

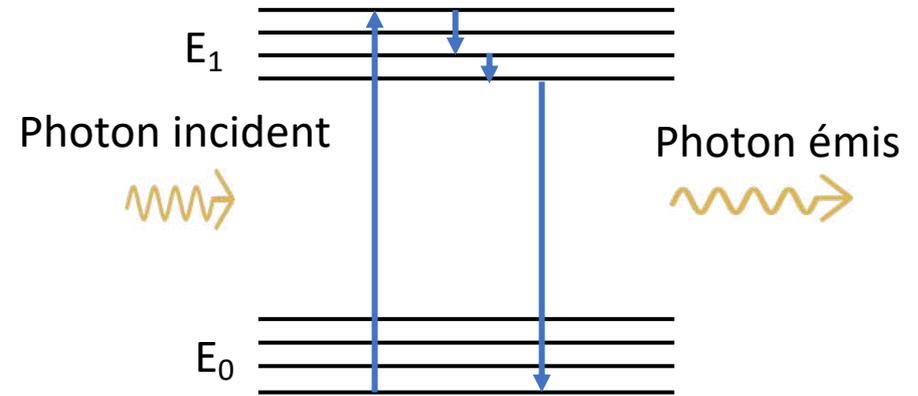
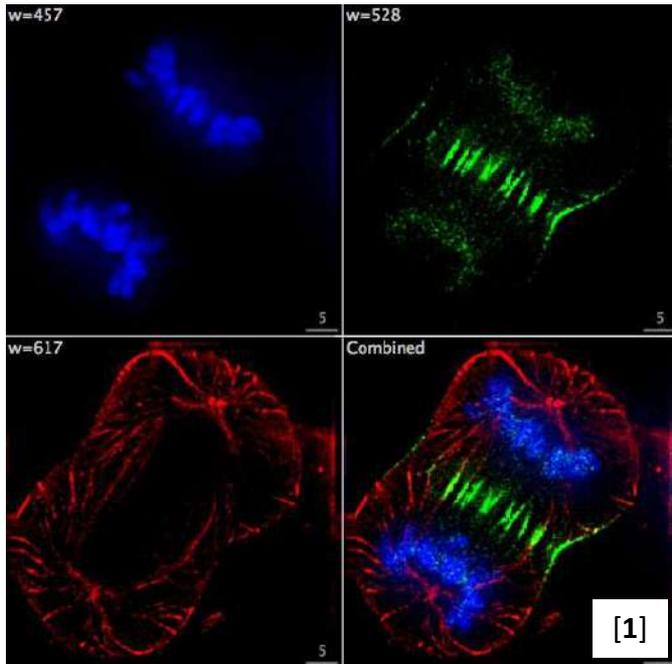


Enjeux sociétaux  
Session 2021

7-hydroxy-4-méthylcoumarine

La fluorescence au service de la médecine

# INTRODUCTION

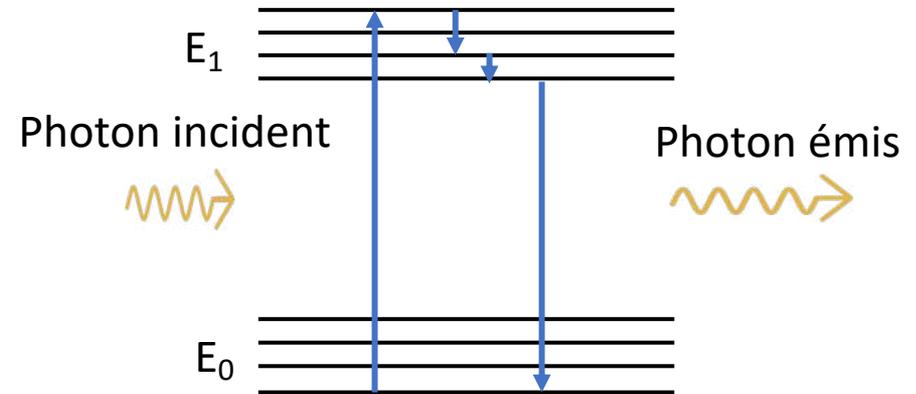
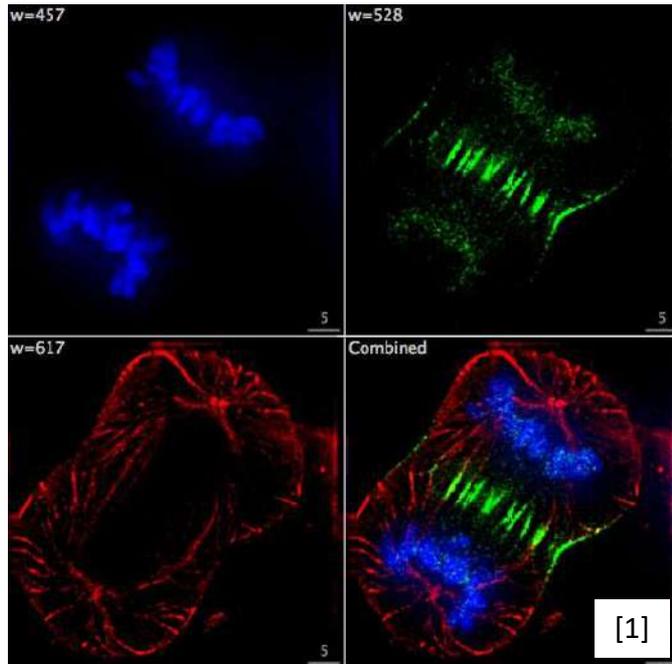


**Relation de Plank-Einstein**

$$E = h \frac{c}{\lambda}$$

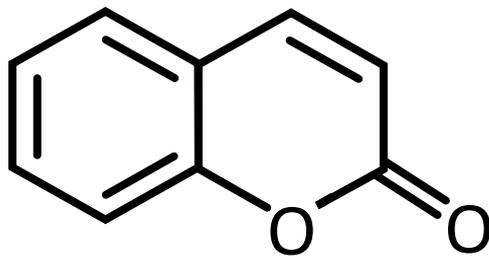
# INTRODUCTION

2



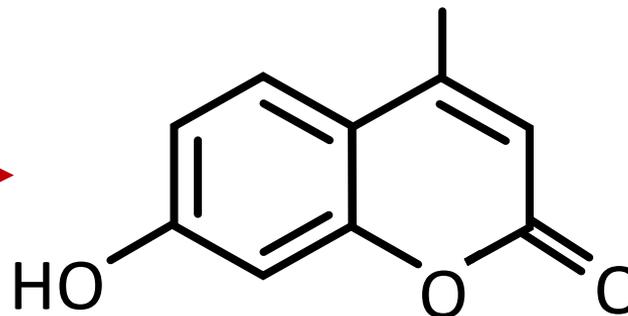
Relation de Plank-Einstein

$$E = h \frac{c}{\lambda}$$



La coumarine

Dérivé



7-hydroxy-4-methylcoumarine  
(4MU)



Cristaux de 4MU synthésisés  
dans le laboratoire du lycée

## Objectifs



Synthétiser



Caractériser



Détecter

Comment synthétiser et caractériser une molécule fluorochrome et étudier ses interactions dans le but d'en faire une sonde pH fluorescente? Quelle efficacité et quelles limites rencontrons-nous?

## Objectifs



Synthétiser



Caractériser



Détecter

# PLAN

## I



### Synthèse

- 1 | Une rétro-synthèse
- 2 | Le mécanisme
- 3 | La synthèse

## II



### Caractérisation

- 1 | Chromatographie sur couche mince
- 2 | Banc Kofler
- 3 | Infrarouge
- 4 | RMN

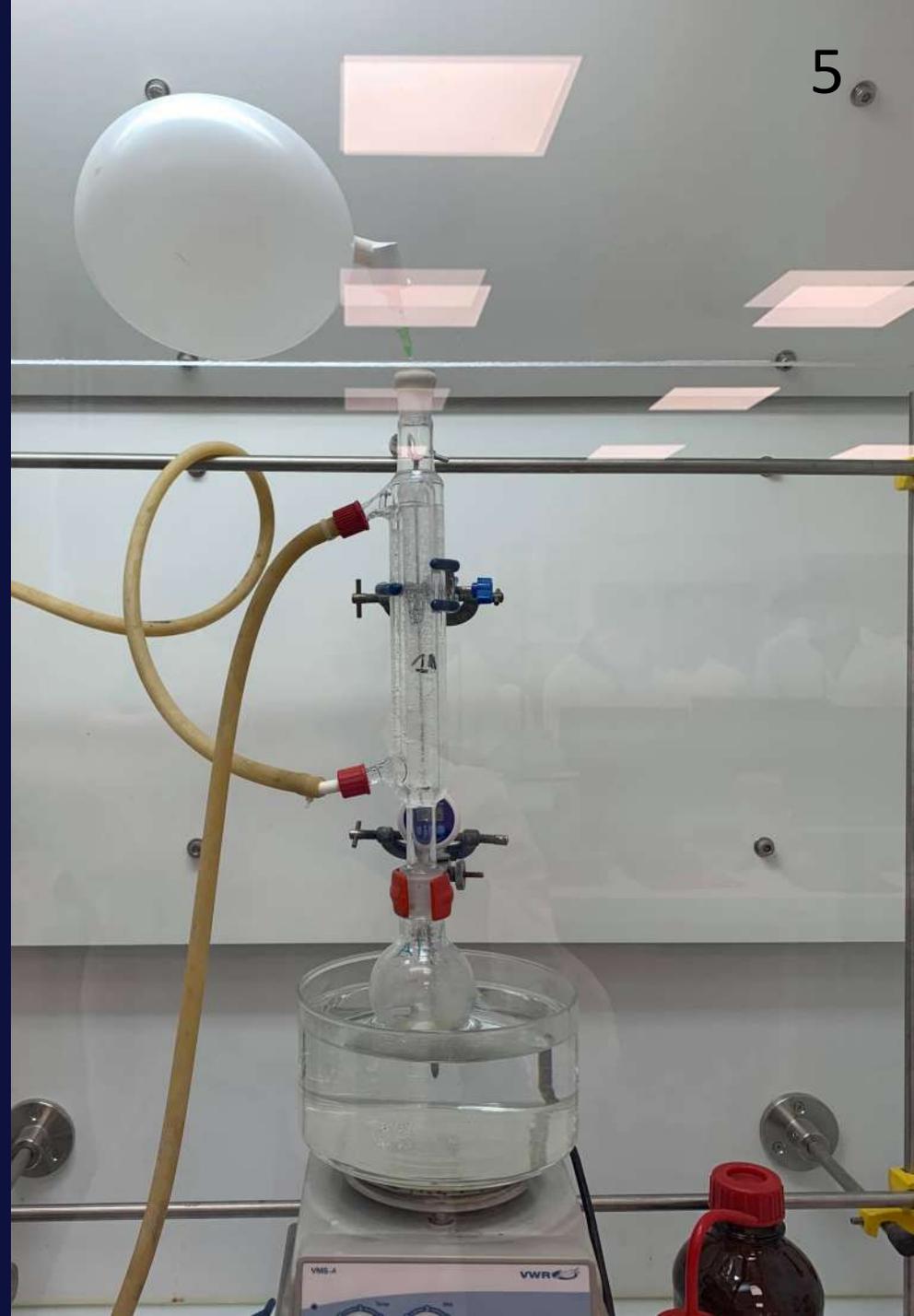
## III



### Propriétés

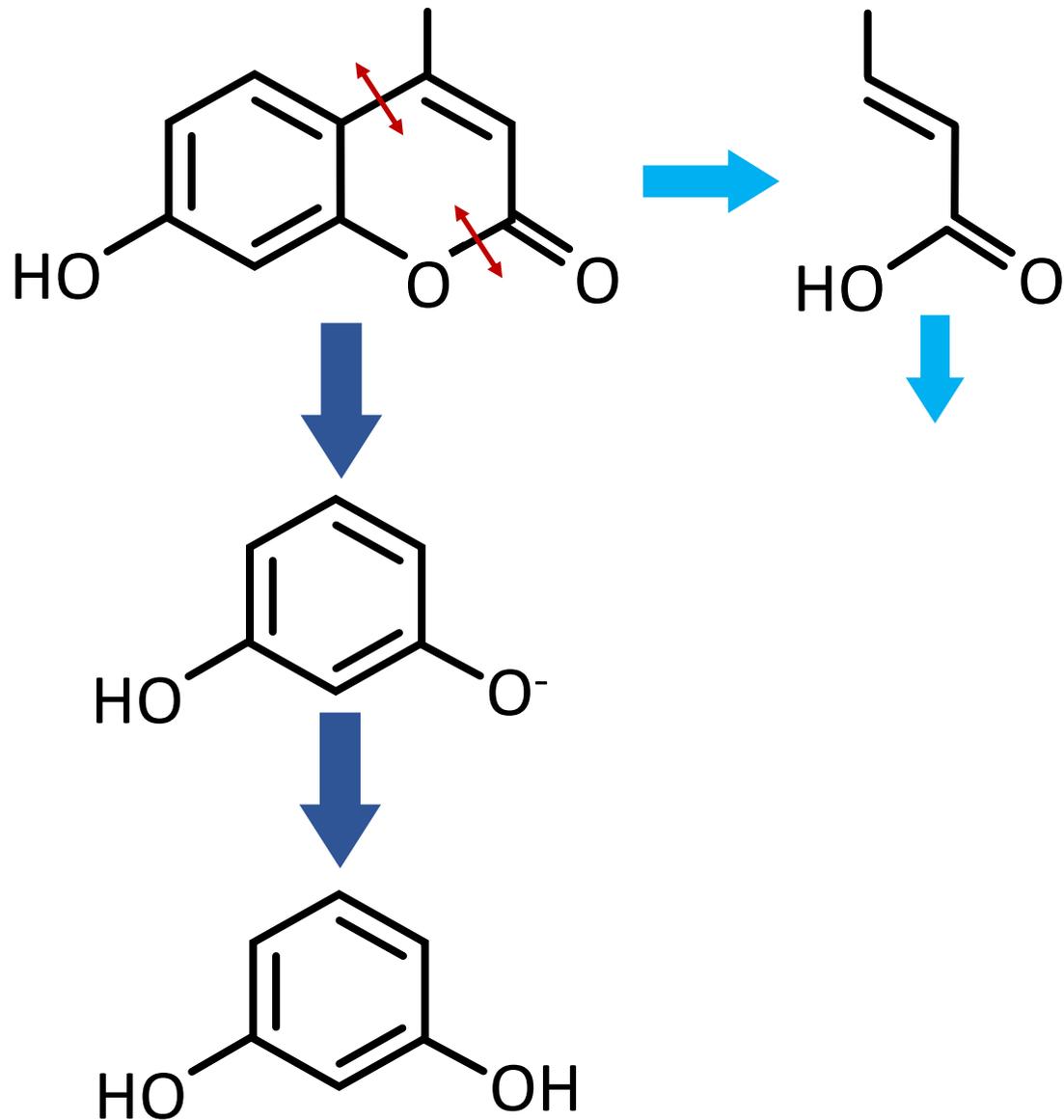
- 1 | Dépendance au pH
- 2 | Propriétés fluorescentes

# LA SYNTHÈSE



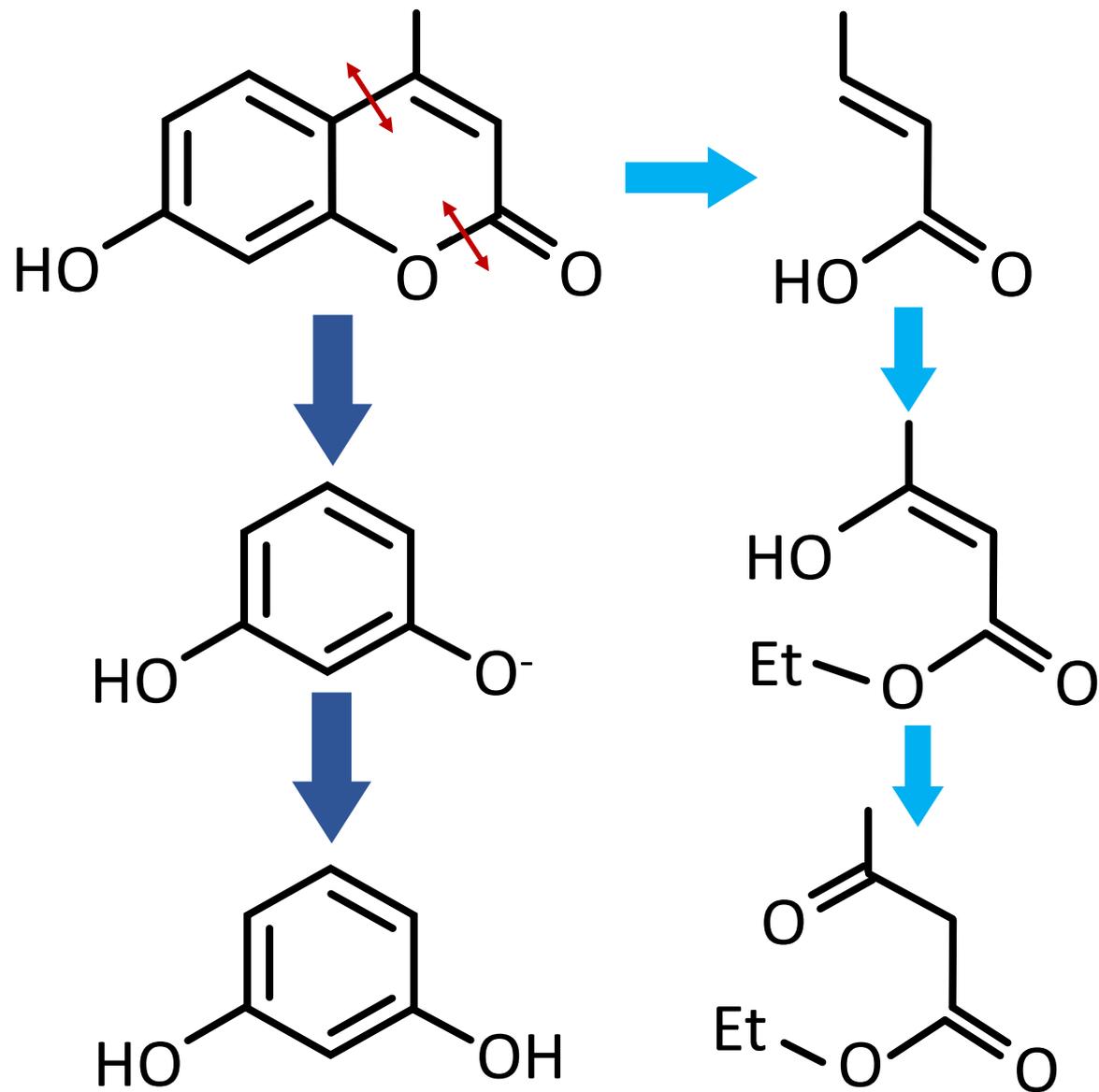
# I.1 - Synthèse : Une rétro-synthèse

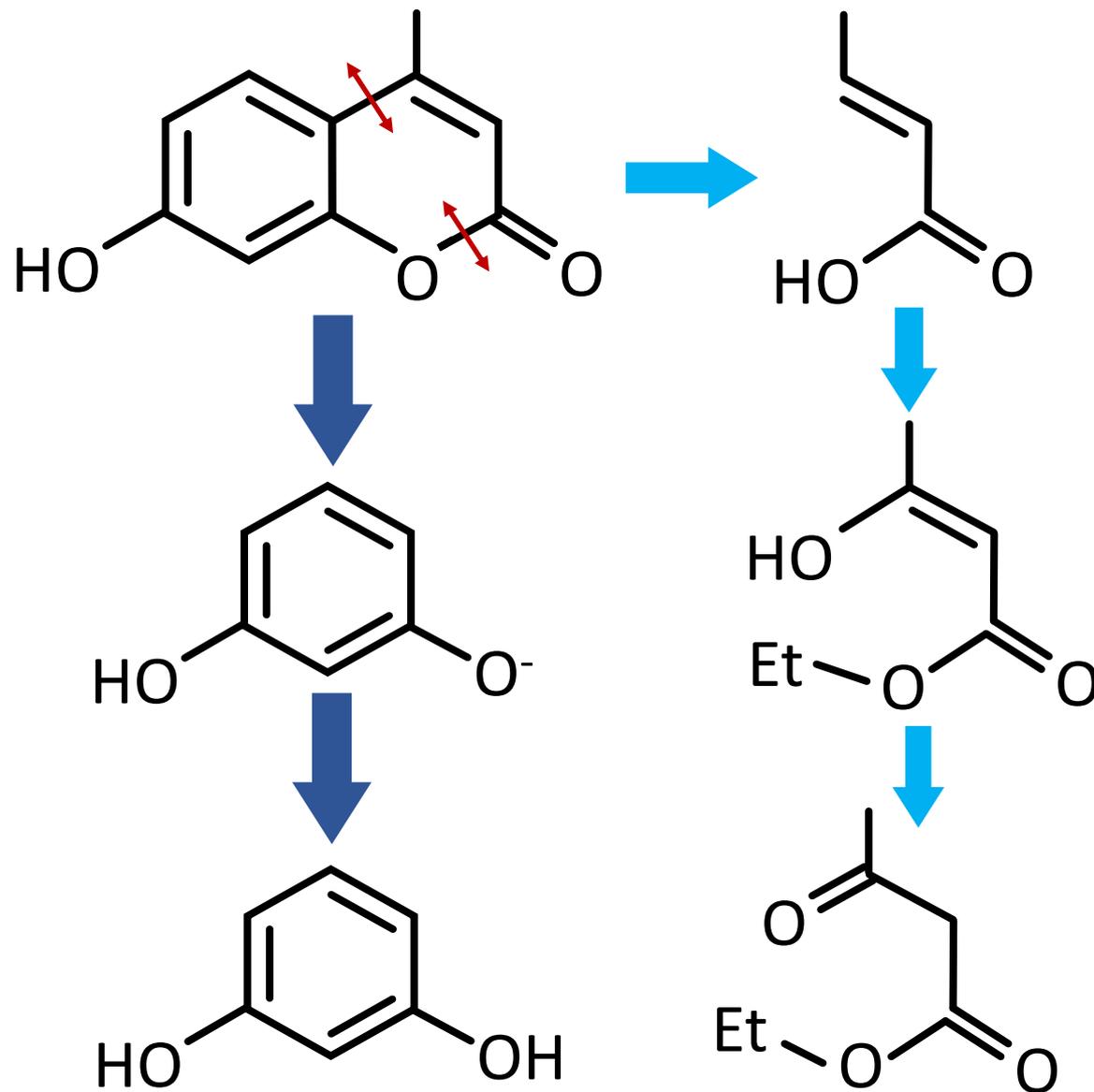
6



# I.1 - Synthèse : Une rétro-synthèse

6





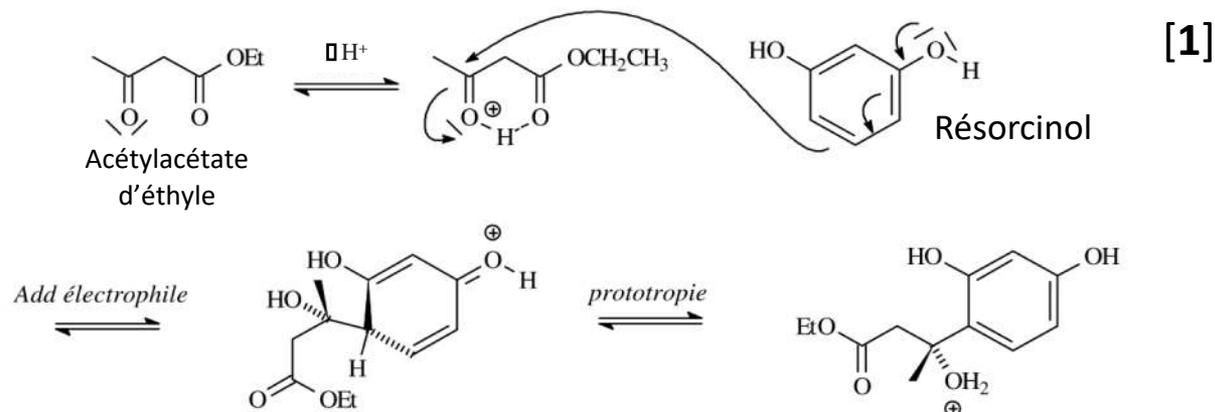
## STRATÉGIE

### réactifs

- Benzène-1,3-diol (résorcinol)
- Acétylacétate d'éthyle

### Étapes de synthèses attendues

- Transestérification
- Tautomérie céto-énolique
- Addition de Michael



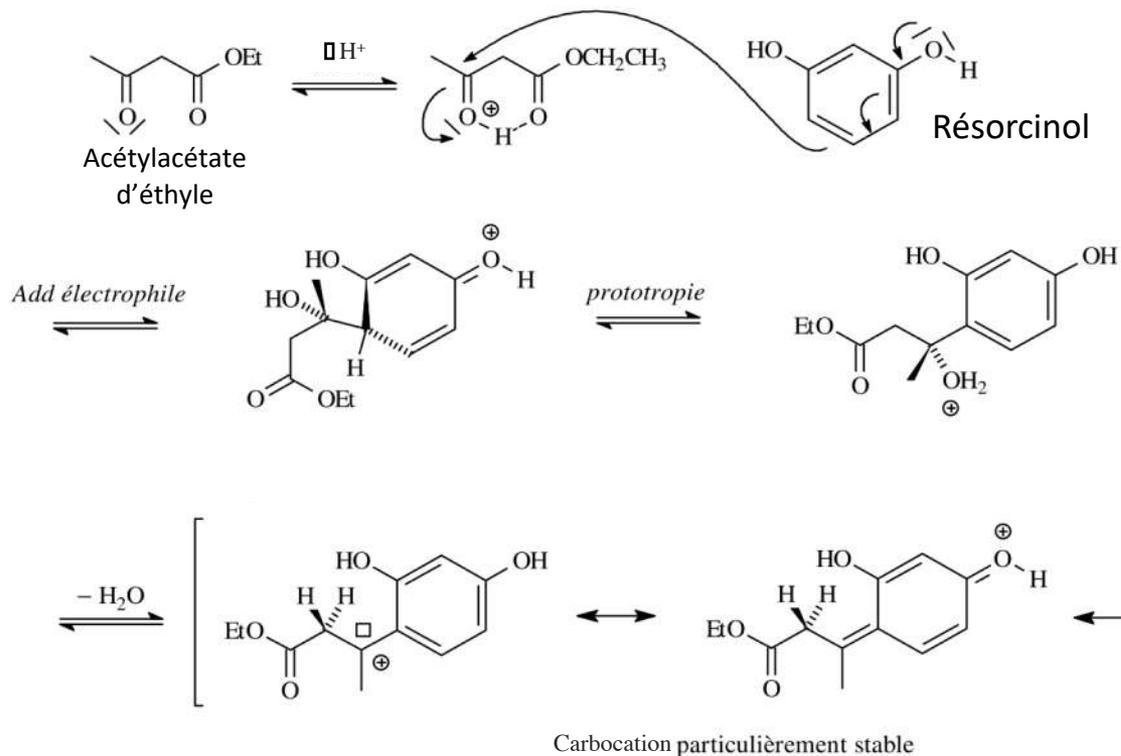
## Étapes de synthèses attendues après rétro-synthèse

- Addition de Michael
- Tautomérie céto-énolique
- Transestérification

# I.1 - Synthèse : Le mécanisme

7

[1]



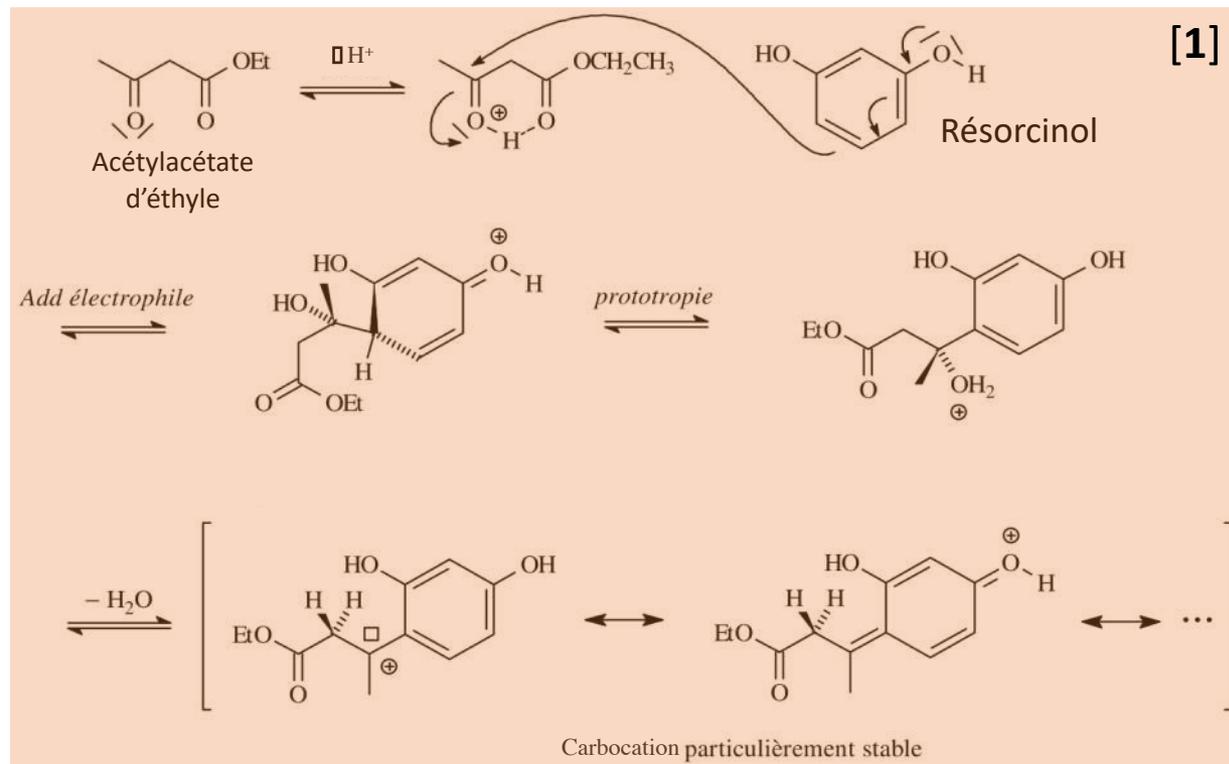
## Étapes de synthèses attendues après rétro-synthèse

- Addition de Michael
- Tautomérie céto-énolique
- Transestérification

[1] Mécanisme possible proposé par : Julien Lalande et Arnaud Parenty : Synthèse d'une coumarine : L'Actualité Chimique, mars 2003, page 30.

## Étapes de synthèses attendues après rétro-synthèse

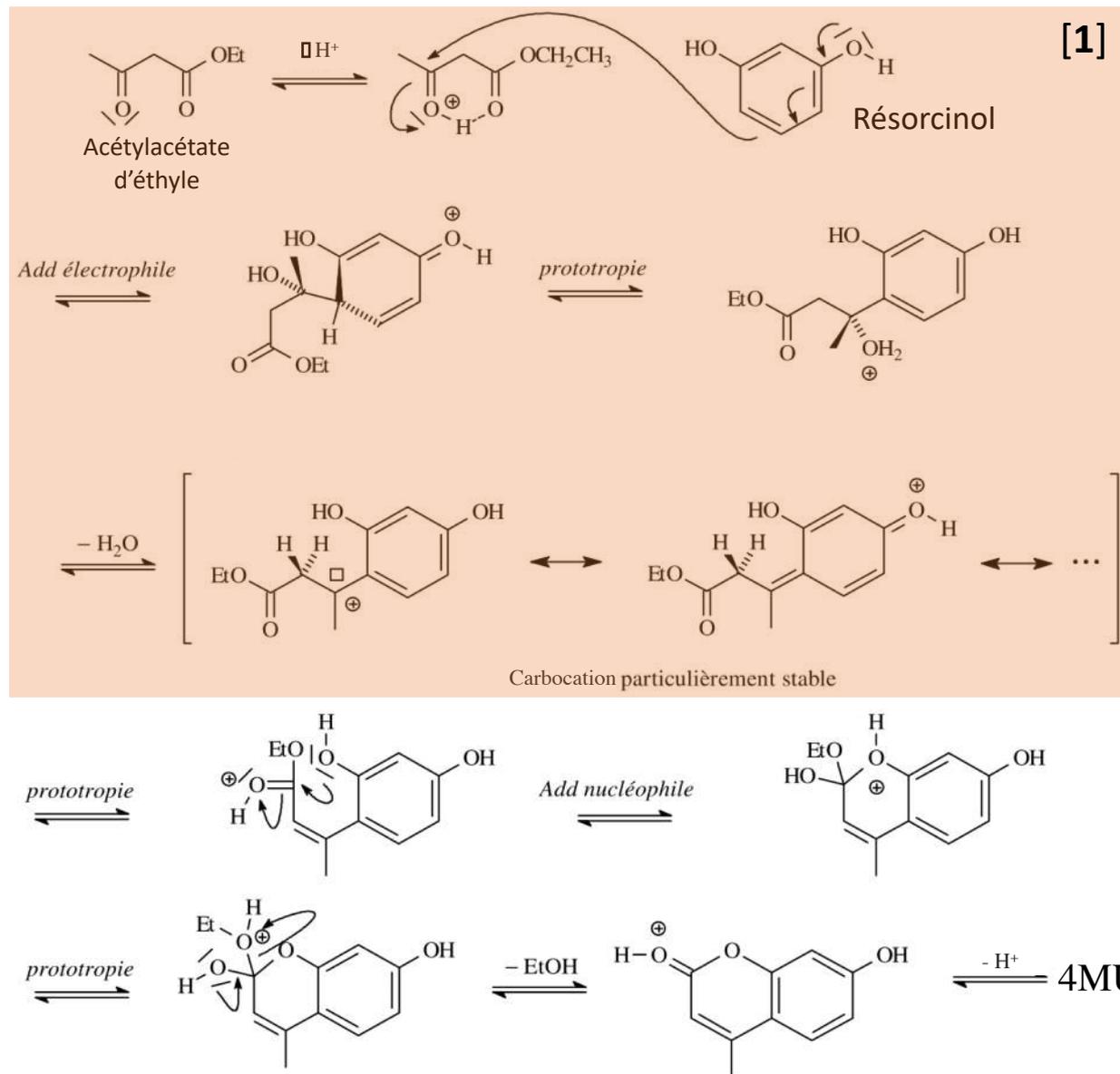
- Addition de Michael
- Tautomérisation céto-énolique
- Transestérification



[1] Mécanisme possible proposé par : Julien Lalande et Arnaud Parenty : Synthèse d'une coumarine : L'Actualité Chimique, mars 2003, page 30.

## Étapes de synthèses attendues après rétro-synthèse

- Addition de Michael
- Tautomérisation céto-énolique
- Transestérification



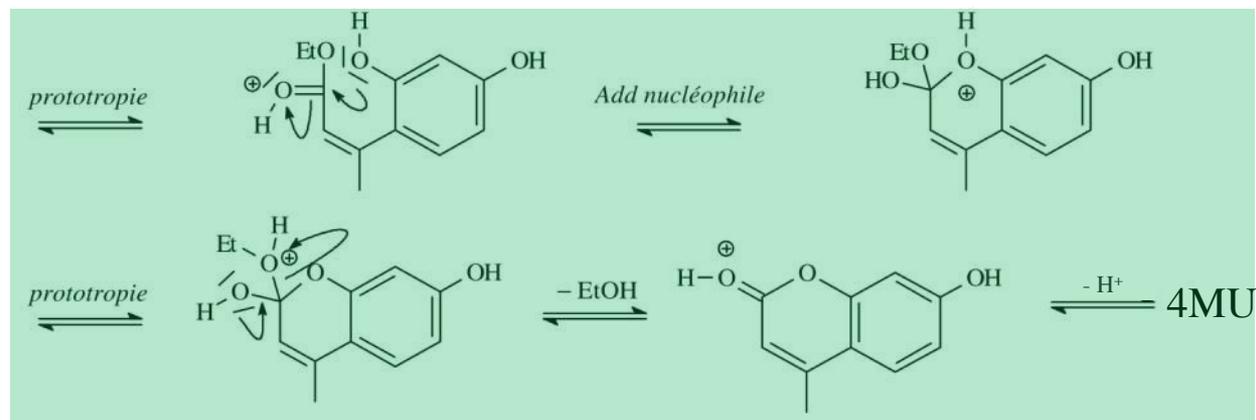
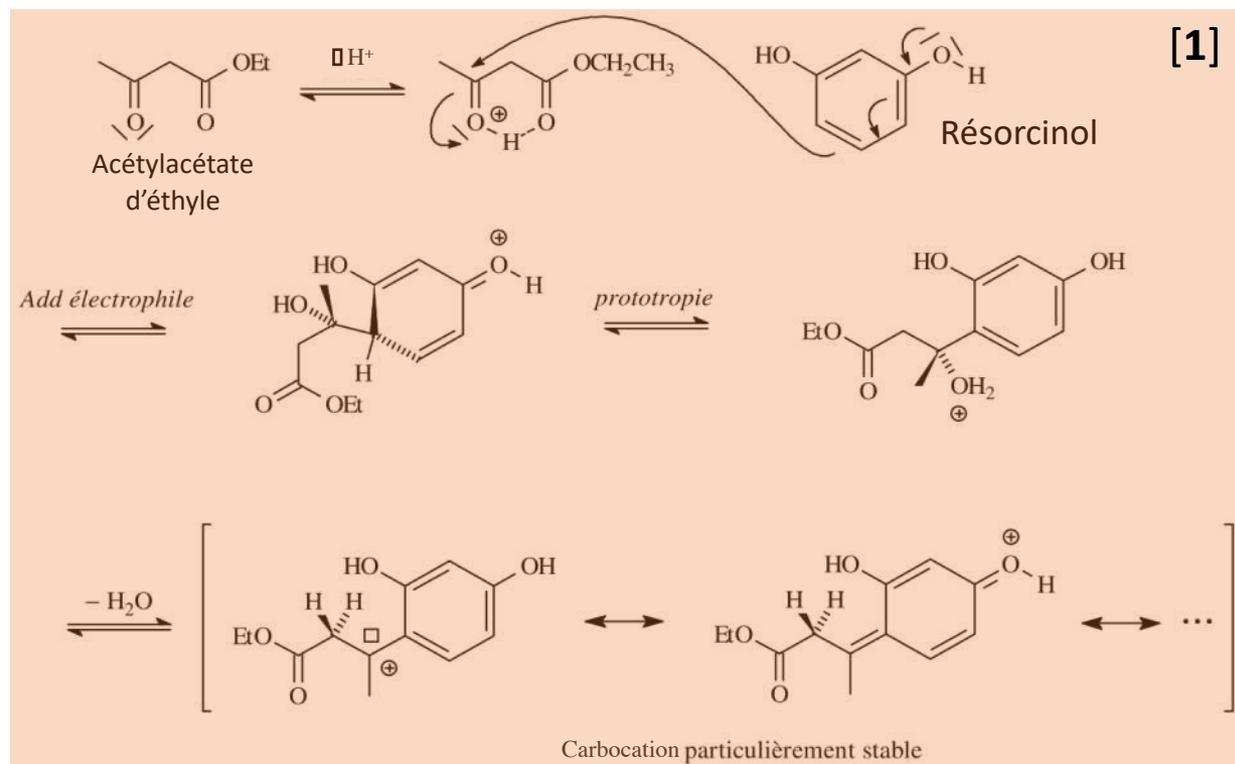
[1] Mécanisme possible proposé par : Julien Lalande et Arnaud Parenty : Synthèse d'une coumarine : L'Actualité Chimique, mars 2003, page 30.

# I.1 - Synthèse : Le mécanisme

7

## Étapes de synthèses attendues après rétro-synthèse

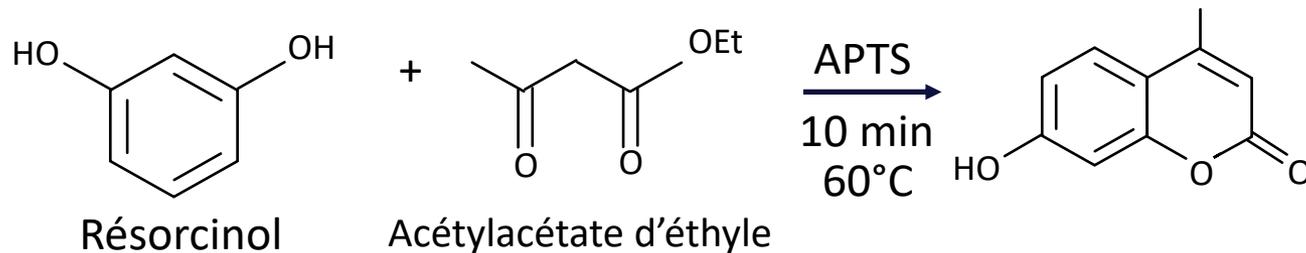
- Addition de Michael
- Tautomérie céto-énolique
- Transestérification



[1] Mécanisme possible proposé par : Julien Lalande et Arnaud Parenty : Synthèse d'une coumarine : L'Actualité Chimique, mars 2003, page 30.

# I.3 - Synthèse : La synthèse

8



Réactifs	État Physique	Masse (en g)	Masse molaire (mL)	Quantité (mmol)	EQ
Résorcinol	Solide	2,20	110	20	1
Acétylacétate d'éthyle	Liquide	2,60	130,14	20	1
APTS	solide	0,18	173	380	0,05

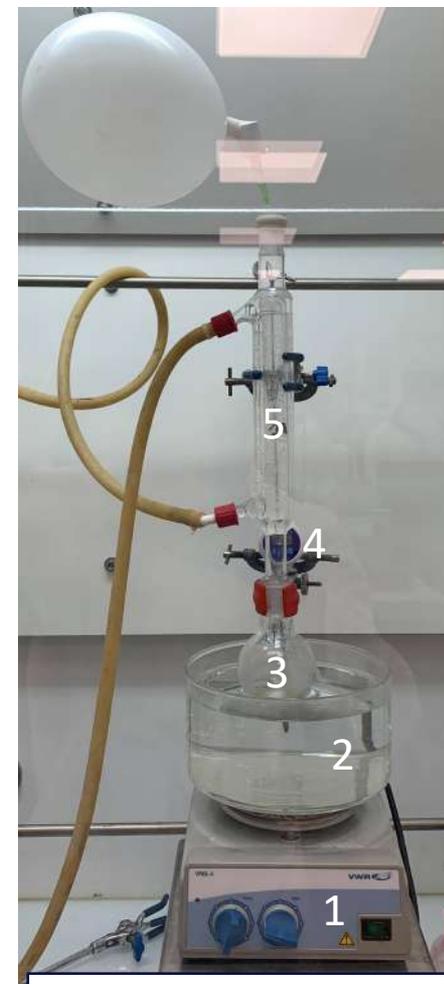
1 – Agitateur magnétique chauffant

2 – Cristalliseur contenant de l'eau à 60°C

3 – APTS, résorcinol, Acétylacétate d'Et

4 – Thermomètre

5 – Réfrigérant à eau



Montage utilisé lors de la synthèse

# I.3 - Synthèse : La synthèse



Extraction au dichlorométhane  
puis évaporateur rotatif



# I.3 - Synthèse : La synthèse



Extraction au dichlorométhane  
puis évaporateur rotatif



Cristaux bruts

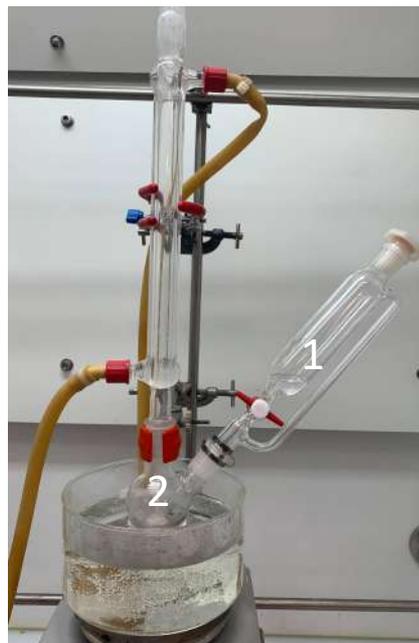
# I.3 - Synthèse : La synthèse



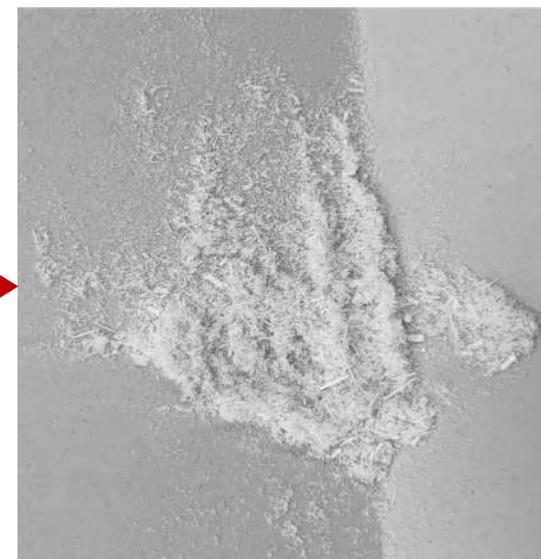
Extraction au dichlorométhane puis évaporateur rotatif



Cristaux bruts



1 – éthanol 70%  
2 – cristaux bruts  
Recristallisation



Cristaux finaux obtenus

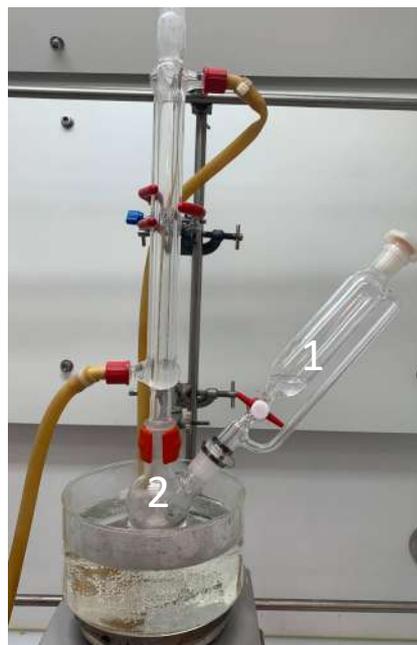
# I.3 - Synthèse : La synthèse



Extraction au dichlorométhane puis évaporateur rotatif

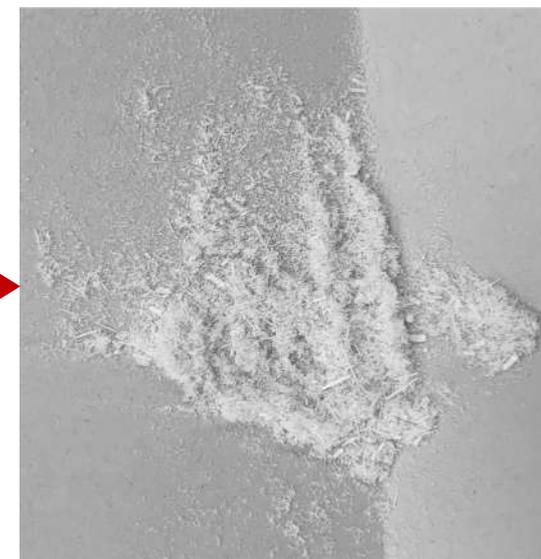


Cristaux bruts



- 1 – éthanol 70%
- 2 – cristaux bruts

Recristallisation



Cristaux finaux obtenus

## Bilan

Masse obtenue = 1,57  
Rendement :  $\eta = 36\%$

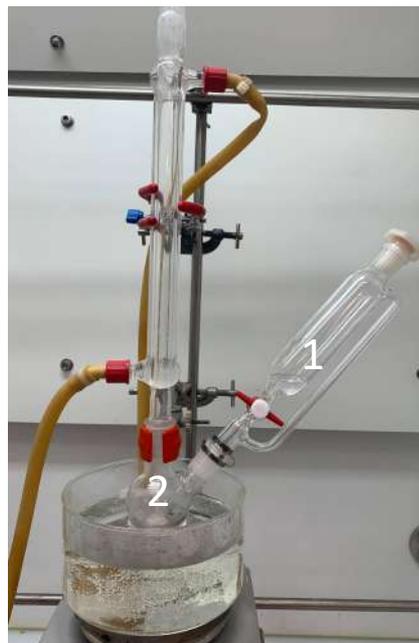
# I.3 - Synthèse : La synthèse



Extraction au dichlorométhane puis évaporateur rotatif

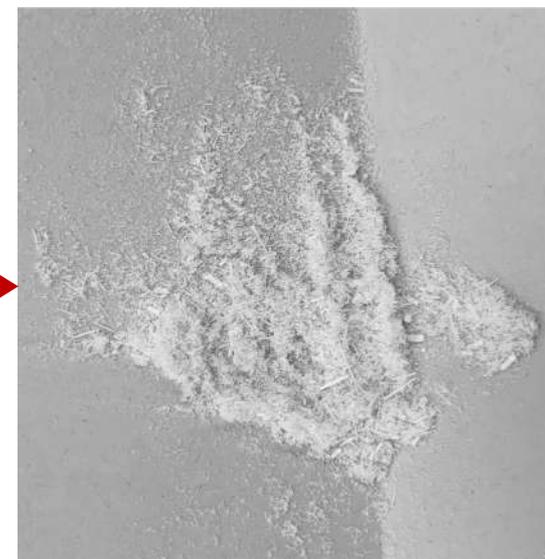


Cristaux bruts



1 – éthanol 70%  
2 – cristaux bruts

Recristallisation



Cristaux finaux obtenus

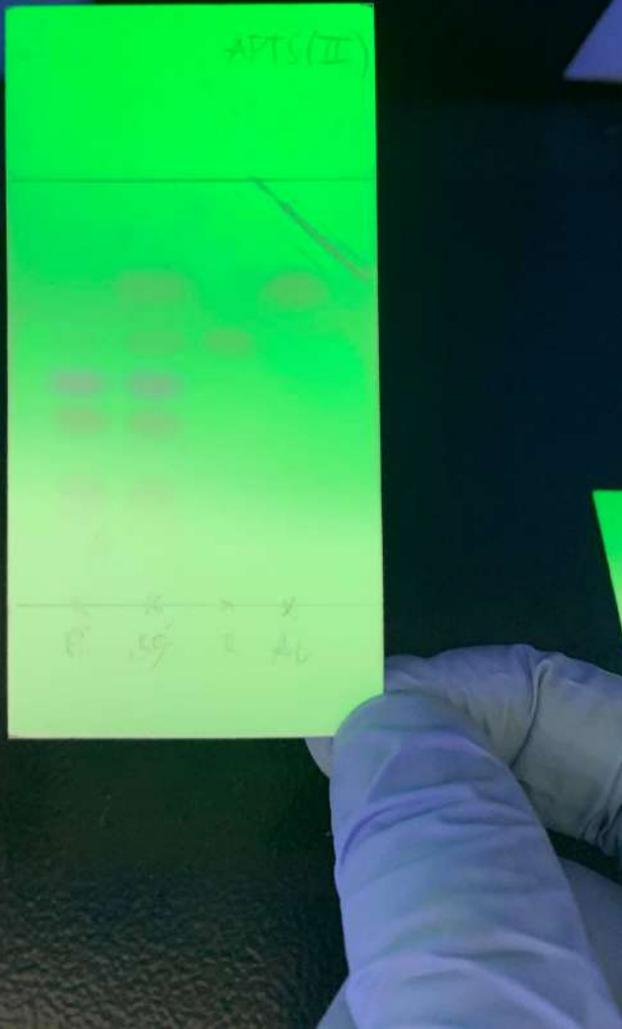
## Bilan

Masse obtenue = 1,57  
Rendement :  $\eta = 36\%$

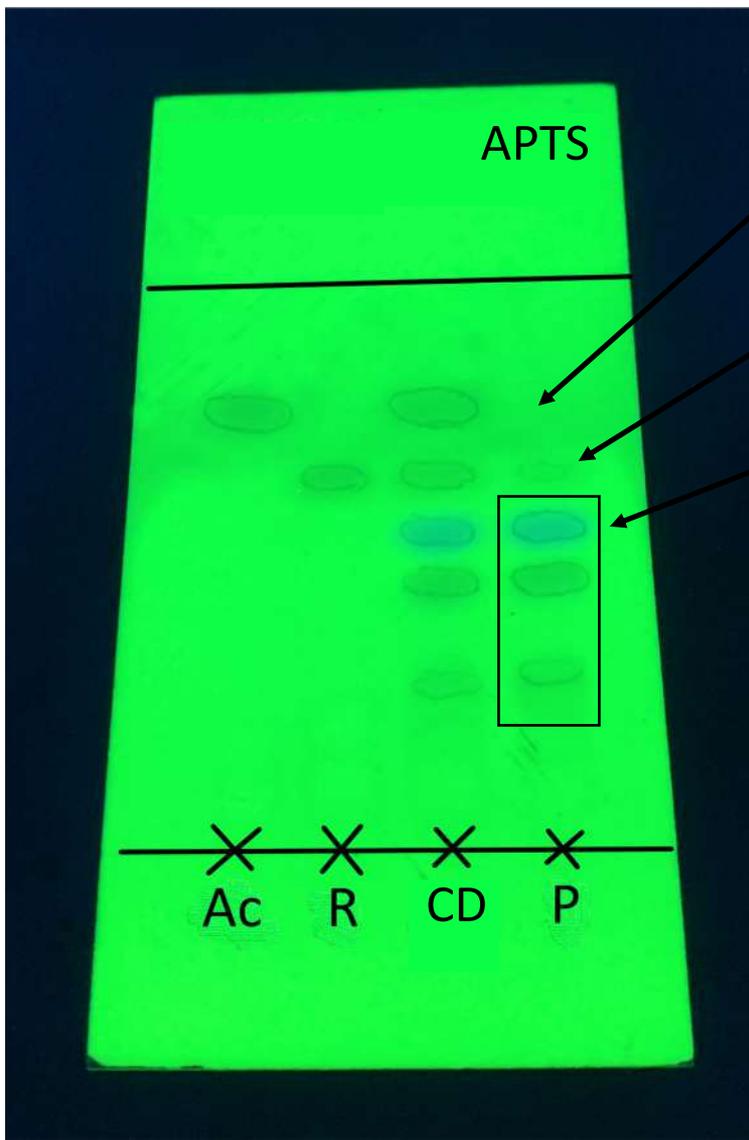
Nouvelle méthode :

- rapide
- sans solvant
- efficace ?

Méthode de synthèse de choix



# LES CARACTÉRISATIONS



Plus d'acétylacétate d'éthyle

Traces de résorcinol

- Produit fluorescent
- Impuretés

**Rf** : produit 0,52  
impuretés 0,43  
et 0,28

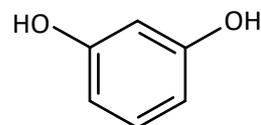
**Éluant** :  
Cyclohexane/  
acétoacétate  
d'éthyle 60/40

**Bilan** : il y a bien eu une **transformation**  
mais le produit nous est inconnu

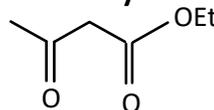
P : produit

CD : co-dépôt

R : résorcinol

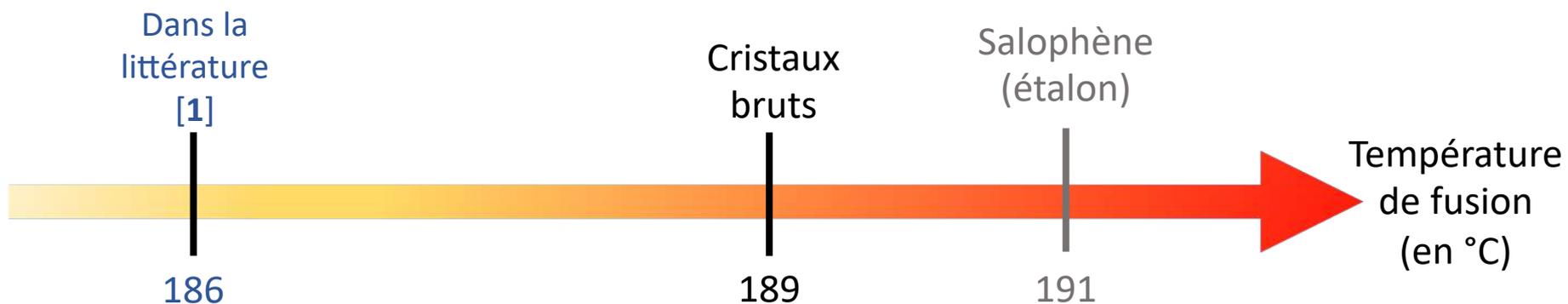


Ac : acétylacétate d'éthyle



Produit d'intérêt

?



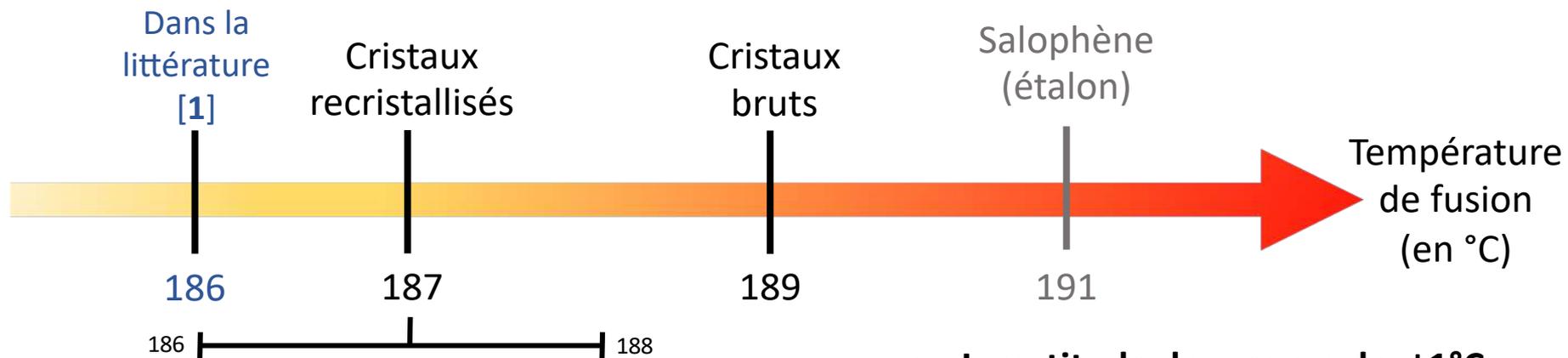
Températures de fusion mesurées avec le banc Kofler

- Incertitude de mesure de  $\pm 1^\circ\text{C}$   
→ La mesure est **cohérente** avec la température de fusion théorique des cristaux purs

Produit d'intérêt

?





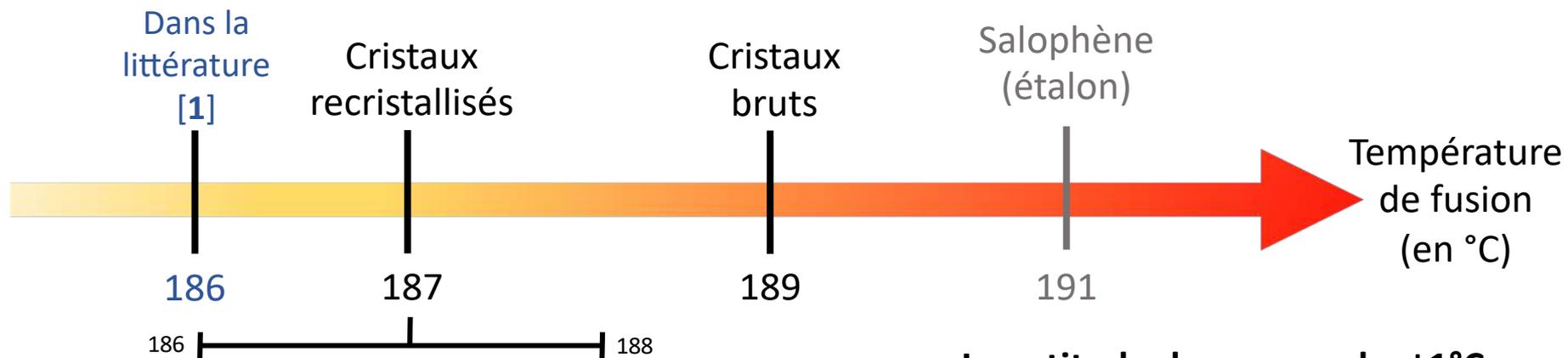
Températures de fusion mesurées avec le banc Kofler

- Incertitude de mesure de  $\pm 1^\circ\text{C}$   
→ La mesure est **cohérente** avec la température de fusion théorique des cristaux purs

Produit d'intérêt

?



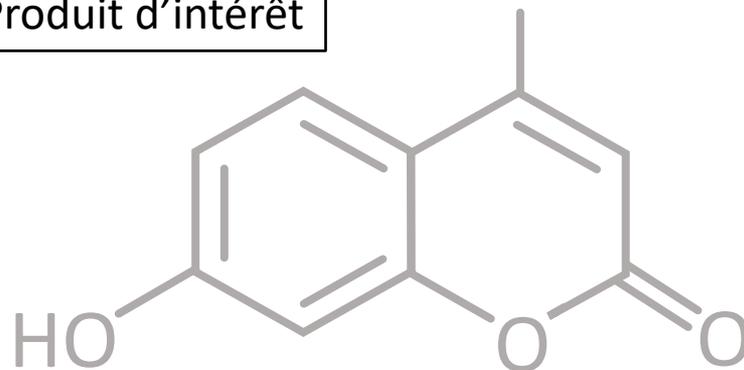


Températures de fusion mesurées avec le banc Kofler

- Incertitude de mesure de  $\pm 1^\circ\text{C}$   
→ La mesure est **cohérente** avec la température de fusion théorique des cristaux purs

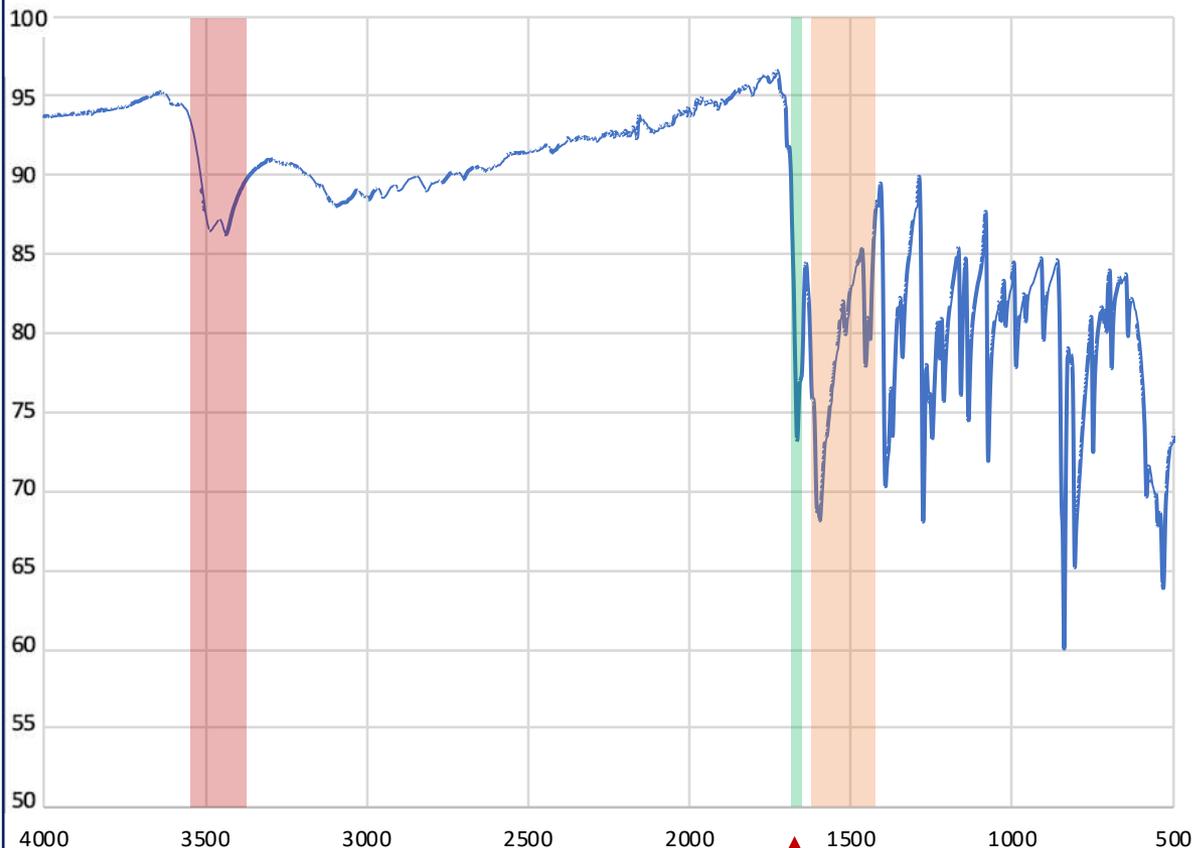


Produit d'intérêt



## II.3 - Caractérisation : Infrarouge

13



3450  $\text{cm}^{-1}$   
(Alcool ou amine)  
→ O-H **Phénol**

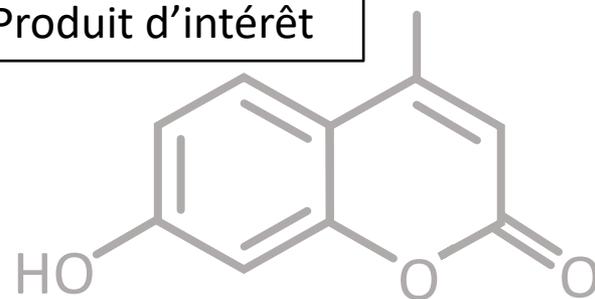
1640  $\text{cm}^{-1}$   
(un peu faible)  
→ C=O **lactones**

1410-1580  $\text{cm}^{-1}$   
2-3 pics  
→ C=C  
**aromatique**



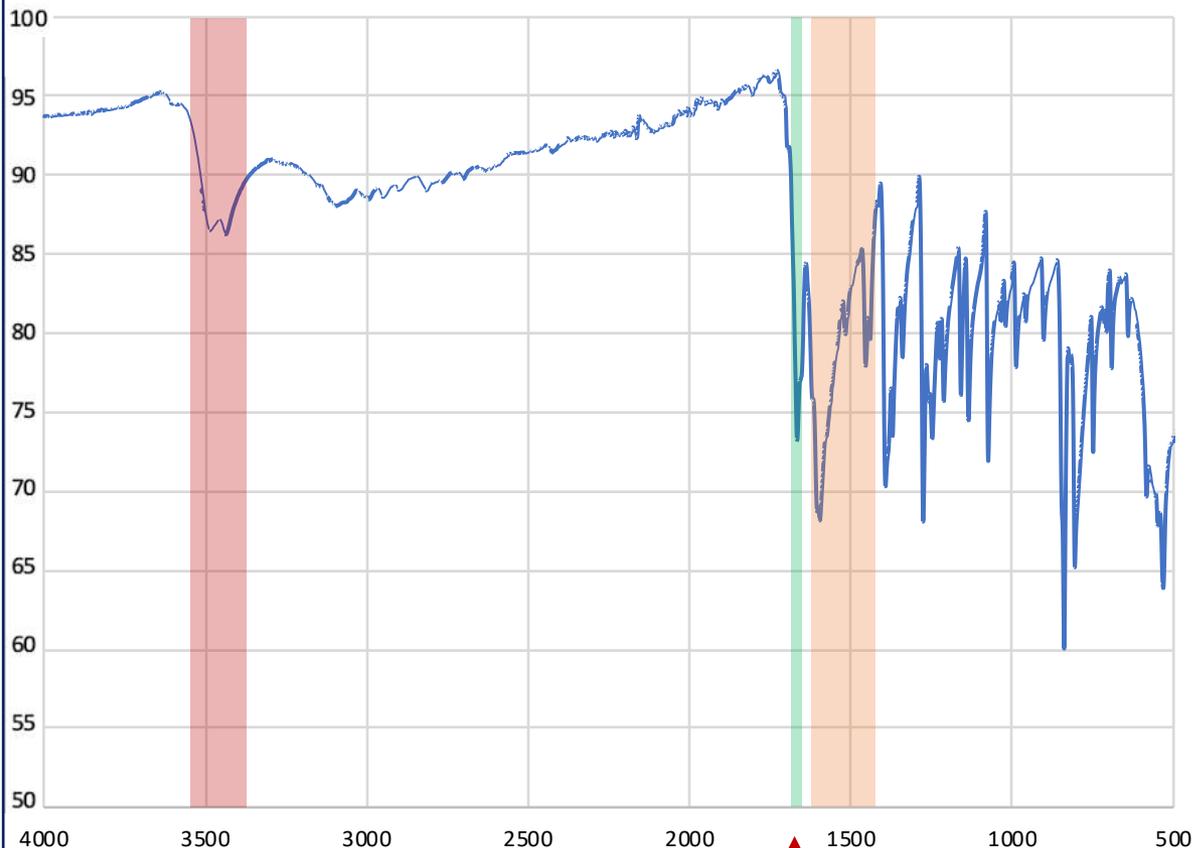
Spectrophotomètre infrarouge

Produit d'intérêt



## II.3 - Caractérisation : Infrarouge

13



3450  $\text{cm}^{-1}$   
(Alcool ou amine)  
→ O-H **Phénol**

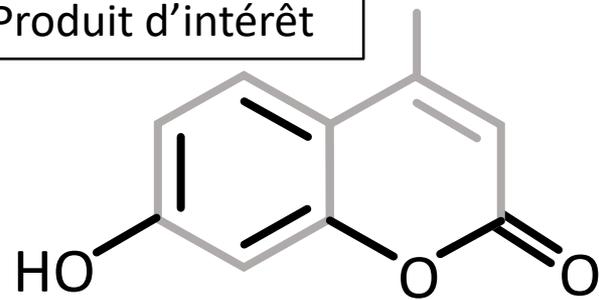
1640  $\text{cm}^{-1}$   
(un peu faible)  
→ C=O **lactones**

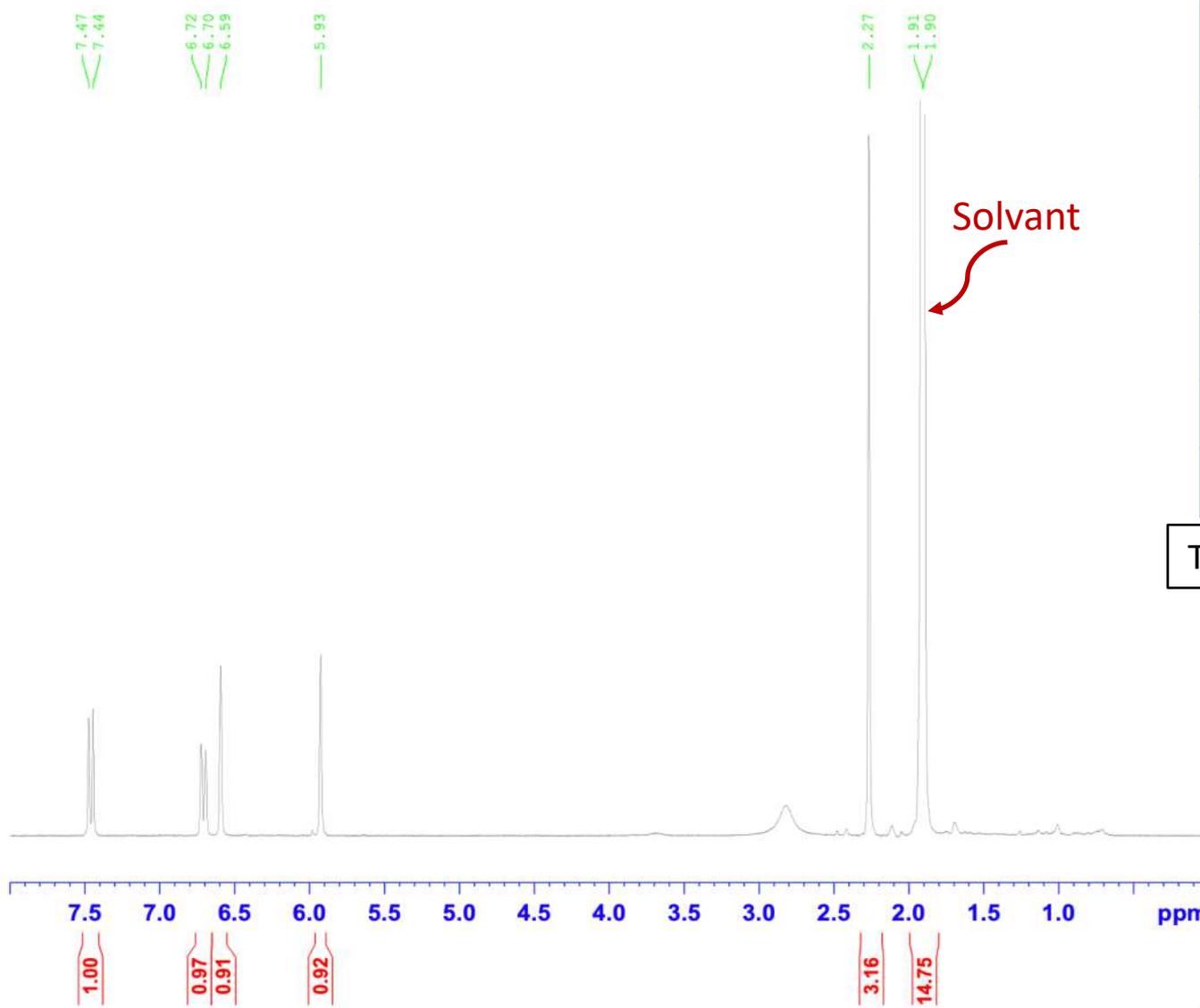
1410-1580  $\text{cm}^{-1}$   
2-3 pics  
→ C=C  
**aromatique**



Spectrophotomètre infrarouge

Produit d'intérêt

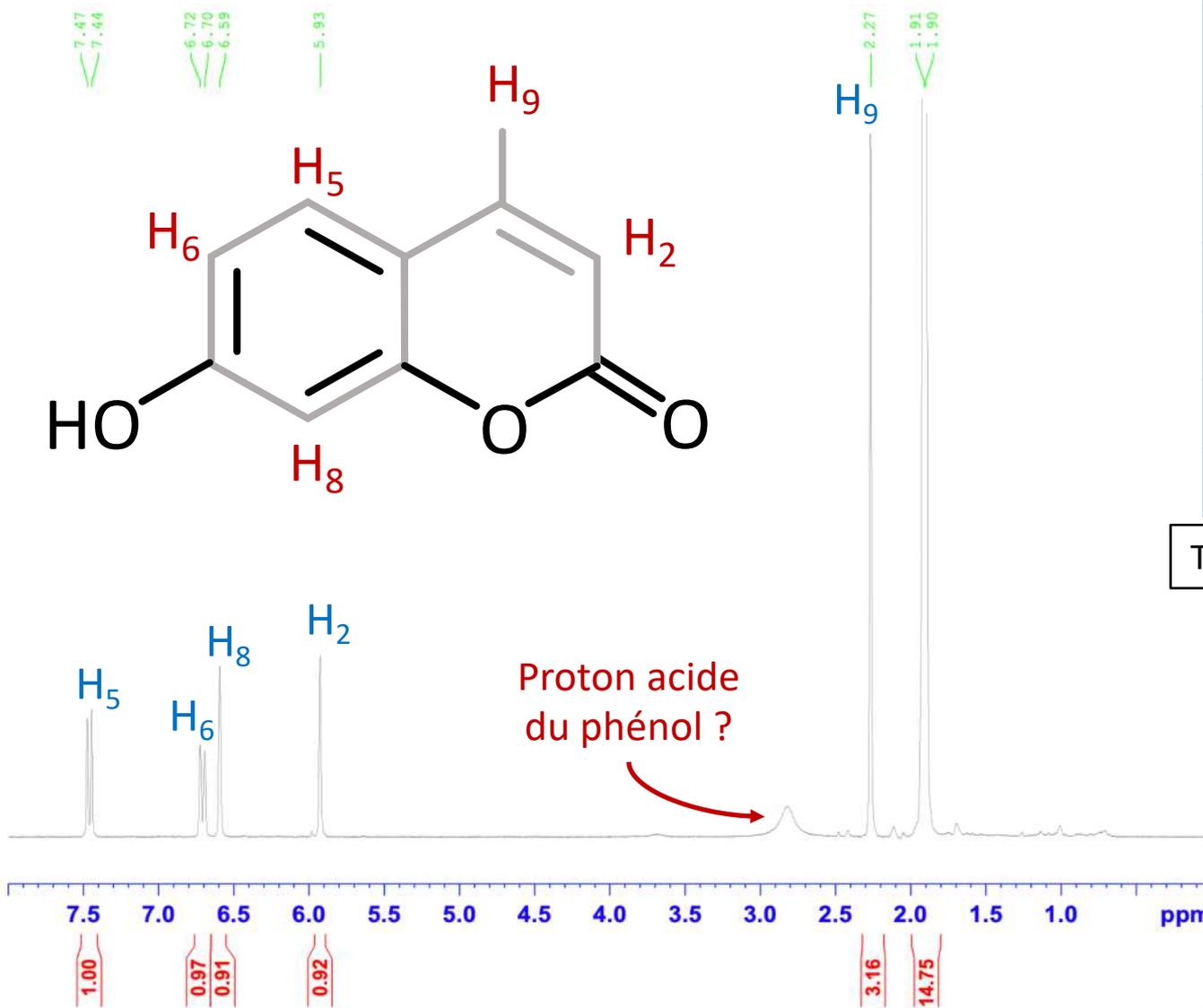
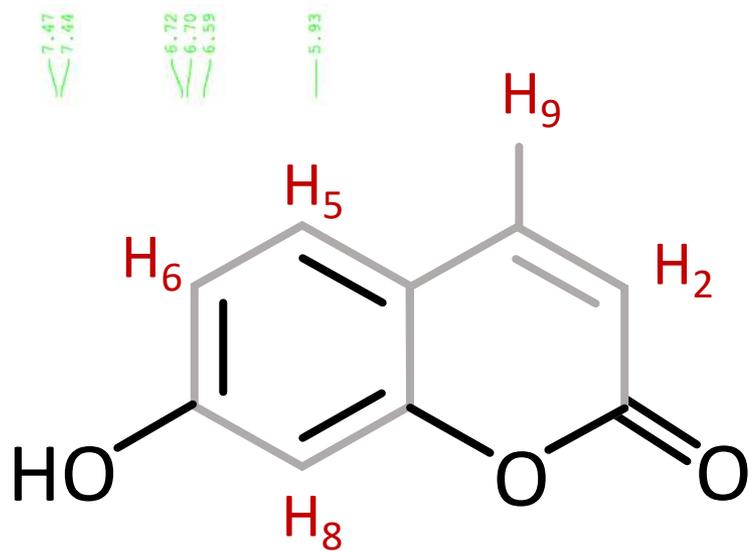




$\delta$ (ppm)	Nb de protons	Mult
1,9	15	s
2,27	3	s
5,93	1	s
6,59	1	s
6,71	1	d
7,45	1	d

Tableau bilan du spectre RMN

Spectre de résonance magnétique nucléaire du proton réalisée par l'institut Lavoisier

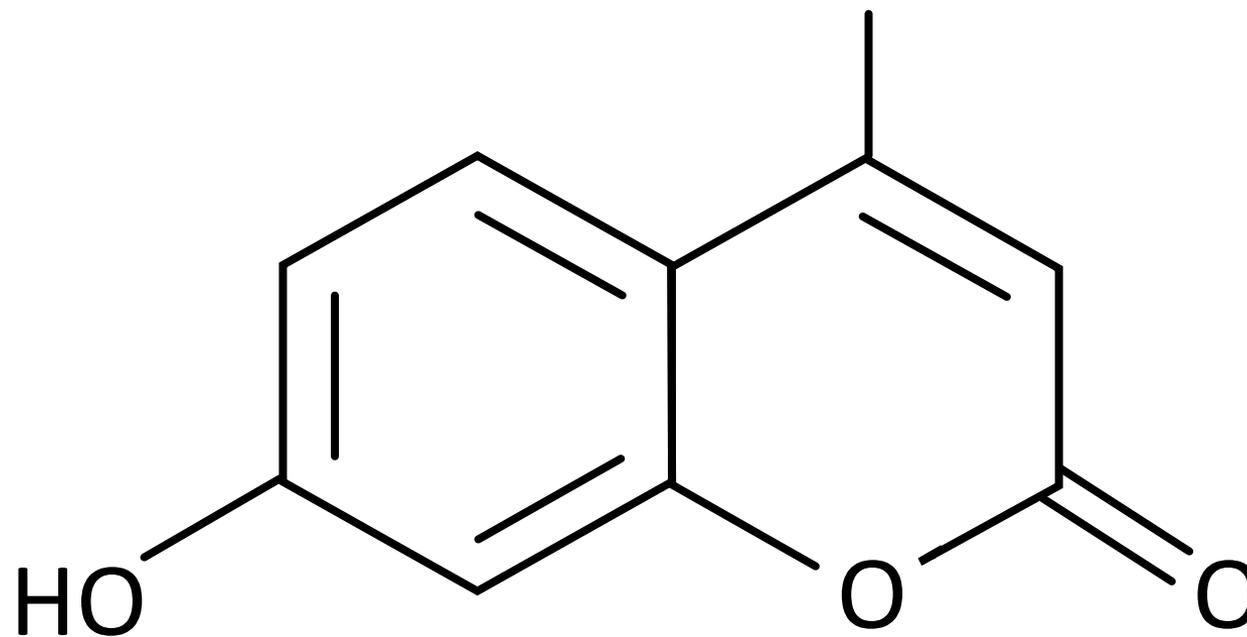


$\delta$ (ppm)	Nb de protons	Mult
1,9	15	s
2,27	3	s
5,93	1	s
6,59	1	s
6,71	1	d
7,45	1	d

Tableau bilan du spectre RMN

Spectre de résonance magnétique nucléaire du proton réalisée par l'institut Lavoisier

Produit d'intérêt



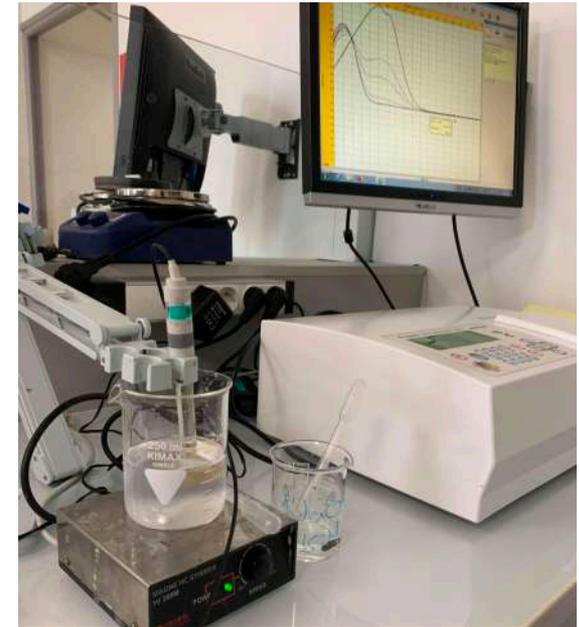
7-hydroxy-4-méthylcoumarine

# Propriétés

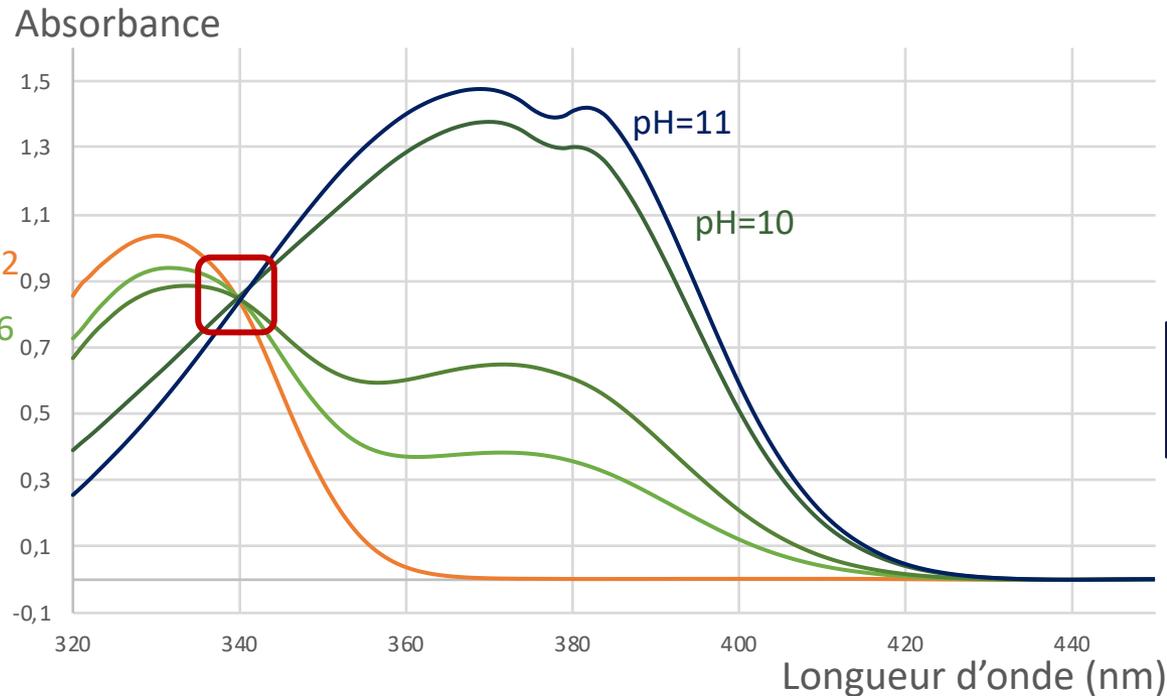


## Préparation de la solution :

- 200 mL de solution contenant de la 4MU (100 mL de DMSO + 100 mL de solution tampon)
- Concentration finale en 4MU :  $C = 1,15 \text{ mol. L}^{-1}$



Montage utilisé pour tracer les spectres d'absorbance

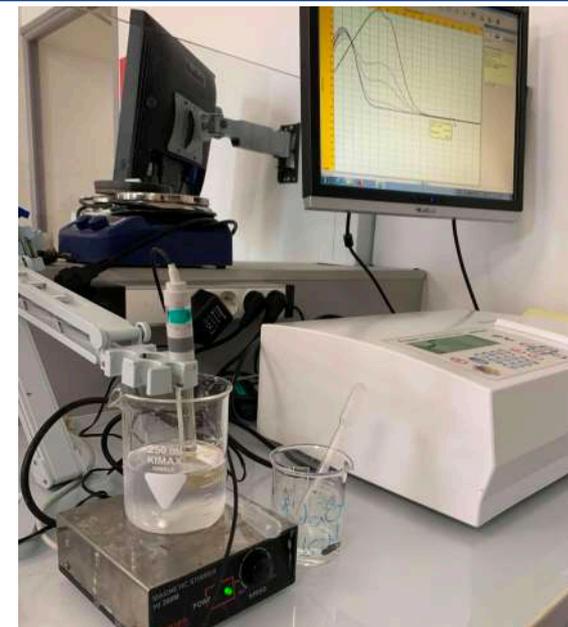


# III.1 - Propriétés : Dépendance au pH

17

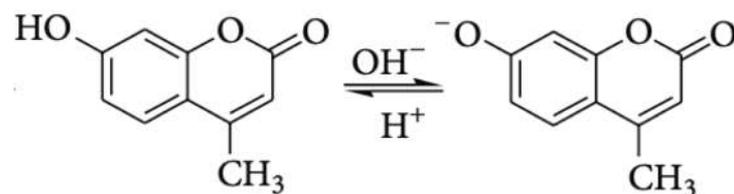
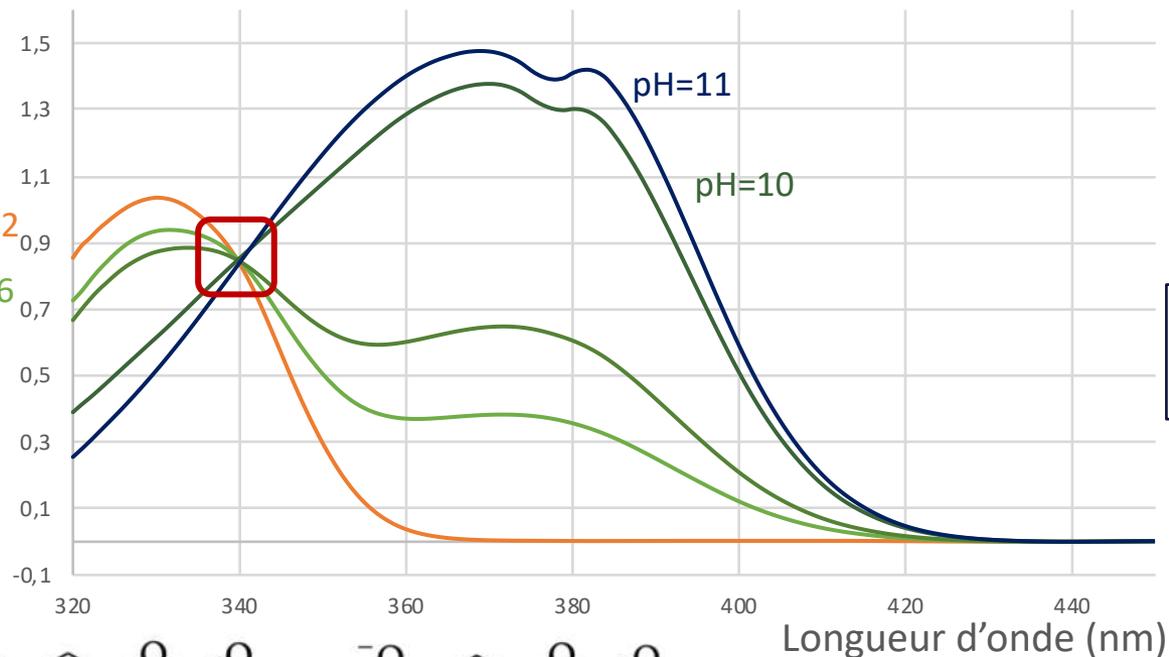
## Préparation de la solution :

- 200 mL de solution contenant de la 4MU (100 mL de DMSO + 100 mL de solution tampon)
- Concentration finale en 4MU :  $C = 1,15 \text{ mol. L}^{-1}$



Montage utilisé pour tracer les spectres d'absorbance

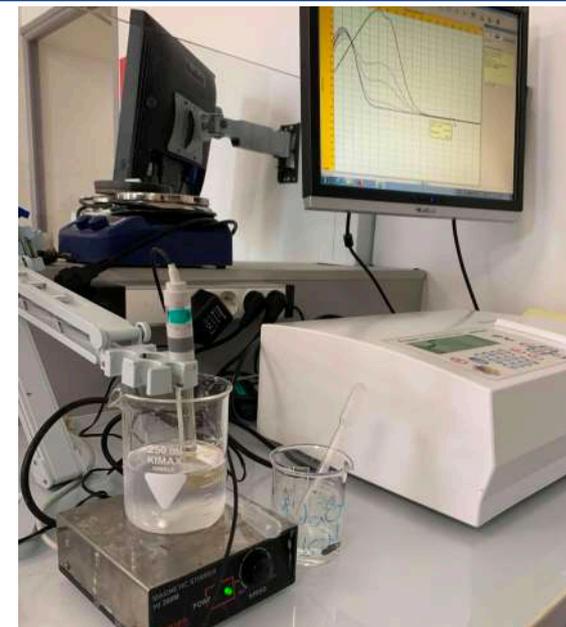
Absorbance



Couple acido-basique de la 4MU

## Préparation de la solution :

- 200 mL de solution contenant de la 4MU (100 mL de DMSO + 100 mL de solution tampon)
- Concentration finale en 4MU :  $C = 1,15 \text{ mol. L}^{-1}$



Montage utilisé pour tracer les spectres d'absorbance

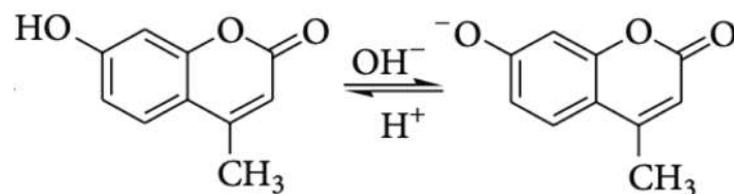
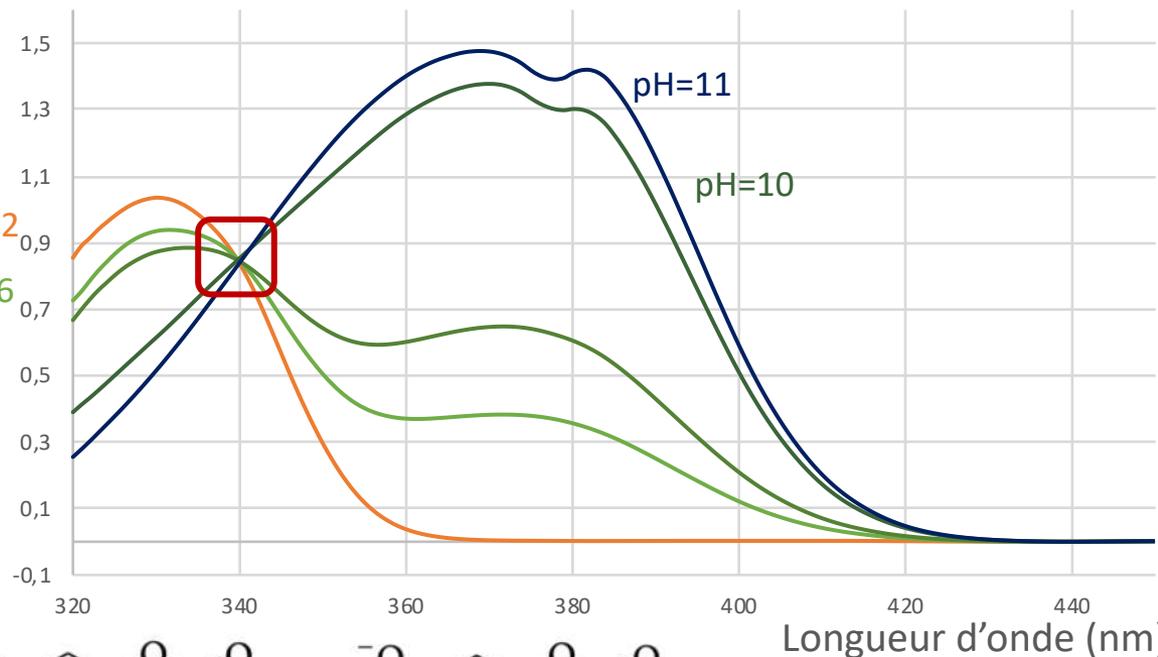
## Calcul du pKa :

$$pka = pH_{int} - \log \left( \frac{A_{int} - A_{acide}}{A_{basique} - A_{int}} \right)$$

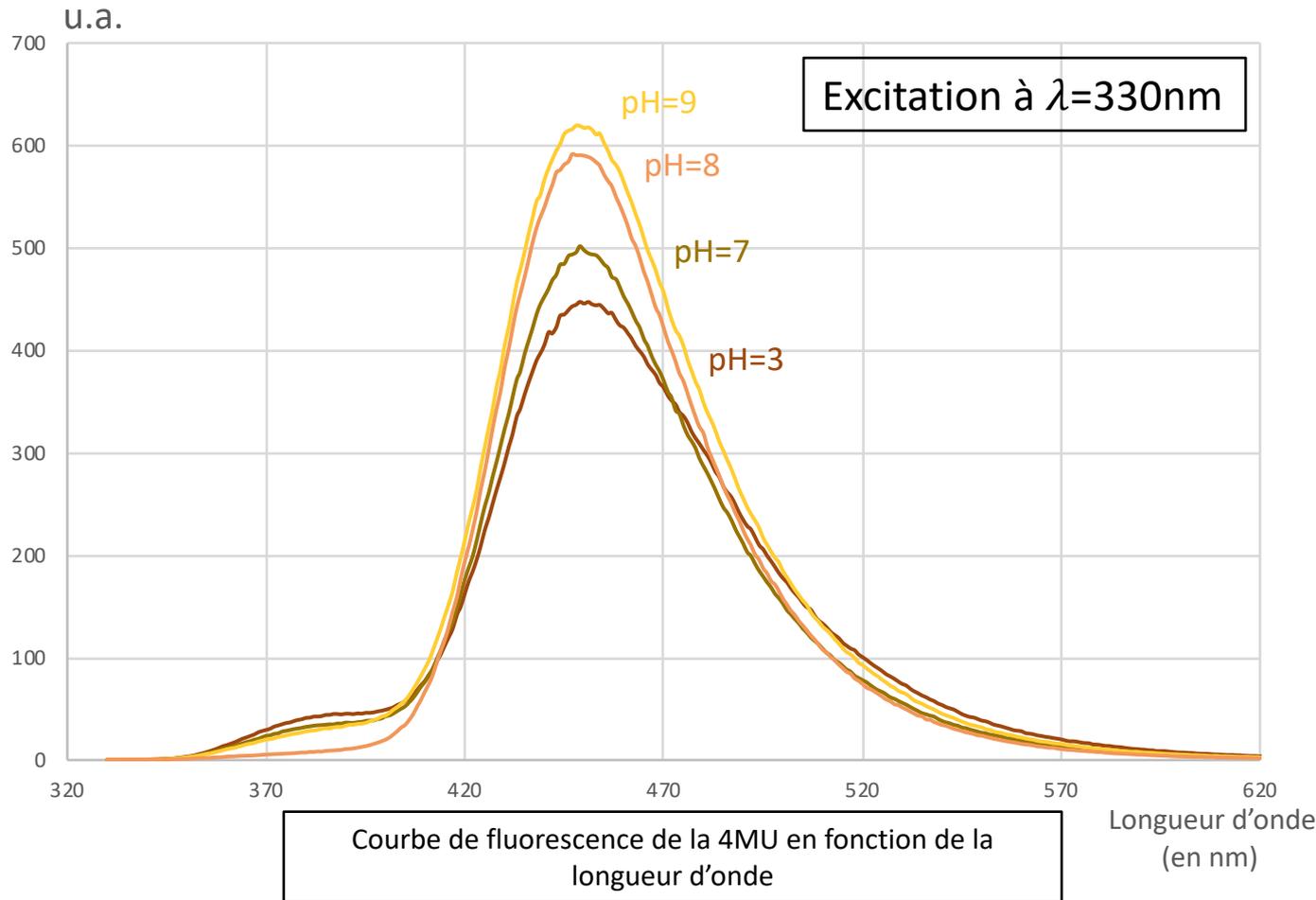
**pKa = 7,9 ± 0,1**

(pKa = 7,9 dans la littérature [1])

Absorbance



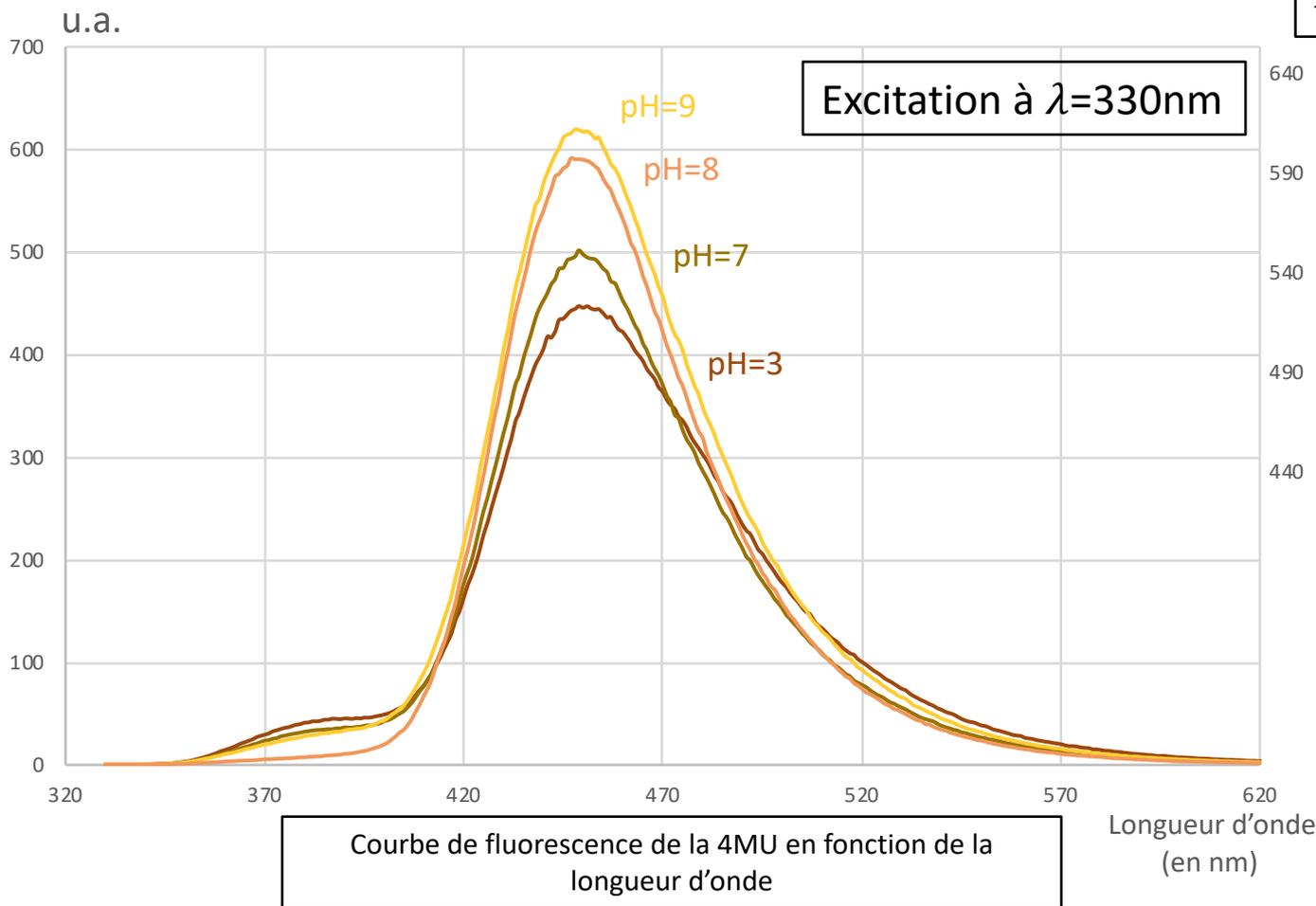
Couple acido-basique de la 4MU



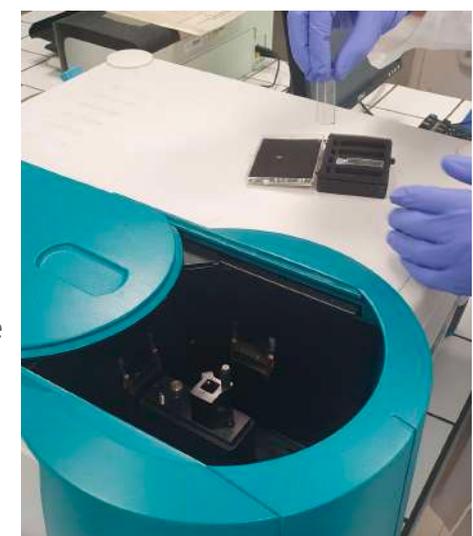
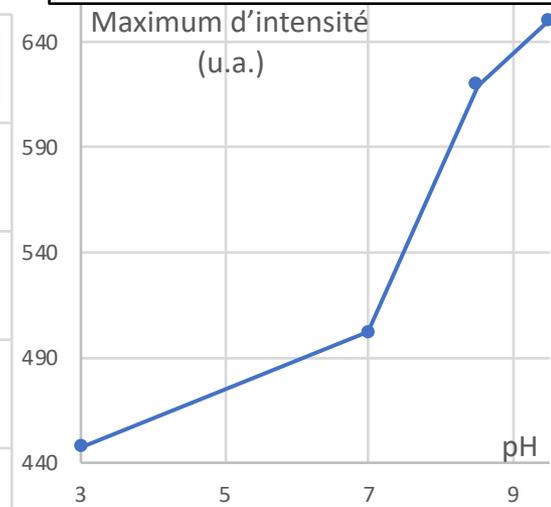
**Observations :** Si variation du pH, variation de l'intensité d'émission



Fluorimètre de l'institut de Versailles



Variation de la longueur d'onde de fluorescence max en fonction du pH



Fluorimètre de l'institut de Versailles

**Observations :** Si variation du pH, variation de l'intensité d'émission

# III.2 - Propriétés : Propriétés fluorescentes

18

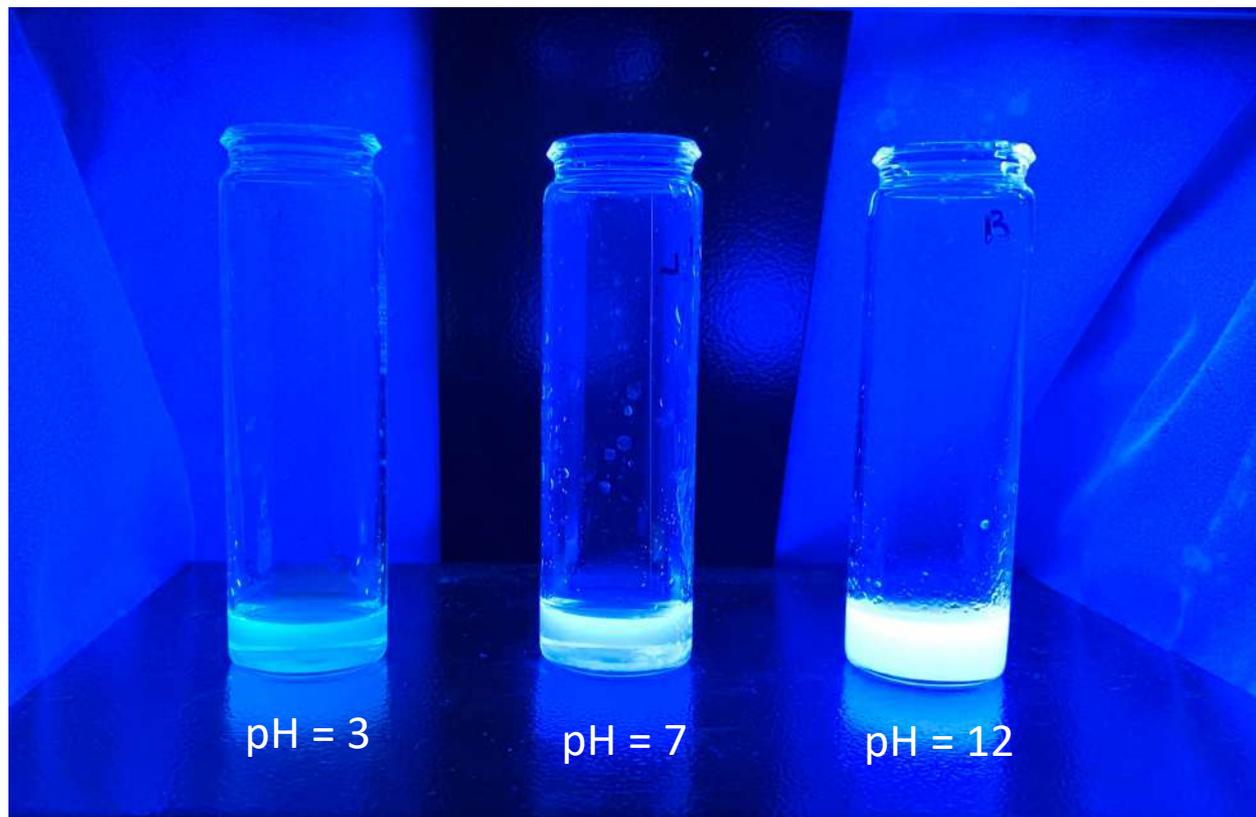
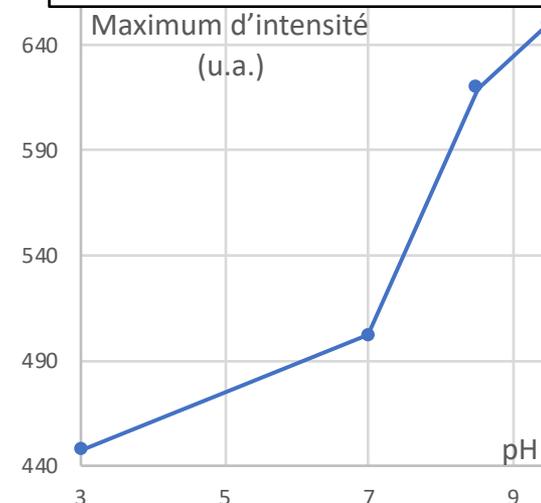


Photo illustrant la fluorescence de la 4MU à différents pH

Longueur d'onde  
(en nm)

Variation de la longueur d'onde de fluorescence max en fonction du pH



**Observations :** Si variation du pH, variation de l'intensité d'émission

**Conclusion :** Variation pas suffisamment importante pour une utilisation au pH biologique



Fluorimètre de l'institut de Versailles

## Problématique

Comment synthétiser et caractériser une molécule fluorochrome et étudier ses interactions dans le but d'en faire une sonde pH fluorescente? Quelle efficacité et quelles limites rencontrons-nous?



Synthèse perfectible

Cristaux obtenus purs



La dépendance de la fluorescence en fonction du pH est bonne bien que non-idéale

Pas d'étude sur la toxicité de la 4MU

Technique intéressantes pour le domaine médical

Travailler sur une autre coumarine ?

### Remerciements

Merci Monsieur Flavien Bourdreux  
Merci à Monsieur Marc Lepeltier  
Et bien sûr, merci à notre professeur encadrant  
**Sans qui cet exposé n'aurait pu exister.**

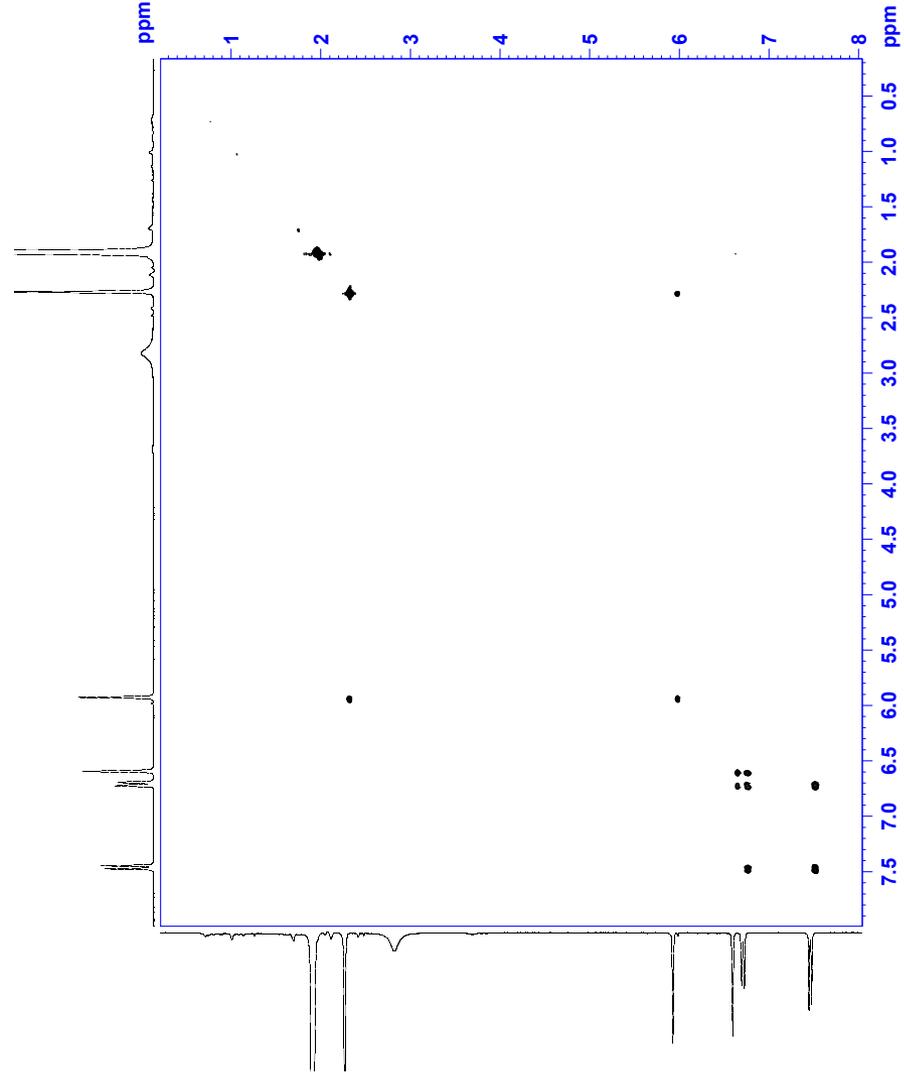


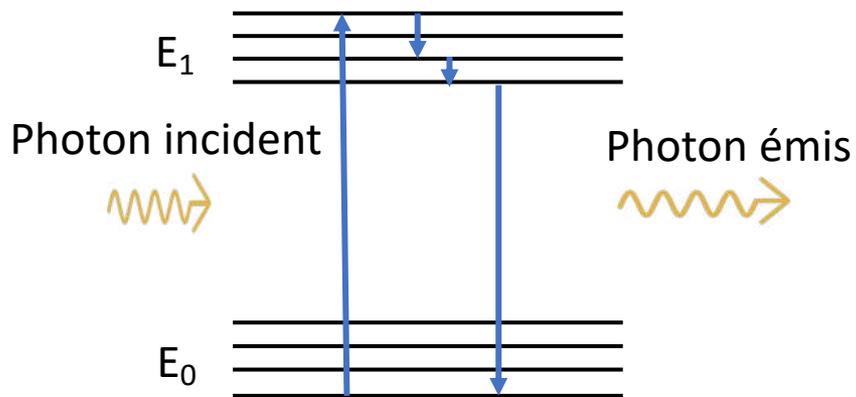
Flavien Bourdreux



Marc Lepeltier

# ANNEXE





**Relation de Plank-Einstein**

$$E = h \frac{c}{\lambda}$$

