 876-880 ,(1994).
- [18] Sun, W.C.; Gee, K. R.; Haugland, R. P. "Synthesis of Novel Fluorinated Coumarins: Excellent UV-Light Excitable Fluorescent Dyes." ; Bioorg. Med. Chem. Lett. 8, 3107-3110,(1998).
- [19] Grandberg, I.I.; Denisov, L.K.; Popova, O.A. "7-Aminocoumarins." ; Chem. Heterocycl. Compd. (N.Y) .23, 117-142 (1987).
- [20] Puliti, D. " Sondes Fluorogéniques Pour la Détection et l'étude de la Dynamique de protéines Cellulaires. " Thèse de doctorat, Université de Strasbourg, France, (2010.)
- [21] 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. 33, 435-444 (1988).
- [22] Lavis, L. D. ; Chao, T. Y.; Raines, R. T. "Fluorogenic Label for Biomolecular Imaging." ; ACS Chem. Biol.1, 252-260 (2006).
- [23] Lee, L. G.; Berry, G. M.; Chen, C.H." Vita Blue: a New 633-Nm Excitable Fluorescent Dye for Cell Analysis." Cytometry 10, 151-164, (1989).

- [24] L. Wu, X. Wang, W. Xu, F. Farzaneh, R. Xu The structure and pharmacological functions of coumarins and their derivatives *Curr. Med. Chem.*, 16, 4236–4260, (2009).
- [25] Tebakh Chabha ; Imerzoukene Fadhela. synthèse et caractérisation de quelques molécules anticoagulante dérivées de la coumarine. Master: Chimie pharmaceutique: UMMTO, (2009).
- [26] 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.*; 10 ; 3797-381, (2004).
- [27] Khan I., Kulkari M.V., Gopal M., Shahabuddin., Synthesis and biological evaluation of novel angularly fused polycyclic coumarins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 15, 3584-3587, (2005).
- [28] 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*, 76, 79-86 ,(2014).
- [29] Çamur, C., Bult, M., Guney, O. Synthesis, Characterization and Fluorescence behavior of new Fluorescent probe Phthalocyanines bearing Coumarin substituents. *Polyhedron*, 28, 2, 233-238 ,(2009).
- [30] J. Cervello, M. Gil, P. de March, J. Marquet, M. Moréno-Manas, J. L. Roca and F. Sanchez-Ferrando, *J. Chem. Tetrahedron*, vol. 43 N°. 10, pp. 2381-2387 (1987) .
- [31] W. R. Sullivan, C. F Huebner, M. A. Stahmann and K. P. Link, *J. Am. Chem. Soc* , 65, 2288-2290, (1943).
- [32] J. Ribolleau, C. Deschamps-Vallet, D. Molho and C. Mentzer, *Bull. Soc. Chim France*, 3138 ,(1970).
- [33] Y. Rachedi, M. Hamdi, V. Spéziiale, *Synth. Commun.*, 20(18), 2827-2836 (1990). (26)- M. Moréno-Manas, R. Pleixats. *Synthesis.* ; 430 ,(1984).
- [34] Mollo, Darinus. Patent, Fr 1216966 19600429, CAN 55:93563, AN 1961, 93563,(1984).

- [35] P. De March, M. Moréno-Manas, R. Pleixats and J. L. Roca, *J. Heterocyclic Chem*, 21, 1371, (1984).
- [36] M. Makhloufi-Chebli, M. Hamdi, A. M. S. Silva, F. Balegroune, *J. Sos. Alger. Chim.*, 18 (1), 91-10, (2008).
- [37] Somari Giri* and Awadhesh Kumar Mishra, *J. Agric. Food Chem.*, 32(4), 759-762,(1984).
- [38] Chem office Chemdraw ,(2004).
- [39] E. R. Barnhart (publ.) 1988 Physicians' Desk Reference, Medical Economics, Oradell, NJ. 42nd ed, (1988).
- [40] R. F. Chen *Anal. Lett* ,1, 423. (1968).
- [41] O. S. Wolfbeis, E. Furlinger, H. Kroneis and H. Marsoner *Z. Anal. Chem* 314,119, (1983).
- [42] J. L. Abernethy, *J. Chem Educ*, **46** ,561, (1969) .
- [43] James B Gallivan. *Mol. Photochem-2* (3) 191-211. (1970).
- [44] A; Bergman and J. Jortner, *J. Lumines* 6, 390, (1973).
- [45] R. Giri, S. S. Rathi, M. K. Machwe and M. K. Machwe, *Ind. J. Pure Appl. Phys.* 29, 111, (1991).
- [46] S. Singh and M. K. Machwe, *In dian journal of Pure and Appied physics*, 29, 402-405,(June 1991).
- [47] T. L. Aberloa, F. L. Aberloa, *Journal of Luminescence* 68,149-155, (1996).
- [48] Pill-Soon Song and William H. Gordon, III. *The journal of Physical Chemistry* 74;(24), 4234,(1970).
- [49] R. Giri, *Spectrochimica Acta*, 48A n°6, 843-848, (1992).
- [50] P. K. McCarthy and G. J. Blanchard *J. Phys. Chem.* 97, (1993).
- [51] T. Lopez Arbeloa et al *J. of Luminescence* 59, 369-375, (1994).

- [52] L. P. Hammett *J. Am. Chem. Soc.* 59, 96, (1973).
- [53] G. Jones II, W. R. Jackson, C. Choi and W. R. Bergmark *J. Phys. Chem Soc.* 89, 294,(1985).
- [54] F. P. Schaefer, *Dye Lasers* Springer Verlag, Berlin (1977).
- [55] G. Chu and F. Yangbo *J. Chem. Soc. Faraday Trans I* 83, 1533, (1987).
- [56] R. Giri, S.S. Rathi, M. K. Machwe and V. V. S. Murti, *Spectrochim. Acta* 44A ,805, (1988).
- [57] R. Giri, S. S. Rathi, M. K. Machwe and V. V. S. Murti *Indian J. Pure Appl. Phys.* 26,445,(1988).
- [58] P.Suppan and N. Ghoneim, *Solvathochromism*, the Royal Society of Chemistry, Cambridge,(1997).
- [59] M. Elbanowski, B. Makowska, Staninski, M. Kaczmarek, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 130 ,75-81, (2000).
- [60] C. Reichardt, *Solvents and Solvent effects in Organic Chemistry*, 3rd ed., Wiley-VCH, Weinheim,,(2003).
- [61] A. Kowski, J. F. Rabek (Eds.), *Progress in Photochemistry and Photophysics*, Vol. V, CRC Press, Boca Raton, 1-47, (1992).
- [62] W. Liptay, E. C. Lim (Eds.), *Excited States*, Vol. I, Academic Press, New York, , pp. 129-229, (1974).
- [63] S. Mazumdar, R. Manoharan and S. K. Dogra, *Solvatochromic effects in the fluorescence of a few diamino aromatic compounds.* 46,301-314. (1989).
- [64] R. Giri, M. M. Bajaj, *Estimation of excited state dipole moment of substituted coumarins.* *Curr. Sci.*, 62, 522-525,(1992).
- [65] US Raikar, VB Tangod, BM Mastiholi, S Sreenivasa, *Solvent effects and photophysical studies of ADS560EI laser dye*, *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 4(9), 188-197, (2010).

- [66] A. Kowski and P. Bojarski, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 82 Pages 527-528, (2011).
- [67] B. G. Evale, S. M. Hanagodimath, I. A. Khan, M. V. Kulkarni, Estimation of dipole moments of some biologically active coumarins by solvatochromic shift method based on solvent polarity parameter, E_T^N . *Spectrochem. Acta Part A*, 73,694-700, (2009).
- [68] Malika Makhoulfi-Chebli, Safouane M. Hamdi, Amal Rabahi, Artur M. S. Silva and Maamar Hamdi. "Estimation of Ground- and Excited-State Dipole Moments of 3-acetoacetyl-coumarin Derivatives from a Solvatochromic Shift Method Based on the Solvent Polarity Parameter". *Journal of molecular liquids*, Vol. 181, , 89-96,(2013).