



HAL
open science

Développement de nouveaux chromophores basés sur le groupement tricyanofurane pour différentes applications en biologie

Martin Ipuy

► **To cite this version:**

Martin Ipuy. Développement de nouveaux chromophores basés sur le groupement tricyanofurane pour différentes applications en biologie. Chimie organique. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2014. Français. NNT : 2014ENSL0951 . tel-01127053

HAL Id: tel-01127053

<https://theses.hal.science/tel-01127053>

Submitted on 6 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lyon, délivré par l'École Normale Supérieure de Lyon

Discipline : Chimie

Laboratoire de Chimie de l'ENS de Lyon

École Doctorale de chimie de Lyon

présentée et soutenue publiquement le 14 novembre 2014

par Monsieur Martin IPUY

Développement de nouveaux chromophores basés sur le groupement tricyanofurane
pour différentes applications en biologie

Directeur de thèse : Mme Chantal ANDRAUD

Devant la commission d'examen formée de :

Mme Chantal ANDRAUD, ENS de Lyon, Directrice

M. Yann BRETONNIERE, ENS de Lyon, Examineur

M. Anthony D'ALEO, Université d'Aix-Marseille, Examineur

M. Peter DALKO, Université Paris Descartes, Examineur

Mme Suzanne FERY-FORGUES, Université de Toulouse, Rapporteur

M. Gilles ULRICH, Université de Strasbourg, Rapporteur

Remerciements

Comme un rituel, les premiers mots que vous lisez sont aussi les derniers écrits. Bien après que la verrerie soit remise au placard, que les produits soient rangés dans leur boîte, il faut finir sa thèse. Commencer puis finir sa rédaction. Et tourner la page de trois années de chimie. Trois années qui, comme pour toute thèse, auront connu des hauts et des bas, même si les seconds ont été moins nombreux (encore heureux, sinon on ne finirait pas les thèses).

Je voudrais donc commencer par remercier les personnes qui vont m'aider à mettre un point final à ces années en acceptant de juger cette thèse. Tout d'abord, Mme Suzanne Fery-Forgues et Mr Gilles Ulrich, qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs du manuscrit et qui, je l'espère, ont préparé une réserve conséquente de stylos pour proposer des améliorations à celui-ci. Mr Peter Dalko et Mr Anthony D'Aléo, ensuite, pour l'intérêt qu'ils ont témoigné à mon travail en acceptant de faire partie du jury. Je voudrais les remercier tous les quatre pour avoir été prêts à partager leurs avis et idées sur mes recherches et comment les améliorer.

S'il y a un point final, c'est qu'il y a un point de départ et cette thèse ne serait rien sans mes directeurs de thèse, Chantal Andraud et Yann Bretonnière. Même si Yann dira toujours qu'il n'était pas directeur de thèse et qu'il n'existe pas pour l'administration, c'est grâce aux deux que j'ai pu démarrer cette thèse. Et grâce aux deux que j'ai pu la continuer sans jeter l'éponge. Merci de m'avoir ouvert les portes du laboratoire alors que je cherchais une équipe d'accueil. Merci de m'avoir laissé cette grande liberté pour tous les tests que j'ai voulu faire et merci à Yann pour avoir supporté mes idées sous prétexte que « tant qu'on a pas démontré le contraire, rien ne prouve que ça va planter ». Tous les deux ont été constamment disponibles quand j'avais des questionnements scientifiques ou des envies de tout balancer à la poubelle. Merci enfin, d'avoir osé tout changer et d'avoir proposé un nouveau sujet quand je me demandais si l'élevage de mouton à la montagne ne serait pas un meilleur avenir (Au moins, maintenant, je serais capable de reconnaître quelques fleurs si j'y vais un jour).

Je tiens aussi à remercier les différents collaborateurs que j'ai rencontrés au fur et à mesure de ces années et qui ont supporté mes questions naïves (sans se moquer) en continuant leurs explications. Merci donc à Cyrielle Billon, Stéphane Chambert, Guillaume Micouin, Erwann Jeanneau et Sandrine Denis-Quanquin.

Trois autres personnes m'ont appris beaucoup de choses, peut-être plus qu'elles ne le pensent d'ailleurs. Je veux parler des différents stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer. Delphine, Quentin et Mathieu, si vous lisez ces lignes, sachez que j'ai apprécié de vous transmettre le peu que je savais et

que je suis très fier que vous ayez aimé vos stages. Se retrouver de l'autre côté du miroir et devoir gérer un projet et encadrer les gens qui le mènent n'est pas si facile que ça mais vous avez accepté d'essayer les plâtres.

Que seraient trois années seul dans son laboratoire, sans contact avec l'extérieur ? Un enfer, je pense. C'est pourquoi il me faut maintenant remercier la fine équipe qui s'est succédé pendant ces trois années au sein du laboratoire. Heureusement qu'on a pu partager des synthèses en mangeant, des nouvelles de sport en manipulant, des conseils d'enseignement en buvant ou des souvenirs de vacances en RMN. Je suis arrivé avec des collègues et je repars avec des amis. Je voudrais bien citer tout le monde mais me connaissant, je vais en oublier. Donc un grand merci à ceux du LR2, LR3, LR4 et LR6 qui ont fait que ce passage au laboratoire de chimie fut un plaisir. Un merci particulier au Ninkasi pour avoir fourni le sponsoring liquide et à Guillaume, Maxime, Corentin, Simon, François, Alexandre, Christophe, Aline, Laure-Lise, Alexandre, Bastien, Jérémy pour avoir partagé ces soirées.

Comme la vie ne se résume pas au labo, je voudrais aussi envoyer mes remerciements à Nathalie, Flo, Benoît, Nor, Johan, Léo, Loïc, Jérem et à ceux que j'ai oublié, à la liste Pause-foyer et aux gars du hand qui, chacun dans leur genre, m'ont fait oublier les moments difficiles, m'ont changé les idées, m'ont réoxygéné et m'ont fait relativiser sur les malheurs du labo.

Un dernier remerciement particulier à ma colocataire qui me supporte depuis maintenant quelques années déjà. Je ne sais pas comment la remercier pour sa patience et sa capacité à me redonner le sourire en cas de coup dur. Même quand on ne se croise que très tôt ou très tard à cause des manips qui foirent, même quand la recherche nous éloigne géographiquement, tu m'as toujours soutenu. Si tu lis ceci, je t'assure je te revaudrais ça. Merci beaucoup ma chérie, je t'aime.

Enfin, je voudrais te remercier toi, lecteur, si tu n'es pas parmi les personnes citées ci-dessus. Que tu te sois égaré ou que Yann t'oblige à lire ce manuscrit, je suis touché que tu aies réussi à atteindre ces lignes sans décrocher. Je te promets, les quelques deux cent pages qui viennent devraient être plus digestes et j'espère qu'elles t'apporteront les réponses que tu es venu chercher.

ENJOY !

Table des Matières

Remerciements	I
Table des Matières	III
Abréviations	IX
Introduction	1
Chapitre I Le TCF à travers la chimie	3
I.1 Synthèse et premières utilisations.....	3
1.A. Synthèse.....	3
1.B. Le TCF à l'assaut des modulateurs électrooptiques.....	4
I.2 Le groupement TCF est adapté pour l'imagerie cellulaire.....	8
2.A. Spécificités de l'imagerie biologique	9
2.A. Sensibilité à l'environnement	12
I.3 Quelques utilisations du TCF en biologie	13
3.A. Imagerie en fonction de l'environnement	14
3.B. Détection de la présence de molécules.....	15
3.C. Détection de protéines.....	20
3.D. Microscopie super résolue STORM	23
I.4 Objectifs de ce travail de thèse.....	24
4.A. Quel est l'apport d'atomes d'oxygène pour de telles structures ?	25
4.B. Applications en solution.....	26
4.C. Fluorescence à l'état solide.....	26
Chapitre II De l'optimisation du pKa à la synthèse de sondes sensible au pH	29

II.1 Quel intérêt à étudier le pH cellulaire ?.....	29
1.A. Une régulation des processus biologiques grâce au pH intracellulaire.....	29
1.B. De nombreuses sondes fluorescentes déjà disponibles.....	32
II.2 Qui a dit qu'une sonde pH devrait être compliquée à synthétiser ?.....	40
2.A. Une synthèse générale optimisée.....	41
2.B. Une famille nombreuse et variée.....	42
II.3 Quand les couleurs changent avec le pH.....	44
3.A. Du jaune, du violet sur demande.....	44
3.B. Les sondes sont fluorescentes.....	53
3.C. Petite parenthèse avec les substitutions ortho.....	58
II.4 A la rencontre de la cellule.....	62
4.A. Les cellules déroulent le tapis rouge de bienvenue.....	63
4.A. Une très bonne sensibilité autour du pH physiologique.....	64
II.5 Un exemple de fonctionnalisation : la localisation intracellulaire.....	66
5.A. Adaptation aux mitochondries.....	67
5.B. Mesure du pH.....	70
5.C. Expériences in-vitro ?.....	74
II.6 Conclusion.....	74

Chapitre III Application du principe OFF/ON à la détection du peroxyde d'hydrogène.....77

III.1 Le peroxyde d'hydrogène dans la cellule.....	77
1.A. Un rôle ambivalent.....	78
1.B. La fluorescence au service de la détection.....	79
III.2 Une première sonde comme preuve de concept.....	84
2.A. Synthèse du boroester.....	85
2.B. Un vrai caractère OFF/ON.....	86
2.C. Une sonde adaptée aux explosions oxydatives.....	88
III.3 De l'utilité des sucres pour améliorer la cinétique.....	91

3.A.	<i>Acide boronique plutôt qu'ester pinacolique.....</i>	92
3.B.	<i>Une meilleure cinétique au détriment du caractère OFF/ON.....</i>	93
III.4	Conclusions	96
Chapitre IV A la recherche d'un émetteur à l'état solide optimisé dans le rouge		99
IV.1	La fluorescence à l'état solide dans la littérature.....	99
1.A.	<i>Comment améliorer l'émission à l'état solide ?</i>	100
1.B.	<i>Quelques exemples de fluorophores émettant dans le rouge</i>	105
1.C.	<i>Les interactions au sein du cristal.....</i>	112
IV.2	Certaines des sondes pH sont fluorescentes à l'état solide	115
2.A.	<i>Propriétés des substitutions ortho.....</i>	115
2.B.	<i>Substitutions para.....</i>	116
IV.3	Travail sur les méthoxybenzaldéhydes	117
3.A.	<i>Synthèse d'une large famille.....</i>	118
3.B.	<i>Propriétés spectroscopiques.....</i>	120
3.C.	<i>Structures cristallines.....</i>	131
IV.4	Variations du transfert de charge	136
4.A.	<i>3 familles différentes</i>	136
4.B.	<i>Fluorescence</i>	140
IV.5	Conclusions	146
Chapitre V Activité enzymatique et fluorescence		149
V.1	Fluorescence à l'état solide et imagerie biologique	149
1.A.	<i>Les avantages de la fluorescence à l'état solide.....</i>	149
1.B.	<i>L'AIE au service de l'imagerie biologique</i>	152
1.C.	<i>La fluorescence à l'état solide pour l'activité enzymatique.....</i>	155
V.2	Isovanilline-TCF : molécule de premier choix	157

2.A.	<i>Un pKa suffisamment élevé</i>	158
2.B.	<i>Présence d'un phénomène d'AIE</i>	159
V.3	La phosphatase alcaline, enzyme modèle	161
3.A.	<i>Quelles sondes pour détecter l'activité enzymatique ?</i>	161
3.B.	<i>Synthèse des cibles</i>	163
3.C.	<i>Fluorescence et activité enzymatique</i>	164
V.4	β -Glucosidase	167
4.A.	<i>Les sonde pour β-glucosidases : ce qui existe</i>	167
4.B.	<i>Synthèse</i>	169
4.C.	<i>Tests enzymatiques</i>	171
V.5	Variations sur le thème du TCF	172
5.A.	<i>Il faut remonter aux sources pour faire varier les méthyles</i>	173
5.B.	<i>Une spectroscopie surprenante</i>	175
5.C.	<i>Une baisse de solubilité</i>	176
V.6	Eloignement du substrat à l'aide d'un groupement hydrophobe	177
6.A.	<i>Choix de l'espaceur</i>	178
6.B.	<i>Nouvelles cibles</i>	181
V.7	Conclusions	187
	Conclusions et perspectives	191
	Chapitre VI Bibliographie	195
	Partie expérimentale	205
VI.1	General Information	205
VI.2	Synthesis	206
2.A.	<i>General Procedures</i>	206
2.B.	<i>Product Characterization</i>	207
VI.3	Spectroscopy	265

3.A. <i>pH probes</i>	265
3.B. <i>Solid state and suspension fluorescence</i>	266
3.C. <i>Hydrogen peroxide detection</i>	267
3.D. <i>Kinetic studies of enzymatic probes</i>	268
VI.4 Confocal imaging.....	268
Annexes.....	270
Crystallographic data	270
Publications.....	277

Abréviations

ACQ	Aggregation caused quenching
ADN	Acide DéoxyriboNucléique
AIE	Aggregation Induced Emission
AMP	Adénosine Monophosphate
ARN	Acide RiboNucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BCECF	2',7'-bis(carboxyéthyle)-5(6)-carboxyfluorescéine
BODIPY	Boron Dipyrométhène
CI	Conversion interne
CIS	Conversion inter-système
DCFH	2',7-Dichlorodihydrofluorescéine
DCM	4-(dicyanomethylene)-2-methyl-6-[4-(dimethylaminostyryl)-4H-pyrene]
DIPEA	N,N-diisopropyléthylamine
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ELF-97®	Sonde commercial pour la detection de la phosphatase alcaline
EtOH	Ethanol
EtOAc	Acétate d'éthyle
FRET	Forster Resonance Energy Transfer
GFP	Green Fluorescent Protein
Glc	Glucose
Glu	Glutamate
GM	GoeppertMayer

HATU hexafluorophosphate	1-[Bis(diméthylamino)méthylène]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HOMO	Orbitale Occupée de plus haute énergie
HPQ	2-(2'-hydroxyphnéyl)-4(3H)-quinazolinone
HPS	hexaphénylsilole
IR	Infrarouge
Leu	Leucine
LiAlH ₄	tétrahydroaluminate de Lithium
LUMO	Orbitale vacante de plus basse énergie
MeOH	méthanol
MW	irradiation micro-ondes
PBS	Phosphate bovine serum
PDE	Phosphodiesterase
PET	Photo-induced electron transfer
pH _e	pH extracellulaire
pH _i	pH intracellulaire
RIR	Restriction de rotations intramolécules
RMN	résonance magnétique nucléaire
ROS	espèces réactives de l'oxygène
RSH	thiol
RT	température ambiante
STORM	Stochastic Optical Reconstruction Microscopy
STX	Saxitoxine
TBDMS	tert-Butyldiméthysilyle

TCF	2-dicyanométhylène-3-cyano-4,5,5-triméthyl-2,5-dihydrofurane
THF	Tétrahydrofurane
TPP	la tétraphényl-porphyrine
TPE	tétraphényléthylène
Tris-HCl	trishydroxyméthylaminométhane hydrochloride
UV	Ultraviolet
Φ_f	rendement quantique de fluorescence

Introduction

Comme l'indique le titre de ce manuscrit, cette thèse a pour but de développer l'utilisation de fluorophores porteurs de fonction tricyanofurane (2-dicyanométhylène-3-cyano-4,5,5-triméthyl-2,5-dihydrofurane) dans différents domaines de l'imagerie biologique. Sous ce nom se cache une famille de molécules qui possèdent une partie électro-acceptrice composée d'un cycle furane porteur de trois groupements nitriles communément appelée tricyanofurane (**TCF**) et conjuguée à une partie riche en électron (voir Figure 0-1). Le groupement **TCF** est un groupement très fortement électro-attracteur, ce qui confère au fluorophore un caractère dipolaire très intéressant pour la fluorescence.

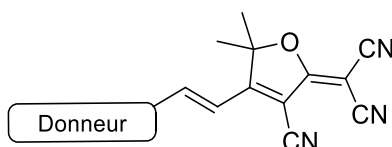


Figure 0-1. Structure des fluorophores utilisés et décrits dans cette thèse.

L'objet du premier chapitre est tout d'abord de décrire le groupement **TCF** et de montrer les nombreuses utilisations et propriétés de ce groupement, son interaction avec la lumière, que ce soit dans des matériaux ou en solution, pour une utilisation électro-optique ou une sonde biologique. Nous verrons aussi les notions et phénomènes associés à la fluorescence, à l'absorption et à l'émission, et les particularités qui accompagnent une utilisation en milieu biologique.

L'architecture dipolaire est à la source d'une intense fluorescence que nous avons voulu utiliser pour l'imagerie biologique. Tout d'abord, nous avons synthétisé des sondes sensibles aux variations de pH (**chapitre 2**) : l'état de protonation d'un phénol judicieusement placé permet de modifier leurs caractéristiques spectroscopiques. Pour détecter l'action du peroxyde d'hydrogène (**chapitre 3**), nous avons été capables de construire des sondes non-fluorescentes qui ne le deviennent qu'après réaction avec H_2O_2 . Au cours de ces deux premières études, nous nous sommes aperçus que les poudres des différents composés présentent une fluorescence à l'état solide. Le **chapitre 4** présente l'étude de leurs propriétés ainsi que leur optimisation en faisant varier les groupements donneurs. Enfin, nous avons tenté de réaliser des sondes pour l'activité enzymatique (**chapitre 5**) qui sont capables de libérer ce type de fluorophores qui précipitent et émettent de la fluorescence.

Chapitre I Le TCF à travers la chimie

I.1 Synthèse et premières utilisations

Le 2-dicyanométhylène-3-cyano-4,5,5-triméthyl-2,5-dihydrofurane ou **TCF**, puisque c'est ainsi qu'il sera appelé durant cette thèse, est un cycle furane conjugué porteur de trois substituants nitriles. Lorsque Melikian *et al.*^[1] le synthétisent pour la première fois en 1995, leur intérêt est surtout porté à la structure furanique qui pourrait permettre de potentielles applications comme agent pesticide.

1.A. Synthèse

La synthèse est montrée sur la Figure I-1. Il s'agit de la condensation de deux équivalents de malononitrile sur une α -hydroxycétone en conditions basiques et catalytiques.

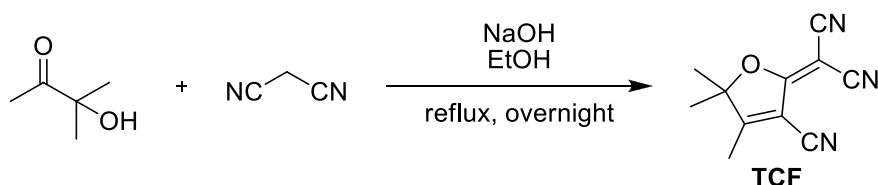


Figure I-1. Synthèse du groupement **TCF** développée par Melikian *et al.*^[1]

Le mécanisme proposé par He *et al.*^[2] présente une première addition du malononitrile (déprotoné à cause du milieu basique) sur la cétone. Après une prototropie, les auteurs proposent une élimination de l'eau pour former une double liaison. Il y a ensuite une attaque de l'alcoolate sur le carbone d'un des deux nitriles. Le cycle ainsi créé avec un cétime primaire est ensuite attaqué par le malononitrile suivie d'une libération d'ammoniac pour donner le composé final **TCF**.

Si l'application de ce substituant pour différents pesticides a tourné court, de nombreux groupes s'y sont intéressés pour ses propriétés électroniques. En effet, les trois groupements nitriles sont conjugués, ce qui en fait un substituant extrêmement électro-attracteur. Ceci permet de créer facilement une architecture dipolaire en conjuguant le **TCF** à un groupement électro-donneur. Ce type d'architecture est très utile pour la fluorescence, l'optique non linéaire et l'électro-optique. C'est d'ailleurs dans cette dernière voie que les premières utilisations de ce cycle ont été publiées.

Chapitre I : Le TCF à travers la chimie

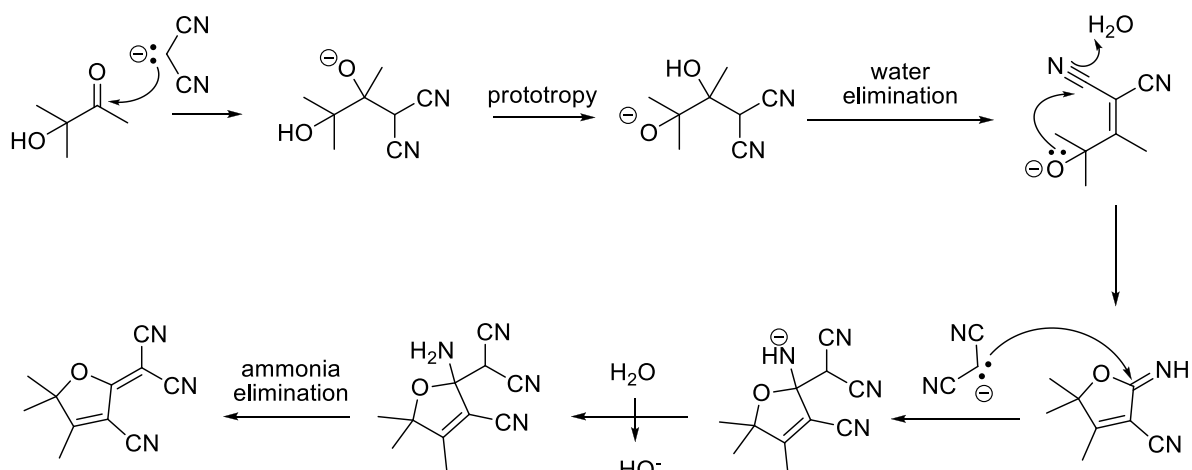


Figure I-2. Mécanisme de formation du groupe **TCF**. L'étape limitante est l'attaque nucléophile de l'alcool sur le groupement cyano pour fermer le cycle à 5. Adapté de [2]

1.B. Le TCF à l'assaut des modulateurs électrooptiques

La première application du **TCF** a été réalisée par l'équipe de Larry Dalton avec l'apparition de chromophores présentant une architecture dipolaire grâce au couplage entre le **TCF** accepteur et une amine donneuse d'électrons à travers des ponts conjugués comme on peut le voir sur les molécules **FTC**^[3] ou le **CLD-1**^[4] (Figure I-3). Ces chromophores ont ensuite été intégrés dans des polymères et alignés au sein de ceux-ci pour permettre de construire des matériaux électro-optiques pour des applications non linéaires dans le domaine des télécommunications.

1.B.i La molécule CLD-1

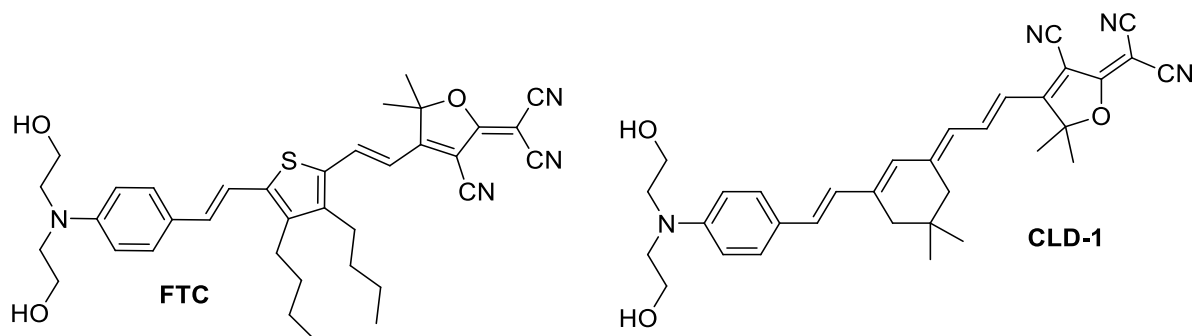


Figure I-3. Structure des composés **FTC** et **CLD-1** développés au sein du laboratoire de L. Dalton.

Ce phénomène est quantifié par les paramètres $\mu\beta$ (μ : moment dipolaire permanent et β : hyperpolarisabilité du 1^{er} ordre de la molécule) à l'échelle moléculaire et par le coefficient électro-optique r_{33} mesuré après incorporation et orientation des molécules en matrice solide. Ce dernier illustre le décalage de l'amplitude de phase obtenu pour une certaine tension et dépend grandement

de la longueur d'onde de mesure. La valeur de $\mu\beta$ est donc importante pour une telle utilisation et constitue un des critères de sélection de tels fluorophores. Elle est généralement de l'ordre de 10^{-48} esu (unité de charges électrostatiques). Les valeurs de ces paramètres pour les molécules présentées plus haut sont résumées dans le Tableau I-1.

Chromophore	λ_{\max} (nm, CHCl ₃)	$\mu\beta_{1,9\mu\text{m}}$ (10^{-48} esu) ^a	r_{33} (pm/V) ^b
FTC	650	17576	83 @ 1.3 μm
CLD-1	692	14067	45 @ 1.3 μm

Tableau I-1. Grandeurs physiques des composés **FTC** et **CLD-1** mesurées à l'échelle moléculaire et dans le matériau.
^a mesuré par génération de seconde harmonique induite par champ électrique (EFISH). ^b mesuré avec une charge de 25 % en chromophores dans un film de poly(bisphénol A carbonate-co-4,4'(3,3,5-triméthylcyclohexylidène)-diphénol), (APC)

Ces composés, bien que très intéressants ont été ensuite développés et améliorés. L'explication tient au comportement au sein du matériau : lorsque celui-ci est chargé avec de grandes concentrations de chromophores, les dipôles ont tendance à s'agréger. Ceci entraîne une diminution de la valeur macroscopique du tenseur électro-optique du matériau r_{33} défavorable à une utilisation prolongée.

1.B.ii Espacement des chromophores

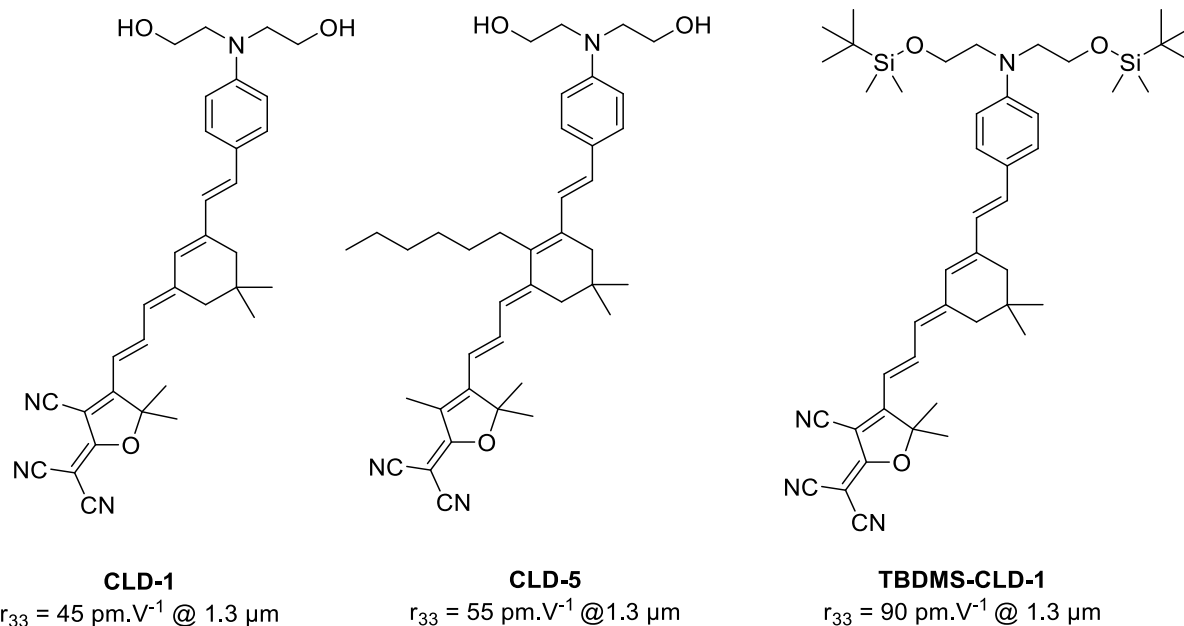


Figure I-4. Structure de dérivés de CLD-1 encombrés pour diminuer la formation d'agrégats et conserver des propriétés optimales au sein du matériau.^[4-6]

La première approche a donc été l'introduction de substituants encombrés sur le fluorophore **CLD-1** comme par exemple, des groupements n-hexyle (**CLD-4**)^[5] ou tert-butyl diméthylsilyle (**TBDMS-**

CLD-1^[6] qui n'affectent pas la valeur du β mais permettent une diminution des interactions électrostatiques (Figure I-4).

1.B.iii Squelettes avec des longues conjugaisons

D'autres fluorophores ont été ensuite synthétisés sur des squelettes autres que **CLD**. Tout d'abord dans le même groupe, avec une conjugaison comportant plusieurs thiophènes^[7] (**I-1**, Figure I-5), par d'autres laboratoires, ensuite, avec, par exemple : des mérocyanines^[8] (**I-2** et **I-3**) ou des groupements phényles encombrés^[9] (**I-4**). Malgré des variations sur la structure, la conservation de la structure polaire permet d'obtenir des propriétés non linéaires intéressantes. Les mérocyanines présentent des valeurs de $\mu\beta$ élevées ($> 8\,900\,10^{-48}$ esu) mais ce travail a été effectué à 800 nm soit loin des longueurs d'onde des télécommunications. C'est pourquoi ces molécules n'ont ensuite pas été intégrées dans des matériaux. Pour les deux autres, les coefficients r_{33} sont plus faibles que ceux du **TBDMMS-CLD-1** même si la valeur de 70 pm/V à 1,3 μm est présentée. De plus, la difficulté de synthèse, notamment de **I-1** vis-à-vis des composés CLD les rend moins désirables pour des applications à large échelle.

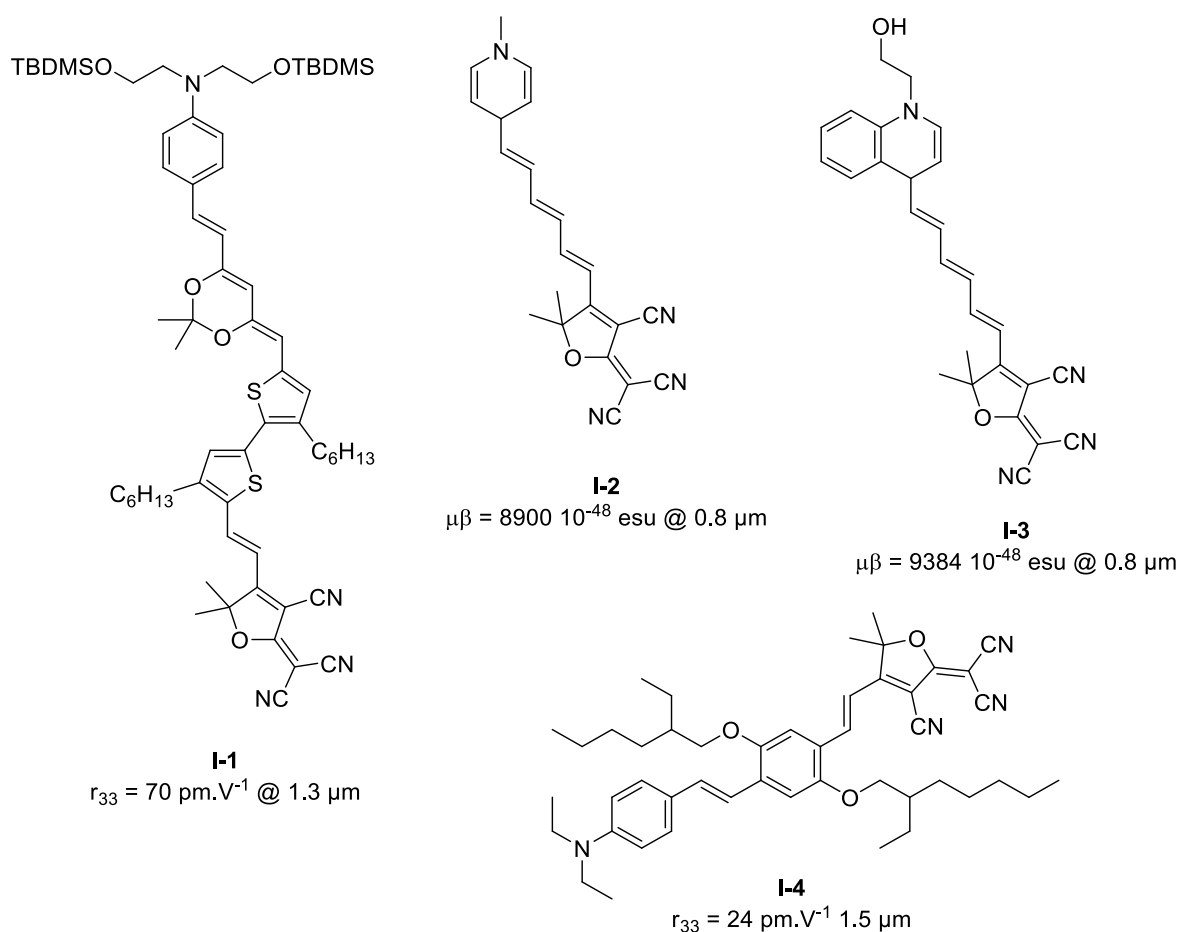
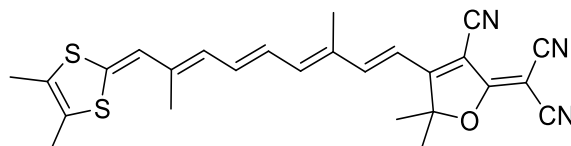


Figure I-5. Autres dipôles synthétisés avec le groupement TCF pour une application électro-optique. tiré de ^[7] pour **I-1**, ^[8] pour **I-2** et **I-3** et de ^[9] pour **I-4**.

Pour dépasser les valeurs obtenues par les composés CLD, de nombreuses équipes ont remplacé les méthyles du **TCF** par des groupements CF_3 ou phényles^[10]. Avec un **TCF** non modifié, ce n'est que très récemment qu'il a été possible d'obtenir une amélioration des propriétés non linéaires. On peut citer, par exemple le composé synthétisé par Andreu *et al.*^[11] (Figure I-6) qui possède un coefficient $\mu\beta$ valant $31\,000 \times 10^{-48}$ esu à $1.9\ \mu\text{m}$.

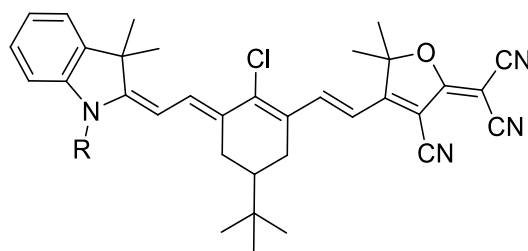
**I-5**

$$\mu\beta = 31\,000 \times 10^{-48} \text{ esu @ } 1.9\ \mu\text{m}$$

Figure I-6. Structure du composé **I-5**^[11] possédant un très large coefficient $\mu\beta$.

1.B.iv CPO-1 permet d'autres applications

Au sein du laboratoire, le groupement **TCF** a aussi été utilisé pour créer des fluorophores électro-optiques. Des hémicyanines D- π -A porteuses d'un groupement **TCF** ont ainsi montré de très bonnes propriétés non linéaires^[12,13]. Le composé **CPO-1** par exemple présente, lui aussi, un coefficient $\mu\beta$ valant $31\,000 \times 10^{-48}$ esu à $1,9\ \mu\text{m}$. Cette famille peut être fonctionnalisée par la chaîne portée par l'indole ou alors par une réaction sur l'atome de chlore central. Les cyanines sont stables thermiquement et lorsqu'elles sont incorporées dans un polymère, leurs propriétés électro-optiques sont conservées avec un facteur r_{33} équivalent aux molécules CLD : $r_{33} = 90\ \text{pm/V}$ à $1,06\ \mu\text{m}$ pour une concentration de 25 % en fluorophore **CPO-1**^[14]. Ce qui le rend intéressant est la facilité de la synthèse : ce composé peut être facilement synthétisé à l'échelle de la dizaine de grammes contrairement aux molécules CLD.



CPO-1 R = $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$

CPO-2 R = $(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$

Figure I-7. Structure des cyanines CPO synthétisées au laboratoire.

De plus, leurs propriétés spectroscopiques sont très décalées dans le rouge avec une absorption large au-delà de 800 nm (810 nm pour **CPO-1**, $\epsilon = 91\,000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et ils présentent des propriétés d'absorption à deux photons autour de 1500 nm intéressantes (Figure I-8). Ces propriétés ont aussi été utilisées pour des expériences de limitation optique aux longueurs d'onde des télécommunications ($\lambda = 1\,500 \mu\text{m}$). Des solutions concentrées de **CPO-1** transmettent différemment la lumière suivant l'intensité du Laser : à faible intensité, on a un composé linéaire qui transmet quasiment toute la lumière ($T > 0,9$). Lorsque l'intensité du laser augmente, il y a une valeur seuil (10 J.cm^{-2} pour **CPO-1**) à partir de laquelle l'intensité transmise décroît avec l'augmentation de l'intensité incidente (voir Figure I-8, droite). Les données expérimentales de limitation optique ont été interprétées sur la base d'absorption à deux photons et d'absorption à l'état excité. Lorsque le chromophore est inséré dans un polymère, cet effet est utilisé dans le cadre de l'imagerie active.

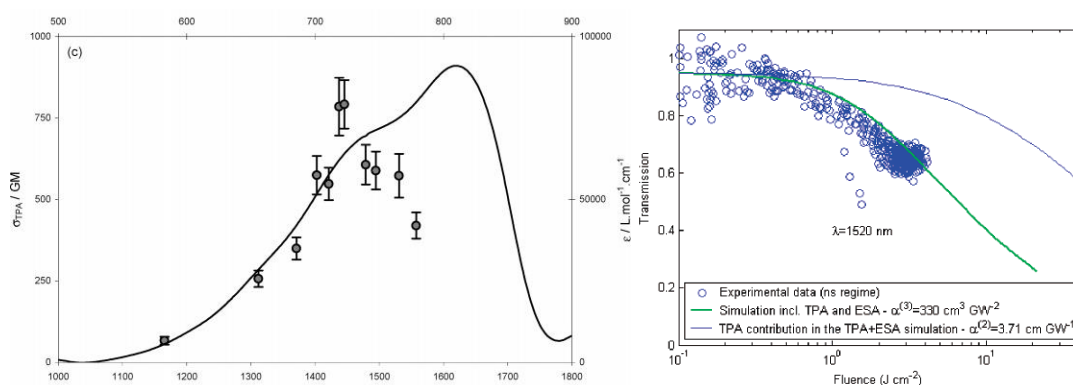


Figure I-8. Gauche : Spectres d'absorption de **CPO-1** à un photon (ligne) et à deux photons (cercles) mesuré par la méthode Z-scan dans le dichlorométhane. Droite : Transmittance de **CPO-1** dans des solutions concentrées dans le dichlorométhane : expérimental (point) et théorique comprenant l'absorption à l'état excité (lignes).

I.2 Le groupement TCF est adapté pour l'imagerie cellulaire

L'autre utilisation du groupement **TCF** est la fluorescence, i.e. l'émission de lumière à partir d'un état électronique excité. Cette émission peut couvrir une large gamme de longueurs d'onde, depuis la lumière ultraviolette jusqu'à l'infrarouge en passant par le visible. Grâce au développement de sondes spécifiques ou de protéines fluorescentes dérivées de la GFP^[15], la microscopie par fluorescence a permis de comprendre la structure de la cellule et d'accéder à certains mécanismes moléculaires

cellulaire

2.A. Spécificités de l'imagerie biologique

Pour utiliser un fluorophore pour l'imagerie biologique, il convient de s'adapter à certaines spécificités inhérentes au milieu physiologique et au matériel biologique, en particulier à la présence de l'eau comme solvant et de fluorophores endogènes dans le milieu environnant.

2.A.i Solubilité dans les milieux physiologiques

Ainsi la première caractéristique indispensable est la solubilité dans l'eau ou dans les tampons recréant le milieu physiologique. Cependant, quand on parle de solubilité, il n'est pas nécessaire qu'elle soit immense : il faut qu'elle soit suffisante pour pouvoir détecter la fluorescence. Malheureusement, le groupement **TCF** est, de ce point de vue, défavorable. C'est un groupement hydrophobe qui est complètement plan car conjugué. De plus, la construction de dipôles s'accompagne de la rigidification du système conjugué. Or pour améliorer les propriétés d'émission, il est souhaitable d'étendre ce système, ce qui a pour effet d'augmenter la rigidité du système et l'hydrophobie de la molécule, ce qui est de nouveau défavorable à la solubilité. Une méthode usuelle est de greffer des groupements oxygénés. Les exemples présentés dans la Figure I-9 en sont des illustrations. Les équipes de R. Weissleder^[16] (**I-6**) ou R. Twieg et W. Moerner^[17] (**I-8**) ont choisi des greffer des groupes polyéthylène glycol plus ou moins longs pour assurer la solubilité. De leur côté, Wu *et al.*^[18] ont utilisé un dérivé coumarine (**I-7**). La présence du phénol et du groupement lactone permet, elle aussi, d'améliorer la solubilité.

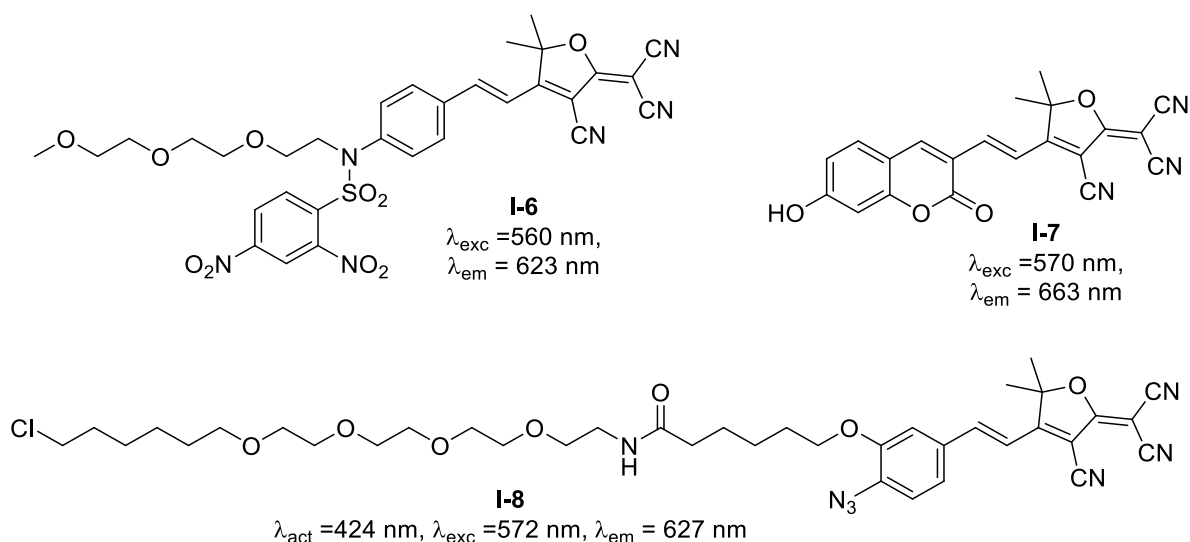


Figure I-9. Exemples de fluorophores solubles dans l'eau et présentant une structure « push-pull » avec un TCF.

Il est aussi possible de greffer des groupements chargés comme on peut le voir dans cette étude de Nishimura *et al.*^[19] (Figure I-10) : que ce soit des ions ammoniums positifs ou des

Chapitre I : Le TCF à travers la chimie

groupements sulfates chargés négativement, ils assurent la solubilité dans un environnement physiologique. Ces composés amphiphiles ont été utilisés pour mimer des lipides. On peut d'ailleurs déjà noter l'absence de double liaison entre le TCF et le cycle aromatique qui a pour effet de diminuer les longueurs d'ondes d'absorption et d'émission.

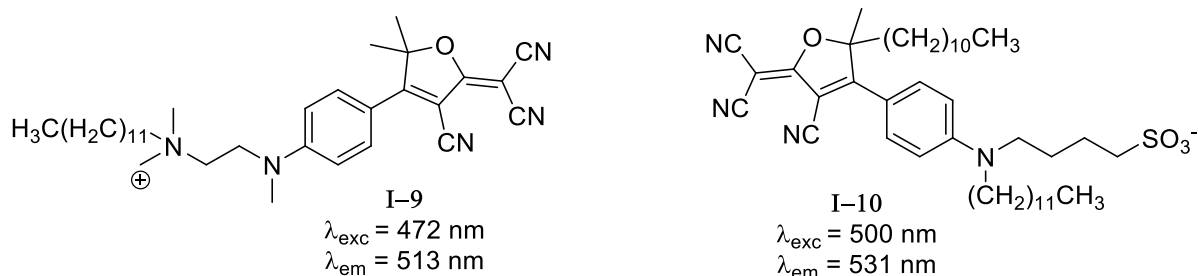


Figure I-10. Fluorophores synthétisés par Nishimura et al.^[19] et solubles dans l'eau grâce aux groupements chargés positivement ou négativement.

2.A.ii Longueurs d'onde et fenêtre de transparence biologique

Les positions des bandes d'absorption et d'émission sont un autre élément essentiel. En effet, en milieu biologique, les cellules et les tissus ne sont pas transparents à la lumière. Pour pouvoir exciter une molécule, un photon doit traverser le milieu environnant et surtout, ne pas être absorbé et diffusé par celui-ci. Les composants présents qui absorbent le plus dans le visible sont l'eau, la mélanine et l'hémoglobine (qu'elle soit oxygénée ou non)^[20]. Leur absorption est présentée dans la Figure I-11. Comme on peut le voir, il existe une fenêtre, appelée fenêtre de transparence biologique, où l'absorption est relativement faible et située entre 650 nm et 900 nm. Dans cette fenêtre, les molécules endogènes présentes dans le corps humain absorbent et diffusent beaucoup moins. Ceci a plusieurs avantages. Tout d'abord, s'il n'est pas absorbé et diffusé, le faisceau exciteur peut pénétrer plus profondément. Ainsi, la profondeur atteinte est de l'ordre du millimètre avec une lumière verte tandis qu'elle peut atteindre un centimètre avec une lumière rouge^[21]. Pour une imagerie biologique des tissus profonds, il est donc indispensable d'utiliser des fluorophores dont les gammes d'absorption et d'émission sont entre 650 nm et 900 nm.

cellulaire

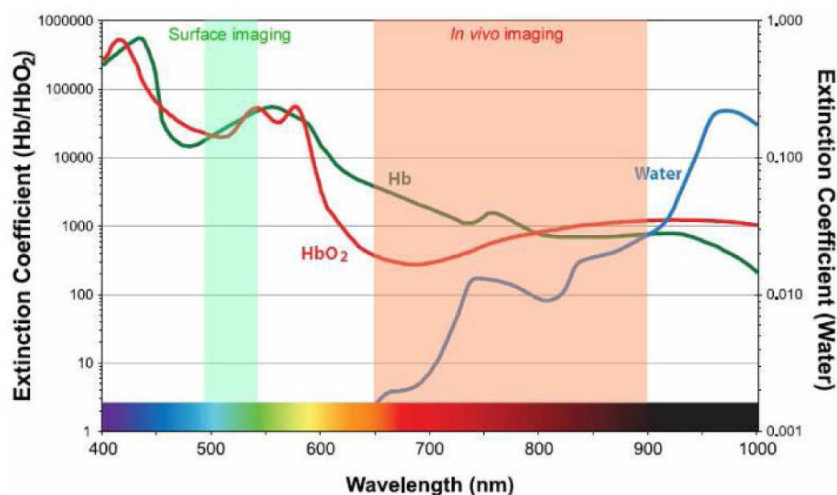


Figure I-11. Spectres d'absorption de l'hémoglobine et de l'eau. Attention, les échelles verticales sont logarithmiques. Dans la gamme 650-900 nm, l'absorption est beaucoup plus faible. extrait de [20]

Mais même pour des expériences *in-vitro*, il est intéressant de se situer dans la zone de transparence biologique : qui dit moins d'absorption, dit moins d'excitation des cellules ou des protéines environnantes. Si elles sont moins excitées, elles auront beaucoup moins l'occasion de fluorescer à leur tour, ce qui diminue le signal d'auto-fluorescence^[22] du milieu et renforce le rapport signal sur bruit. La fluorescence collectée vient uniquement du fluorophore, et ce d'autant plus que la longueur d'onde d'émission est décalée vers le rouge. Enfin, si les cellules ne sont pas excitées, elles sont aussi moins sensibles à la dégradation, ce qui préserve le milieu environnant de dommages et de la libération de radicaux libres qui peuvent être toxiques.

Une dernière caractéristique importante des propriétés spectroscopiques prend en compte le déplacement de Stokes. Plus celui-ci est grand, moins les photons émis pourront être réabsorbés par les fluorophores voisins car la superposition des spectres sera faible. Ceci permet une augmentation de l'intensité. De plus, un grand déplacement de Stokes décale les longueurs d'onde d'émission vers le rouge et permet de séparer facilement la lumière émise par les chromophores de la lumière excitatrice et de la lumière émise par les fluorophores intrinsèques qui émettent dans le vert.

2.A.iii Stabilité et toxicité

Un dernier point important pour l'imagerie biomédicale est la stabilité des sondes : une dégradation du fluorophore due à un photo-blanchiment entraîne une diminution du signal émis. Par exemple, la fluorescéine et les composés basés sur un cœur xanthène sont connus pour être sensibles à la lumière et rapidement dégradés en présence d'une source lumineuse de haute intensité (LASER par exemple) voire même lorsqu'ils sont exposés à la lumière du soleil. L'utilisation des groupements

TCF en optique non linéaire ainsi que dans des cellules voltaïques a permis de se rendre compte de leur grande stabilité vis-à-vis d'une excitation intense (laser)^[23].

Une instabilité de la sonde peut aussi entraîner une grande toxicité pour la cellule en libérant des espèces hautement réactives. Il faut aussi que la molécule seule ne soit pas toxique. Des fluorophores basés sur un groupement **TCF** ont déjà été utilisés pour l'imagerie biologique (voir pages suivantes), ce qui constitue un premier argument quant à la faible toxicité de ce type de sondes.

2.A. Sensibilité à l'environnement

Les fluorophores **TCF** sont très sensibles à l'environnement, que ce soit à la polarité du solvant ou à sa viscosité. L'imagerie biologique utilise principalement l'eau comme solvant, c'est pourquoi il convient de vérifier si les conséquences spectroscopiques d'un tel environnement sont positives ou négatives.

2.A.i solvatochromisme

Le solvatochromisme correspond au décalage bathochrome (solvatochromisme positif) ou hypsochrome (solvatochromisme négatif) des propriétés spectroscopiques dans des milieux polaires. Pour les composés **TCF**, il est généralement positif, ce qui est très intéressant car il permet un décalage vers le rouge de la fluorescence dans l'eau.

Le solvatochromisme est le résultat d'une plus grande séparation des charges à l'état excité donc d'un plus grand moment dipolaire. Les molécules de solvant qui sont aussi des dipôles peuvent alors se réorienter pour stabiliser le fluorophore et diminuer son énergie. Ainsi le déplacement de Stokes est augmenté dans les milieux polaires ce qui permet une meilleure séparation de la lumière excitatrice et de la fluorescence émise par les fluorophores. Cet effet est d'autant plus prononcé que le solvant est polaire.

Le déplacement de Stokes est donc proportionnel à la différence entre les moments dipolaires dans les états fondamentaux et excités. Une étude de Lord *et al.*^[24] dont est issue la Figure I-12 montre l'influence du nombre de cycles aromatiques sur le solvatochromisme d'un fluorophore **TCF**. D'un groupe phényle à un naphthalène puis un anthracène, il est de plus en plus marqué, i.e. le déplacement de Stokes augmente plus vite sur une molécule plus allongée. En effet, dans le cas d'un dipôle, plus la molécule est allongée, plus la variation entre le moment dipolaire fondamental et le moment dipolaire à l'état excité va augmenter vite comme le montrent les différentes pentes des corrélations du graphique. Ceci est dû à une redistribution à plus longue distance des charges qui induisent une plus forte augmentation du moment dipolaire à l'état excité.

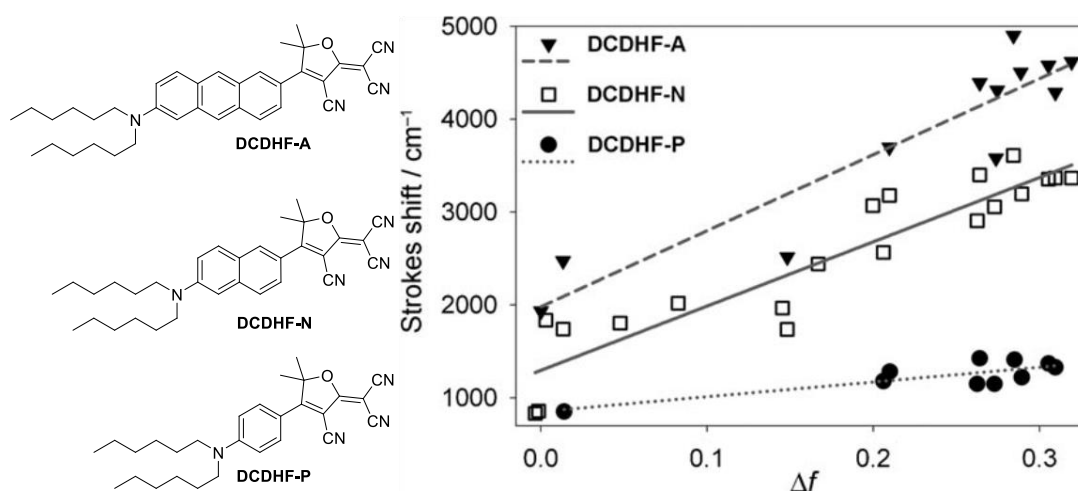


Figure I-12. Graphique détaillant le déplacement de Stokes $\Delta\bar{\nu}$ en fonction de la polarité du solvant Δf pour des molécules avec un cycle conjugué de différente taille. Adapté de [23]

2.A.ii Viscosité

L'intensité de la fluorescence est aussi dépendante de la viscosité du milieu environnant. Dans le cas des fluorophores **TCF**, plus le milieu est visqueux, plus la fluorescence est intense grâce à la restriction de rotations et vibrations moléculaires. L'exemple présenté dans la Figure I-13 met en avant ce phénomène (sans aller jusqu'à l'imagerie biologique pour l'instant) : on peut augmenter la viscosité du toluène en le gelant. On atteint alors un cas extrême de viscosité et comme on peut le voir sur la photographie, l'intensité de fluorescence est très largement augmentée.

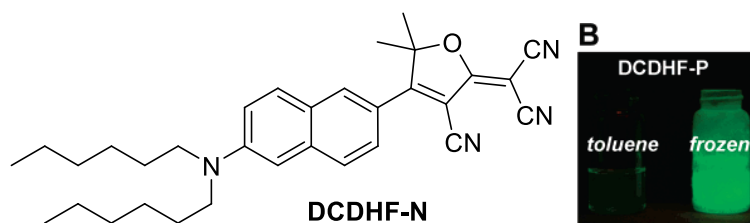


Figure I-13. Droite : photographies sous lampe UV ($\lambda_{exc} = 365 \text{ nm}$) du chromophore **DCDHF-P-6** à même concentration dans toluène et le toluène gelé. Adapté de [24]

I.3 Quelques utilisations du TCF en biologie

Les caractéristiques des chromophores basés sur les groupements **TCF** sont particulièrement favorables pour l'imagerie biologique car le pouvoir électro-attracteur du **TCF** permet un très fort décalage vers le rouge des longueurs d'onde qui se rapprochent de la fenêtre de transparence biologique. En solution, l'architecture la plus utilisée comporte comme groupement donneur une

aniline située en para du groupement TCF comme par exemple **DCDHF-P**, présentée dans la Figure I-12 ou **NH₂-TCF** avec un pont vinylique entre le TCF et la partie donneuse (Figure I-24, page 21).

3.A. Imagerie en fonction de l'environnement

3.A.i Membrane cellulaire

Suivant la localisation du fluorophore, l'augmentation de la fluorescence avec la viscosité peut être un grand avantage pour la diminution du bruit de fond pour imager les environnements rigidifiés : par exemple si on cible la membrane cellulaire, les fluorophores qui ne sont pas dans la région d'intérêt (milieu extracellulaire par exemple) sont dans un environnement moins contraint et moins visqueux. Leur intensité de fluorescence est alors plus faible que ceux situés que l'on veut suivre et le bruit de fond est diminué. Le fluorophore **DCDHF-N**, ainsi que les molécules **I-9** et **I-10** présentées Figure I-10, ont été utilisés avec de longues chaînes pour observer la dynamique des membranes et la diffusion des lipides^[19]. Avec des chaînes lipophiles longues d'une douzaine de carbones, les fluorophores présentent un comportement amphiphile qui correspond à celui de nombreux lipides. Les sondes s'insèrent parfaitement dans la bicouche lipidique.

Il est même possible de faciliter l'intégration cellulaire grâce à des peptides. Par exemple, à l'aide d'un groupe maléimide, les fluorophores sont couplés à un oligomère composé de huit arginines (Figure I-14). Pour comprendre le mécanisme de pénétration cellulaire de tels peptides, Lee *et al.*^[25] ont observé les interactions de cette sonde avec la membrane et le déplacement de chaque fluorophore au sein de celle-ci.

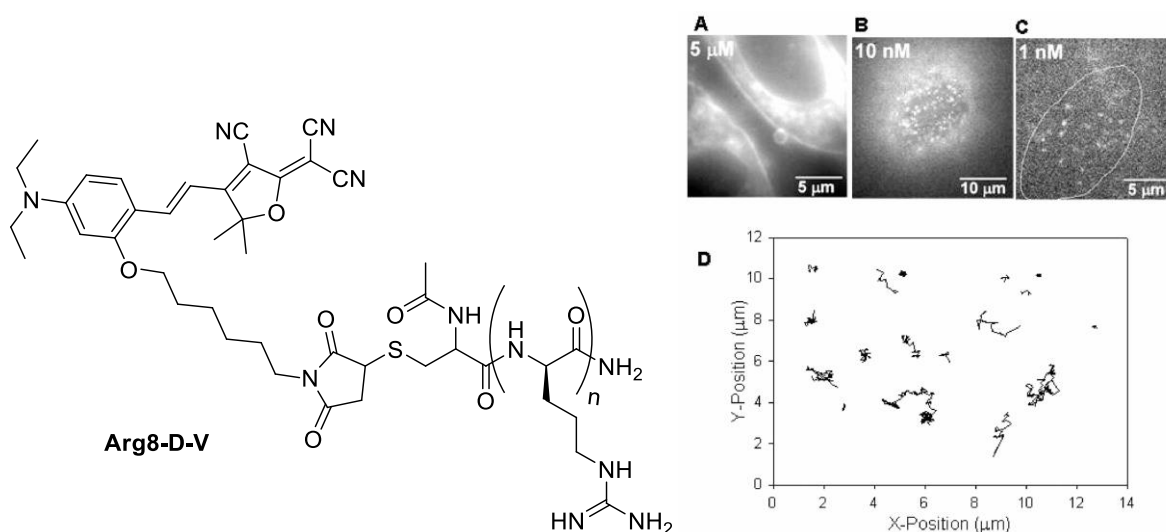


Figure I-14. Structure de la sonde Arg8-D-V qui permet d'obtenir des images de membrane cellulaire avec une diminution de la concentration de A à C. D : trajectoire de chaque fluorophore au sein de la membrane. Adapté de ^[25]

3.A.ii ARN

La sensibilité à l'environnement permet aussi de créer des sondes qui s'allument ou s'éteignent suivant les interactions qu'elles ont avec leurs semblables. Par exemple, la formation de dimères de fluorophore entraîne une extinction de la fluorescence. Ce phénomène a été utilisé par Conley *et al.*^[26] pour des sondes sensibles à des séquences ADN sur le modèle de « molecular Beacon » (Figure I-15).

Avant activation, la boucle est repliée sur elle-même et les fluorophores forment des dimères en agrégat H : la fluorescence est éteinte avec une extinction de 97,2 % (voir Figure I-15). En présence de la séquence ADN cible, il y a appariement avec la séquence de la boucle, ce qui a pour effet de la déplier et d'éloigner les fluorophores permettant de retrouver la fluorescence.

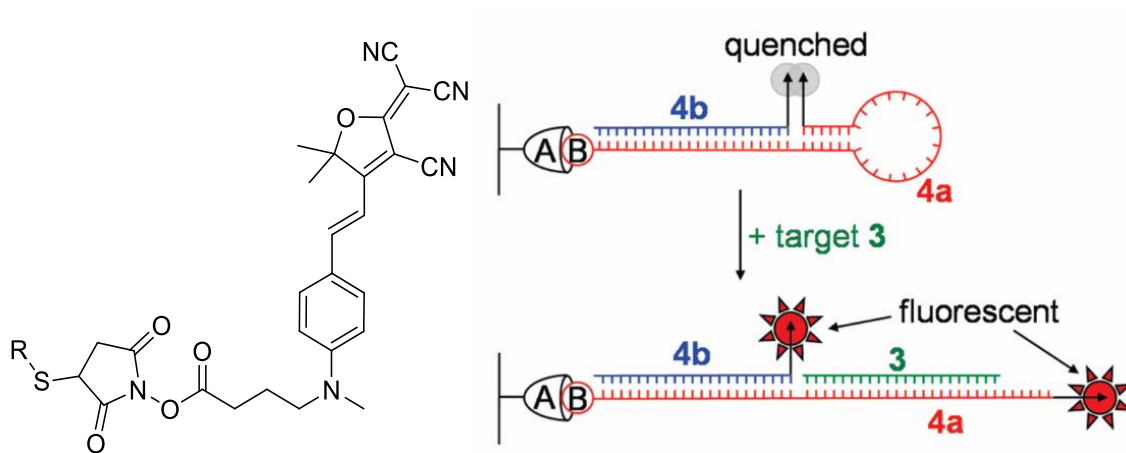


Figure I-15. Structure du fluorophore utilisé par Conley *et al.* pour détecter une séquence génétique par le principe du « molecular beacon ». A droite, le principe de détection de cette sonde. adapté de ^[26]

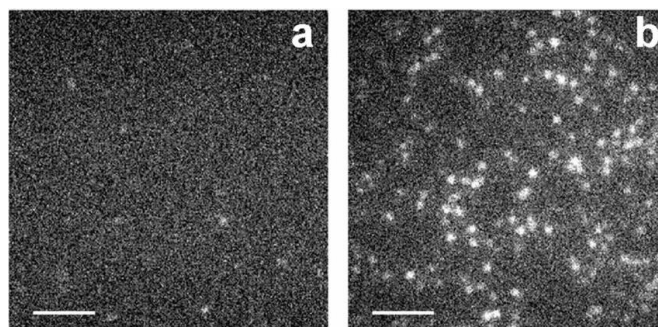


Figure I-16. Images de fluorescence de la sonde ($\lambda_{exc} = 605 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 660 \text{ nm}$) avant (gauche) et 60 s après (droite) l'addition de la séquence ADN cible.

3.B. Détection de la présence de molécules

Plusieurs approches ont été utilisées pour détecter la présence de petites molécules dans le milieu environnant. On peut les résumer en deux grands types : supramoléculaire et réactivité. Pour la

première, la complexation de l'espèce ciblée entraîne des variations de fluorescence. Pour la seconde il s'agit de réagir avec la cible pour modifier les propriétés d'émission.

3.B.i Détection des ions

L'approche supramoléculaire est très utile pour détecter des espèces chargées telles que les ions grâce aux nombreuses interactions électrostatiques ou dipolaires ainsi qu'aux liaisons hydrogènes. Un des premiers exemples d'un tel type de détection avec un dérivé TCF a été proposé par Zhou *et al.*^[27] en 2011 avec une sonde sensible au potassium. Sa structure est présentée dans la Figure I-17. Elle est construite sur l'architecture dipolaire habituelle mais l'aniline fait partie d'un cryptand, le triazacryptand connu pour ses propriétés de bon chélatant des ions K^+ . La sonde **KS2** est faiblement fluorescente (0,11 % de rendement quantique) mais s'allume lors de l'ajout de potassium (et uniquement de potassium car la sonde est sélective vis-à-vis des autres cations) avec un rendement quantique qui est multiplié par 50 pour atteindre 5,6 %. Les auteurs proposent comme explication un arrêt de la désexcitation par transfert de charge, mais il est surprenant que les longueurs d'onde d'absorption et d'émission ne soient pas modifiées si le transfert de charge est modifié. La longueur d'onde d'émission maximale (650 nm pour une excitation à 560 nm) se situe au début de la fenêtre de transparence biologique et c'est pourquoi la sonde n'a pour l'instant été testée qu'en conditions *in-vitro*.

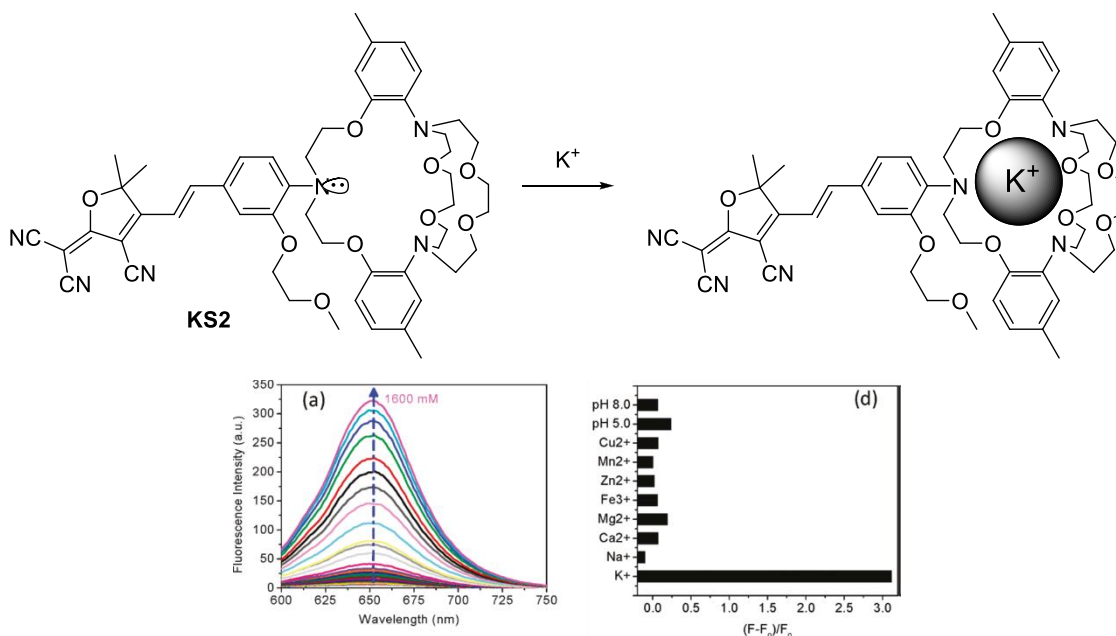


Figure I-17. Haut : Structure de la sonde KS2 sensible à la présence de potassium. Bas : Spectres d'émission de KS2 dans un tampon HEPES (pH 7,2) à différentes concentration en KCl ($\lambda_{exc} = 560$ nm). Droite Variation de fluorescence en présence de différents cations à leur concentration biologique. adapté de Zhou *et al.*^[27]

Un second exemple de reconnaissance supramoléculaire a récemment été proposé par Gwon *et al.*^[28] sur des composés sensibles aux anions F⁻. La partie donneuse du dipôle est un imidazole capable de former des liaisons hydrogènes avec le fluor (Figure I-18). En présence de l'espèce ciblée, les spectres d'absorption sont extrêmement modifiés avec la disparition du pic à 540 nm et l'apparition d'une nouvelle bande autour de 440 nm. Cependant cette sonde ne peut pas être utilisée pour la détection par fluorescence. En effet, lors de l'excitation par lumière UV, le milieu devient totalement transparent. Ceci peut être expliqué par une cycloaddition [2 + 2] entre les doubles liaisons C=C comme le montre la Figure I-18. Cette réaction est totalement réversible avec le retour du monomère en vingt secondes dans le noir mais empêche une éventuelle application future pour une détection par fluorescence.

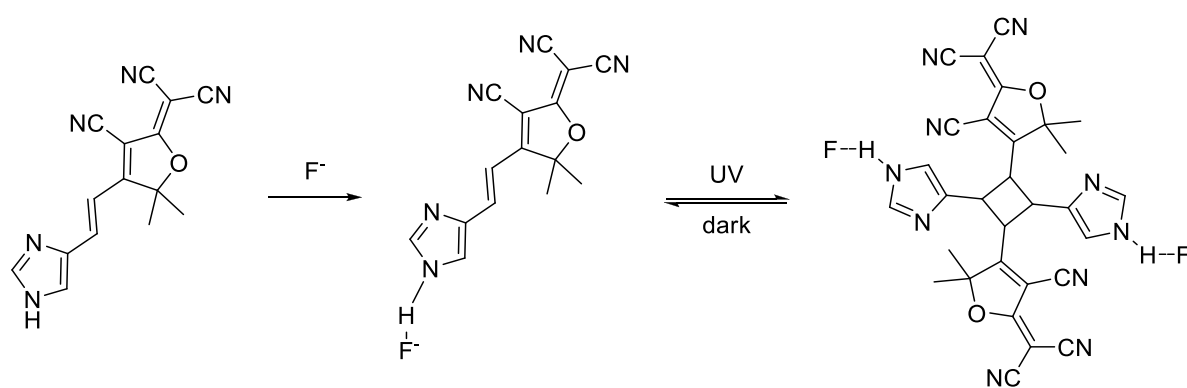


Figure I-18. Sonde sensible aux ions Fluor par liaison hydrogène. Malheureusement la formation de dimères sous UV ne permet pas l'utilisation de fluorescence pour la détection.

D'autres sondes ont été créées pour réagir avec leur cibles en créant ou brisant des liaisons covalentes plutôt que juste interagir par des interactions supra moléculaires. C'est le cas, par exemple de la sonde **BODIPY-TCF** qui est sensible aux ions hypochlorites^[29]. La double liaison entre le **TCF** et la BODIPY peut ainsi subir une coupure oxydante et permettre la libération de la BODIPY d'un côté et d'un **TCF** aldéhyde de l'autre (Figure I-19).

Chapitre I : Le TCF à travers la chimie

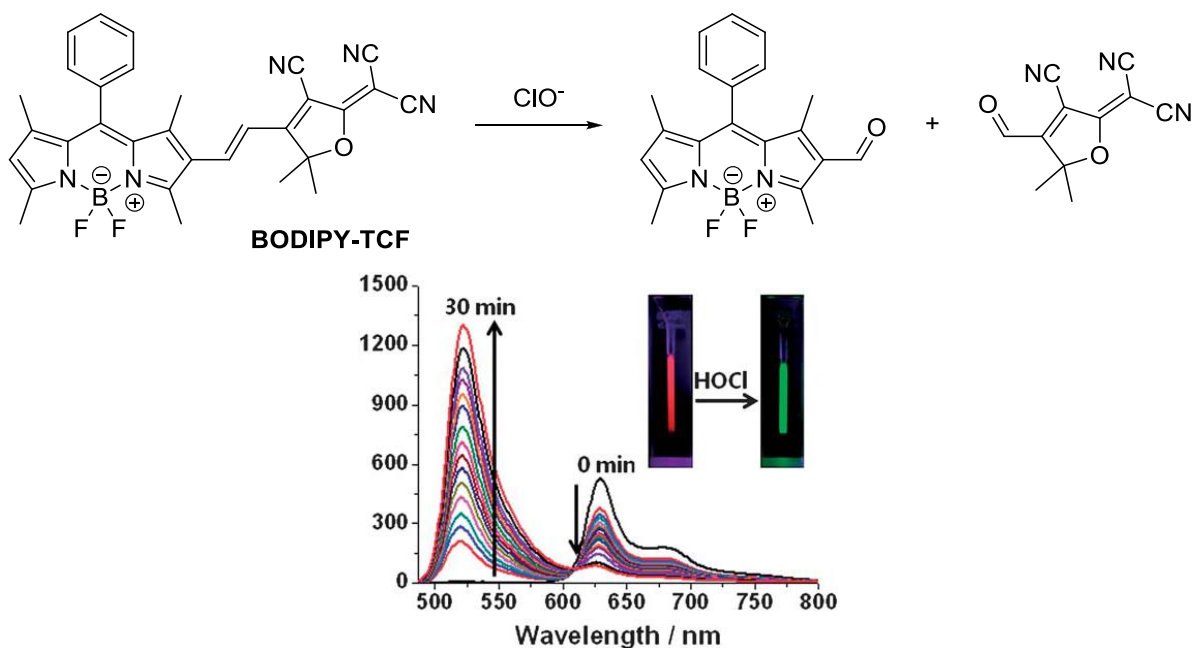


Figure I-19. La réaction de la sonde **BODIPY-TCF** avec ClO^- permet de retrouver la fluorescence de la BODIPY alors que celle de la sonde **BODIPY-TCF** disparaît. Spectres d'émission de la sonde **BODIPY-TCF** ($\lambda_{\text{exc}} = 465 \text{ nm}$) au cours de la réaction avec NaOCl ($60 \mu\text{M}$) dans un tampon PBS. En insert : photographies de la sonde en absence (gauche) et en présence (droite) de NaOCl sous lampe UV. tiré de [29]

La présence du **TCF** étend la conjugaison et permet un décalage bathochrome des longueurs d'onde d'absorption et d'émission (respectivement 90 nm et 120 nm) ainsi que, malheureusement, une diminution du rendement quantique. L'addition de NaOCl rompt cette conjugaison et entraîne de grands changements dans les propriétés de fluorescence : la couleur émise change du rouge vers un vert intense comme on retrouve les propriétés d'une BODIPY non substituée (Figure I-19) utilisable pour l'imagerie in-vitro

La détection d'espèces métalliques est aussi possible avec des sondes de type **TCF**. La réaction de la sonde synthétisée **Hg-TCF** par Atta *et al.* [30] avec le mercure (II) entraîne ainsi une cyclisation et la formation d'un benzofuranylmercure (Figure I-20). Cette cyclisation est sélective vis-à-vis des autres espèces métalliques et s'accompagne d'une modification de l'absorption avec une décoloration et une couleur qui passe du bleu au jaune très clair. Malheureusement, cette réaction se fait dans un mélange comportant 30 % de DMSO, ce qui n'est pas utilisable pour une visée biologique. De plus, les auteurs n'ont pas testé les propriétés de fluorescence.

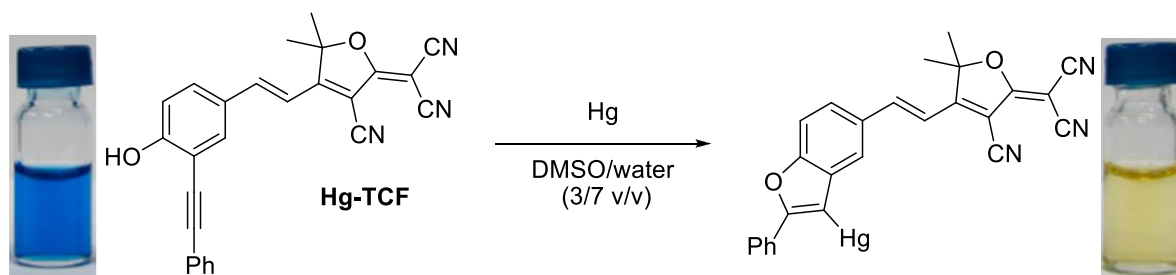


Figure I-20. Réaction de la sonde Hg-TCF avec le mercure qui permet la cyclisation et la formation de benzofurane. De part et d'autre de la réaction : photographies de solutions de la sonde et du produit dans un mélange DMSO/H₂O.

3.B.ii Thiols et espèces soufrées

Une autre famille présente en grande quantité dans les milieux biologiques et pouvant être la cible de sondes TCF est formée par les espèces soufrées : les différents thiols ou les plus simplement les ions sulfites. Le premier exemple (**I-6**) correspond à l'allumage d'une sonde en présence de différents thiols^[16]. L'aniline conjuguée au groupement TCF est porteuse d'une part du groupement polyéthylène glycol qui assure la solubilité dans l'eau et d'autre part d'un dinitrophényl-sulfonamide qui va assurer la réactivité avec les différents thiols.

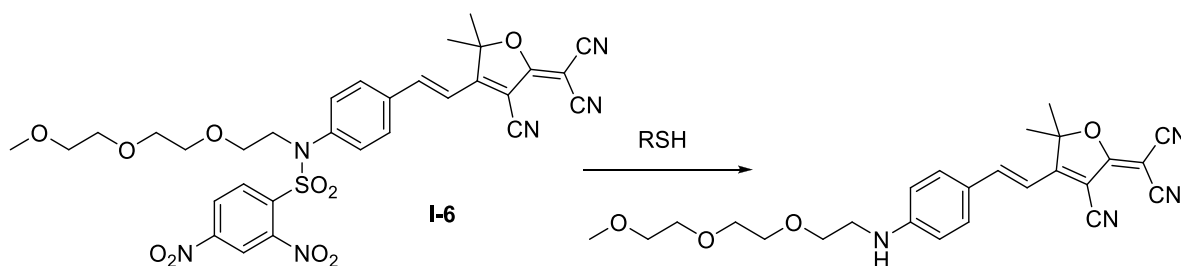


Figure I-21. Déprotection de la sonde I-1 par un thiol pour redonner la fluorescence.

La protection de l'aniline par le groupement 2,4-dinitrobenzène sulfonamide éteint la fluorescence en conjuguant l'azote au groupement sulfonyle, ce qui diminue son côté électro-donneur. Le thiol réagit par addition élimination sur le soufre et libère l'amine libre. Ceci permet de retrouver la fluorescence avec une multiplication par 120 du signal et une émission avec un maximum de 620 nm. Cette protection est relativement sélective et seuls les thiols permettent de retrouver la fluorescence. Encore une fois, l'intensité maximum est située à 623 nm, ce qui a permis une visualisation *in-vitro* des thiols avec un très faible bruit de fond.

Les ions SO₃²⁻ peuvent aussi être détectés par des sondes basées sur les TCF. L'exemple de Wu *et al.*^[18] (Figure I-22) montre que ces ions peuvent former une addition de Michael sur les cétones α,β-insaturées et modifier les propriétés de fluorescence de telles sondes. La diminution de la longueur de

conjugaison se retrouve dans les longueurs d'onde d'émission du produit qui sont décalées vers le vert. La sonde peut alors être utilisée de manière ratiométrique car l'émission à 663 nm, caractéristique de la sonde **I-7**, diminue tandis qu'une nouvelle bande correspondant au produit de l'addition des ions sulfites, apparaît à 523 nm. Il est alors possible de remonter à la concentration en sulfite.

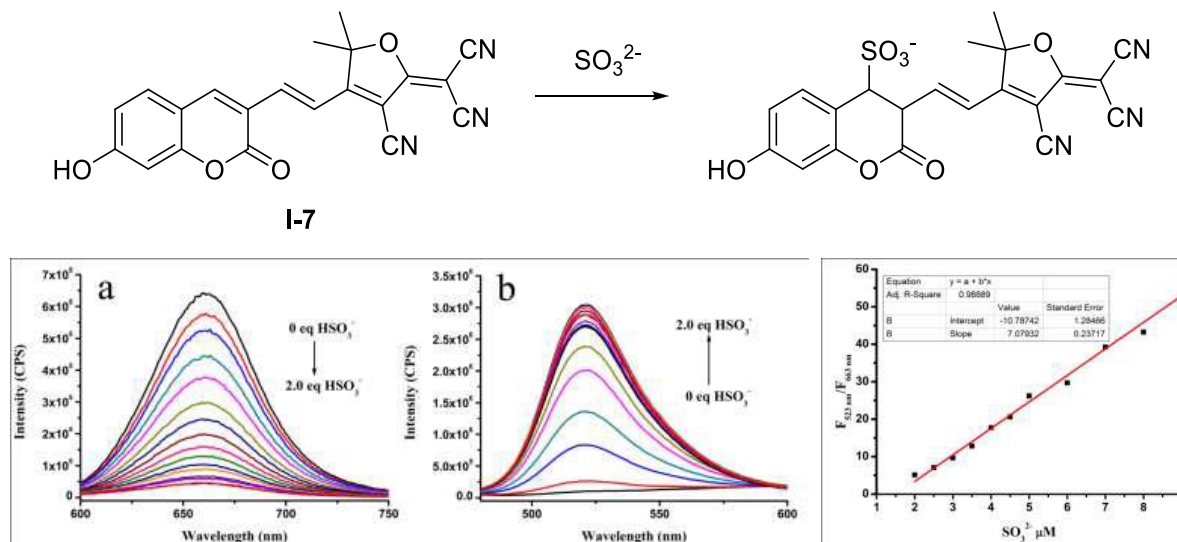


Figure I-22. Addition des ions sulfites sur la sonde **I-7** pour modifier grandement les propriétés spectroscopiques. Spectres d'émission de **I-2** (gauche, $\lambda_{exc} = 580$ nm) et du produit de la réaction (centre, $\lambda_{exc} = 466$ nm) dans un tampon HEPES à pH 7,4. Droite : Ratio d'intensité entre les deux bandes permettant de remonter à la concentration en SO_3^{2-} . tiré de [18].

3.C. Détection de protéines

Il est aussi possible de détecter des protéines, que ce soit leur présence ou leur activité. Une méthode couramment employée est de substituer une aniline ou de l'intégrer dans une liaison peptidique pour la greffer sur une enzyme ou un substrat d'enzyme.

3.C.i Présence de protéines

L'intérêt des fluorophores **TCF** consiste en leur faible taille lorsqu'on les compare aux protéines GFP. Ils peuvent ainsi accéder à des endroits beaucoup plus confinés, même lorsqu'ils sont attachés à un substrat. Une première démonstration a été apportée par Ondrus *et al.*[31] avec l'utilisation de saxitoxine conjuguée à un fluorophore : **STX-TCF** (Figure I-23). La saxitoxine est un poison qui se lie au pore extracellulaire des canaux à sodium contrôlés par le potentiel de membrane. De par sa taille, une protéine GFP couplée à la saxitoxine modifierait les propriétés d'association mais la sonde **STX-TCF**, elle, possède des propriétés inchangées. Il est alors possible de suivre la localisation et la diffusion de tels canaux au sein de la membrane. L'intensité émise par la sonde est suffisante pour permettre de suivre chaque molécule fluorescente et donc de suivre individuellement chacun des canaux. L'analyse de ces trajectoires montre qu'ils se déplacent dans la membrane à la vitesse de 680-970 nm/s.

Même si leur rendement quantique est inférieur à 10 %, cet exemple montre que les fluorophores **TCF** sont suffisamment fluorescents pour permettre de détecter des molécules uniques. Chaque molécule peut en effet émettre des millions de photons avant d'être photoblanchie. Un suivi de molécule unique est possible alors à la condition que l'émission soit suffisamment décalée vers le rouge pour éliminer le bruit de fond dû à l'autofluorescence du milieu, ce qui est le cas pour ce type de fluorophores.

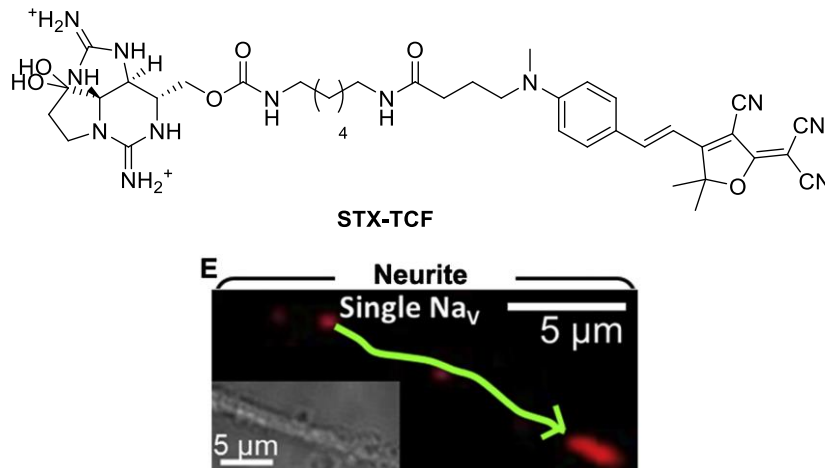


Figure I-23. Structure de **STX-TCF** développée par Ondrus et al. pour marquer les canaux à sodium.^[31] Suivi d'un canal marqué par **STX-TCF** au cours du temps au sein d'un neurite. Cette image est la superposition de 302 images acquises toutes les 50 ms.

3.C.ii Activité enzymatique

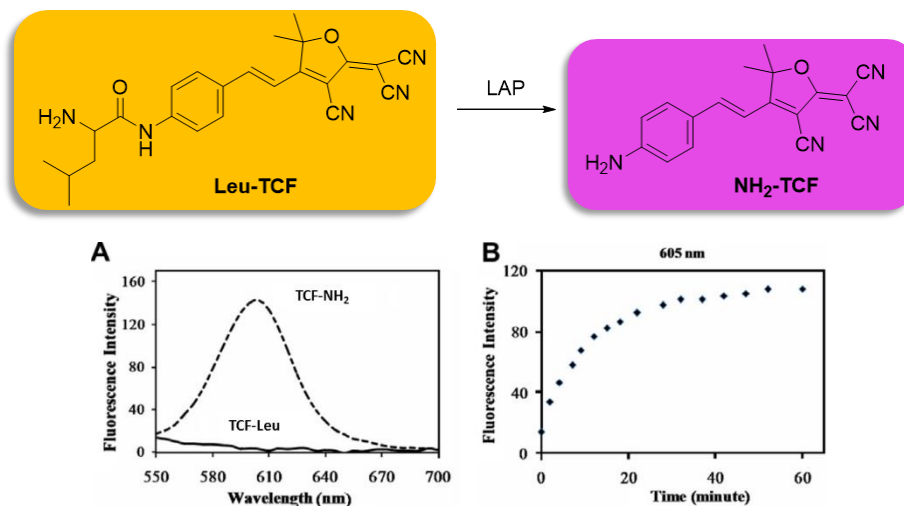


Figure I-24. Sonde pour l'activité de la leucine aminopeptidase développée par Yoon et al.^[32] A : spectres d'émission de **TCF-NH₂** et **TCF-Leu** ($\lambda_{exc} = 525 \text{ nm}$) B : cinétique de réaction de la sonde avec la leucine amino peptidase ($\lambda_{exc} = 525 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 605 \text{ nm}$)

Chapitre I : Le TCF à travers la chimie

L'exemple précédent montrait seulement des interactions entre la sonde et la protéine mais il est possible d'obtenir une réaction entre les deux. En générale, cette approche s'accompagne de la libération d'une simple aniline-TCF : $\text{NH}_2\text{-TCF}$ (voir Figure I-24 et Figure I-26). Le premier exemple correspond à l'activité de la leucine aminopeptidase^[32]. Cette enzyme clive un lien peptidique et comme son nom l'indique, elle est capable de détecter la présence d'une leucine. La sonde est donc basée sur cette architecture avec l'aniline qui forme une liaison peptidique avec une leucine (**Leu-TCF**, Figure I-24). Comme l'azote est aussi conjugué sous forme amide, il est très peu donneur vis-à-vis du reste de la molécule ce qui entraîne une disparition de la fluorescence avant activation. La rupture du lien peptidique par l'enzyme permet de retrouver la fluorescence. Cette réaction s'accompagne aussi d'un changement de couleur, du jaune vers le rose et d'une apparition de la fluorescence

Sur le même modèle, Yount *et al.*^[33] ont greffé un acide aminé glutamate via un pont urée. Là encore la conjugaison du groupement urée permet de diminuer la fluorescence de la pro-sonde **Glu-NH₂-TCF** avec le même changement de couleur que précédemment (Figure I-25). Cette sonde est substrat de la carboxypeptidase G2 (**CPG2**). C'est une enzyme rapporteuse (« reporter enzyme ») qui permet de vérifier la présence de certaines protéines : le gène de l'enzyme est fusionné au gène cible. Si le second est exprimé, la protéine est produite mais fusionnée avec l'enzyme **CPG2**. Celle-ci peut alors réagir sur la sonde pour allumer le signal.

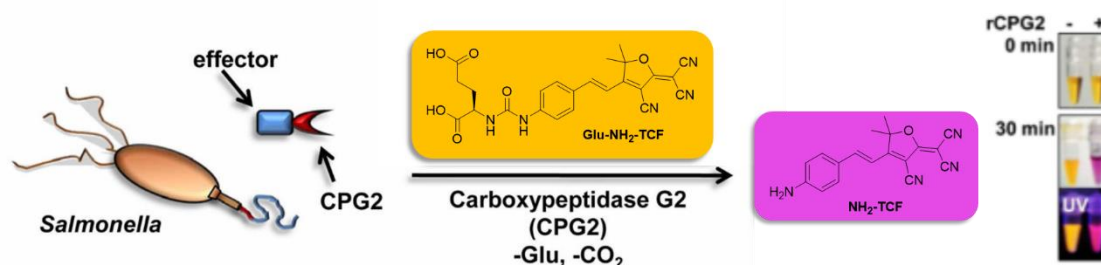


Figure I-25. Détection de certaines protéines par Yount *et al.* à l'aide d'une enzyme fusionnée à la protéine qui réagit sur la sonde. Droite : photographie de la sonde en absence (-) et présence (+) de CPG2 à t = 0 min (lumière blanche, haut), t = 30 min (lumière blanche, centre et UV bas). adapté de ^[33]

La transformation d'un groupement nitro en groupement amine est aussi un moyen de détecter une activité enzymatique. L'enzyme ciblée, dans ce cas-là, est la nitroréductase^[34]. Le nitro est un fort groupement attracteur, ce qui rompt le caractère dipolaire de la molécule **NO₂-TCF** et éteint la fluorescence qui peut être, de nouveau, récupérée après activation par l'enzyme.

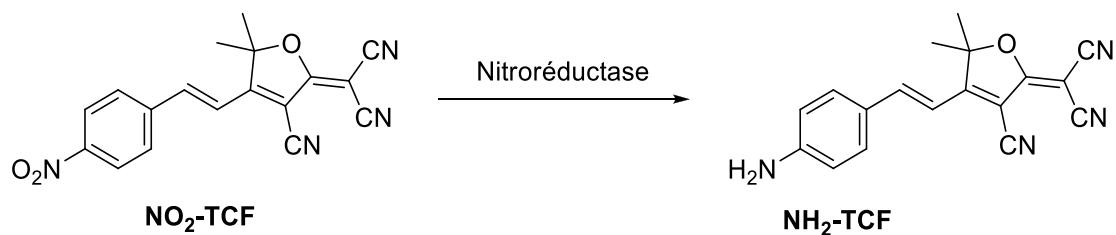


Figure I-26. Sonde DCDHF-NO₂ pour l'activité de la nitroréductase développée par Lee et al.^[34]

3.D. Microscopie super résolue STORM

Le fluorophore **NH₂-TCF** présente aussi l'avantage de pouvoir être activé, non par voie enzymatique mais par voie photochimique. En remplaçant l'amine par un groupement azido (**N₃-TCF**), l'architecture D-π-A est détruite car l'azido est faiblement électro-attracteur. Cependant il est photolabile sous irradiation à 407 nm et conduit à un nitrène intermédiaire. Celui-ci est suffisamment stabilisé par la présence du **TCF** pour permettre la formation d'une amine : **NH₂-TCF** (Figure I-27).

La Figure I-27 permet de mettre en évidence l'efficacité de ce type de fluorophores : avant activation, des cellules incubées avec **N₃-TCF** ne montrent aucune fluorescence alors que la photoactivation permet d'obtenir une image beaucoup plus lumineuse. L'intensité nécessaire pour convertir la sonde en **NH₂-TCF** est extrêmement faible : 3 ordres de grandeur inférieurs à l'intensité nécessaire à l'acquisition de l'image^[35], ce qui préserve l'intégrité des cellules.

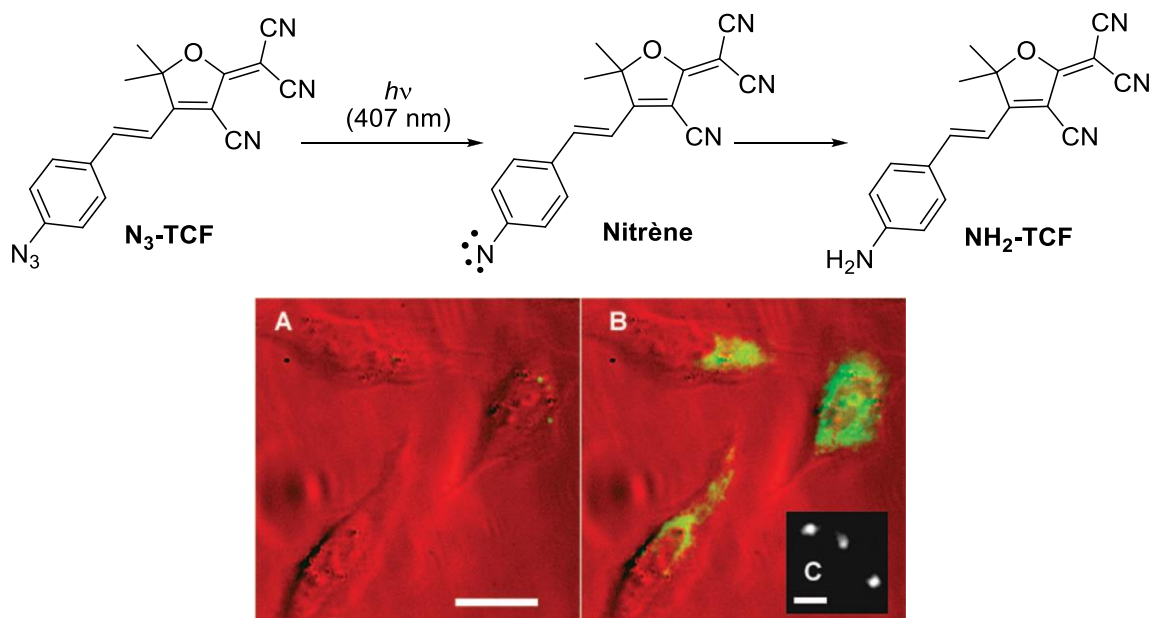


Figure I-27. Haut : réaction de photoactivation de **TCF-N₃**. La perte de diazote forme un nitrène intermédiaire hautement réactif qui peut ensuite former l'amine fluorescente. Bas : Images de cellules CHO incubées avec **TCF-N₃**. Gauche : avant photoactivation. Droite : après photoactivation par un flash de 10 s de lumière (407 nm, 0,4 W/cm²). L'image par transmission est en rouge, la fluorescence ($\lambda_{exc} = 594 \text{ nm}$) en vert. Barre d'échelle : 20 μm . adapté de^[35]

Ce mode d'activation est très recherché pour les nouvelles formes de microscopie hautement résolues de type STORM. De plus, par rapport aux mutants GFP utilisés habituellement, ils émettent plus de photons avant d'être blanchis et peuvent être modifiés facilement pour s'adapter aux désirs des chimistes. L'équipe de W. E. Moerner a greffé la sonde présentée dans la Figure I-28 sur des protéines pour suivre leur localisation dans les cellules^[17] par microscopie STORM. La présence des groupements oxygénés sur le noyau aromatique augmente tellement la photosensibilité qu'il est possible d'activer la molécule avec la seule présence d'un écran d'ordinateur allumé à côté du microscope. Ceci permet de prévenir tout dommage dans les cellules mais entraîne une autre complexification pour la préparation des échantillons dans le noir. Ces sondes ont permis d'obtenir des images de protéines responsables de la division cellulaire (PopZ et AmiC) dans des bactéries *C. crescentus* non fixées (i.e. vivantes) au cours de la mitose avec une précision de l'ordre de la trentaine de nanomètres.

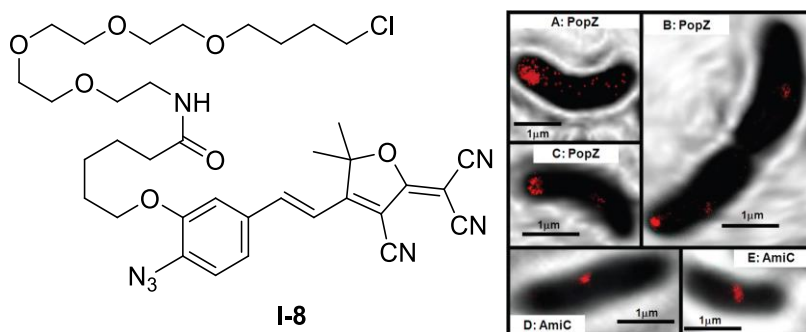


Figure I-28. Sonde pour la microscopie super résolue pouvant se fixer sur certaines protéines. Droite : images super-résolues (STORM) des protéines ciblées (PopZ et AmiC) à l'intérieur de cellules de *C. crescentus* avec une précision de 32 nm. temps d'acquisition : 75 s. tirés de Lee et al.^[17]

Il faut cependant noter que Chen *et al.*^[36] ont récemment montré que la photoactivation n'est pas la seule méthode de conversion d'un azido en amine. La présence de sulfure d'hydrogène (H₂S) permet, elle aussi, de former **NH₂-TCF** à partir de **N₃-TCF** avec certes une cinétique plus faible (1 h pour une conversion complète) mais non nulle et permet de parfaitement imager des cellules incubées en présence de sulfure d'hydrogène.

I.4 Objectifs de ce travail de thèse

Le but de cette thèse est de développer l'utilisation de fluorophores dérivés du groupement **TCF**, comme sondes en biologie. En effet, même si le chapitre de présentation n'en donne pas l'impression, les possibilités qu'offre ce groupement sont peu exploitées en biologie (sur les trois cent structures répertoriées sur SciFinder, les exemples à visée biologique sont peu nombreux et quasiment

tous présentés dans les pages précédentes). En particulier, les architectures avec des amines comme groupement donneur sont surreprésentées par rapport aux autres groupements donneurs qui existent.

4.A. Quel est l'apport d'atomes d'oxygène pour de telles structures ?

Comparé au grand nombre de structures azotées, il n'existe que peu de molécules porteuses d'un atome d'oxygène comme groupement électro-donneur : cinq publications et un brevet et l'une d'entre elles ne traite que de la synthèse sans s'intéresser aux propriétés^[37]. La seule application qui se rapproche de la biologie est la détection de mercure présentée plus haut (3.B.i, page 16). Les autres références sont plutôt des applications électro-optiques au sein de polymères^[38-40] développées au sein du laboratoire de F. Fernández-Lázaro. Même si les propriétés non linéaires de ces composés (Figure I-29) sont moins intéressantes que le **CLD-1** ou **CPO-1** avec des valeurs de $\mu\beta$ ne dépassant pas 1000×10^{-48} esu^[38] qui s'explique par une conjugaison plus réduite et un caractère dipolaire moins marqué, ils sont cependant beaucoup plus simple à synthétiser et peuvent être produits en grosse quantités. De plus, compte tenu de la petite taille du système conjugué, les valeurs de $\mu\beta$ sont relativement élevées.

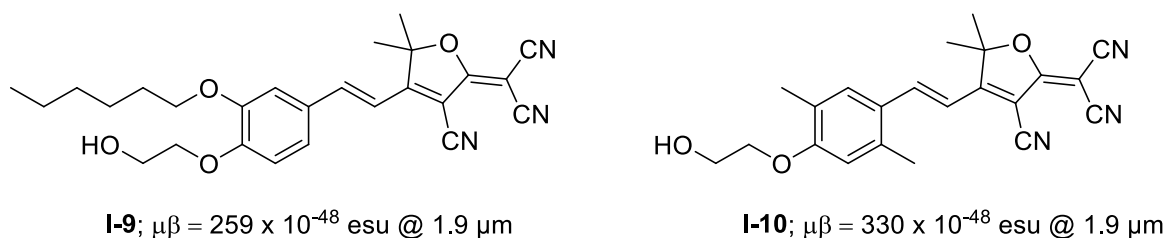


Figure I-29. Structure des fluorophores oxygénés développés au sein de l'équipe de F. Fernández-Lázaro

Les différentes propriétés de ce type de composé sont avantageuses pour des études en biologie : les études photophysiques montrent qu'ils sont plus stables vis-à-vis du photoblanchiment que leurs équivalents porteurs d'azotes. De plus, même si les propriétés spectroscopiques sont décalées vers le bleu ($\lambda_{em} = 580$ nm pour **I-9**), le déplacement de Stokes est plus important : 125 nm contre 57 nm pour **TCF-NH₂**. Enfin, le rendement quantique mesuré semble être plus important avec des oxygènes : 0,8 % pour **I-9**^[39] tandis que **TCF-NEt₂** n'a qu'un rendement de 0,2 % dans l'eau^[41]. Dans un milieu très visqueux comme lorsqu'ils sont incorporés au sein de polymères, ces rendements de fluorescence sont encore améliorés, ce qui est un avantage pour une utilisation en biologie où les membranes, par exemple, sont des environnements très contraints. Nous avons donc décidé de nous intéresser à ce type de molécule.

4.B. Applications en solution

Les chapitres 2 et 3 seront consacrés à la fluorescence en solution. Le but du premier projet était d'obtenir des fluorophores dont les propriétés spectroscopiques sont modifiées par la présence ou la réaction avec des molécules présentes dans le corps humain. Dans un premier temps, une série de phénols couplés à des groupements TCF a permis d'obtenir des sondes sensibles au pH (Figure I-30 et chapitre 2). Le pKa de ces sondes a été étudié et optimisé pour l'adapter au pH physiologique. Après une étude photo physique approfondie qui a permis de mesurer de manière ratiométrique le pH, ces sondes ont été testées en conditions *in-vitro* pour vérifier leur possible application. Enfin ces sondes ont été fonctionnalisées pour permettre de cibler certains organites tels les mitochondries.

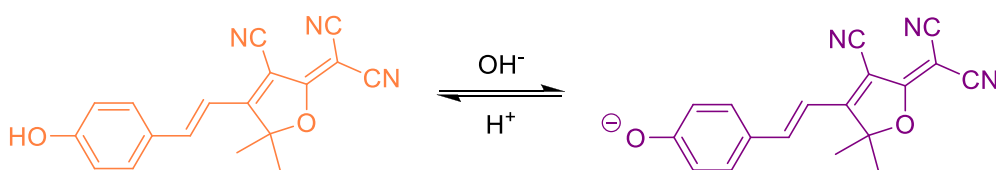


Figure I-30. Exemple de sonde pH développée dans le chapitre 2.

En remplaçant le groupement hydroxyle par un groupement pinacolborane (chapitre 3), la fluorescence est éteinte et seule la réaction avec le peroxyde d'hydrogène permet de retrouver un phénol comme ceux étudiés au chapitre 2 (Figure I-31). La synthèse des sondes ainsi que leur analyse spectroscopique ont été effectuées avec un accent particulier mis sur la sensibilité de faibles concentrations en peroxyde d'hydrogène et la sélectivité vis-à-vis des autres espèces oxydantes. La libération du phénol permet aussi de mesurer en parallèle le pH de la solution. Enfin, une étude de l'influence de divers sucres a été menée. Ces sucres permettent d'améliorer la cinétique au détriment du caractère OFF/ON de ces sondes.

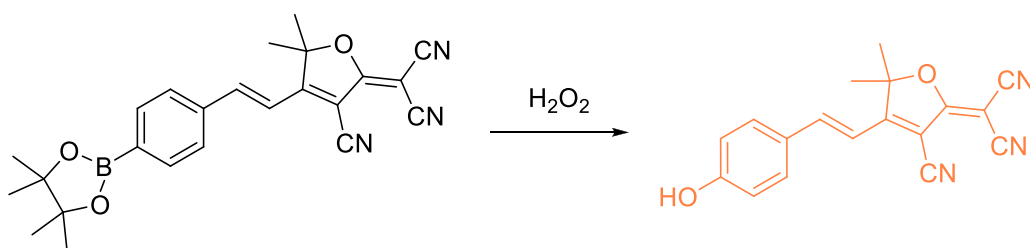


Figure I-31. Exemple de sonde au peroxyde d'hydrogène étudiée dans le chapitre 3.

4.C. Fluorescence à l'état solide

La fluorescence à l'état solide sera étudiée dans les deux derniers chapitres, tout d'abord d'un point de vue fondamental puis avec une possible application pour la détection enzymatique. Dans le

chapitre 4, les groupements phénols des premiers chapitres ont été remplacés par des groupements méthoxys (Figure I-32). La fluorescence à l'état solide de ces différents composés a été étudiée et une émission très décalée vers le rouge a été obtenue. Ces composés présentent la propriété d'être peu fluorescents en solution ce qui amène une apparition de celle-ci lors de la précipitation des composés dans un non solvant. Une étude de l'organisation dans le cristal a aussi été menée pour tenter de mettre en relation la structure du fluorophore, les longueurs d'émission et la présence d'agrégats H ou J.

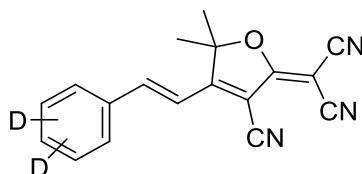


Figure I-32. Structure des composés étudiés dans le chapitre 4 avec comme groupement donneur des méthoxys, des halogènes ou des carbazoles.

D'autres groupements donneurs ou un allongement de la conjugaison peuvent aussi modifier les propriétés spectroscopiques vers la fenêtre de transparence biologique. L'introduction de groupement carbazole a ainsi permis d'obtenir des composés avec des maxima d'émission au-delà de 700 nm.

Ces composés ont ensuite été utilisés dans le **chapitre 5** pour détecter une activité enzymatique. Les enzymes ciblées sont la phosphatase alcaline et une β -glucosidase. En greffant un phosphate ou un glucose sur un composé fluorescent à l'état solide comme par exemple **isovanilline-TCF** (Figure I-33), nous avons voulu disposer de sondes solubles capables de libérer le fluorophore après activation par l'enzyme. La précipitation de ce dernier s'accompagne alors de fluorescence à l'état solide. Une deuxième génération de sondes a été synthétisée avec des groupements espaceurs pour faciliter la reconnaissance enzymatique ainsi que diminuer la solubilité.

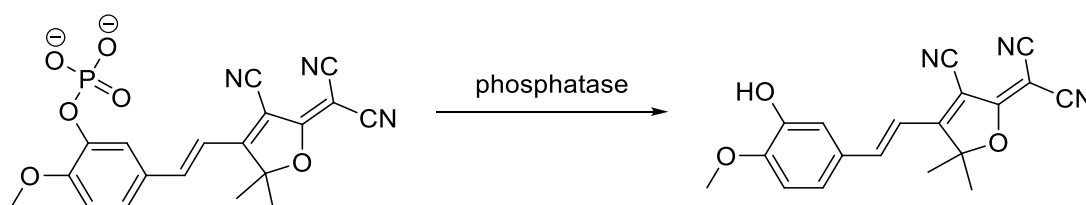


Figure I-33. Exemple de sonde enzymatique décrite dans le chapitre 5.

Chapitre II De l'optimisation du pKa à la synthèse de sondes sensible au pH

Ce chapitre présente une première application de l'utilisation du groupement **TCF** pour l'imagerie biologique. Il s'agit de sondes fluorescentes sensibles à des variations de pH dans des milieux biologiques. En effet, la concentration en proton dans un milieu intracellulaire (pH_i) ou extracellulaire (pH_e) n'est pas une grandeur fixée de manière absolue. En réalité, cette valeur est très finement régulée par l'organisme et il est important d'être capable d'enregistrer ces variations qui peuvent fournir de nombreuses informations sur les mécanismes physiologiques ou l'état de santé de l'organisme.

II.1 Quel intérêt à étudier le pH cellulaire ?

1.A. Une régulation des processus biologiques grâce au pH intracellulaire

Même s'il est communément admis que le pH physiologique présente une valeur comprise entre 7,0 et 7,4, celui-ci présente de grandes variations locales au sein d'une cellule, d'un tissu cellulaire ou d'un organisme. Le pH représente alors un moyen de contrôle de nombreux mécanismes biologiques car une variation de la concentration en ions H^+ peut moduler l'activité enzymatique et contrôler de nombreux processus physiologiques.

1.A.i Quand l'activité enzymatique dépend du pH

L'activité de nombreuses protéines est pH-dépendante : une protonation ou déprotonation de sites sensibles au pH peut modifier leur conformation et donc l'activité enzymatique (loi d'allostérie par exemple). Un exemple parmi d'autres est représenté par des échangeurs Na^+/H^+ présents dans la membrane cellulaire. Ceux-ci permettent d'évacuer des protons vers le milieu extérieur en échange d'ions sodium grâce à des canaux transmembranaires. Ceux-ci sont ouverts quand l'échangeur est protoné, i.e. quand le pH_i est inférieur à 7,0^[42]. Par contre quand le milieu intracellulaire atteint une valeur de pH supérieure, l'échangeur change de conformation à cause d'une déprotonation, le canal se ferme et il n'y a plus d'échange.

Dans le même ordre d'idée, de nombreuses autres enzymes présentent une gamme de pH préférentielle. Parmi les différents exemples, on peut citer l'adénylate cyclase^[43] (notée AC qui

Chapitre II : De l'optimisation du pKa à la synthèse de sondes sensible au pH

synthétise l'AMP cyclique, messenger cellulaire) dont l'activité augmente avec le pH (voir Figure II-1, ci-dessous), la phosphodiesterase^[44] de rat (PDE, rupture de liaison phosphodiester) avec un pH optimum à 7,2 (voir Figure II-1, ci-dessous) ou encore l'endonucléase de cellule Jurkat^[45] (cellule de lymphocyte T) active lorsque le pH intracellulaire (pH_i) est acide, inférieur à 6,8 (voir Figure II-2, ci-dessous) avec un maximum à un pH de 6,2.

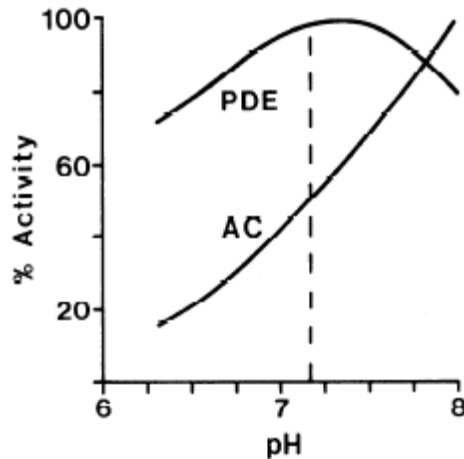


Figure II-1. Activité en fonction du pH de l'adénylate cyclase (AC) et de la phosphodiesterase (PDE) de foie de rat. Les pointillés représentent le pH_i mesuré dans le foie. Tiré de ^[46]

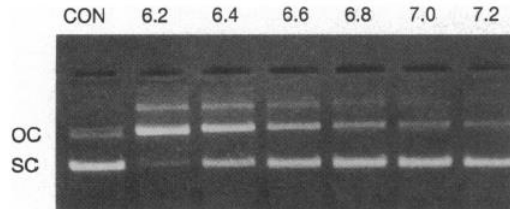


Figure II-2. Gel de migration montrant la dépendance en pH de l'activité de l'endonucléase provenant de cellules Jurkat. Cette enzyme transforme de l'ADN plasmidique enroulé (SC) en cercle ouvert (OC) désenroulé qui migre moins sur un gel d'agarose. Tiré de ref ^[45]

1.A.ii pH et croissance cellulaire sont liés

Cette régulation de l'activité enzymatique permet un contrôle des différents processus présents à grande échelle dans l'organisme^[46]. Une alcalinisation ou une acidification du pH_i participe à l'activation simultanée de différentes enzymes et permet une synergie des effets. Un exemple particulièrement remarquable dans ce domaine est la croissance cellulaire et son contraire, l'apoptose.

En général, la prolifération cellulaire est accompagnée d'une augmentation du pH_i^[47] comme le montre la Figure II-3 pour des cellules lymphoïdes : lors des 2 premiers jours, lors de la croissance cellulaire, le pH_i augmente pour atteindre un pic autour de 7,8. Au contraire, une acidification soudaine

II.1 : Quel intérêt à étudier le pH cellulaire ?

du pH_i accompagne généralement l'apoptose de la cellule comme on peut le voir sur la même figure à partir du 2nd jour. A la fin de l'expérience, quand moins de 20 % des cellules sont viables, le pH se situe autour de 7,2 soit 0,3 unités de pH en dessous du pH qui permet le développement des cellules. Cela a aussi été montré pour les cellules HL60 dont le pH diminue de 0,2 à 0,3 unités lorsqu'elles entrent en apoptose^[48].

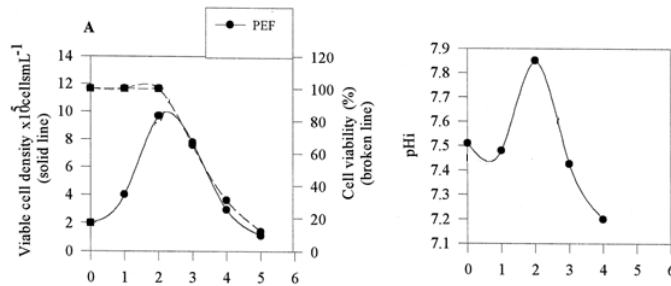


Figure II-3. Evolution de la densité cellulaire (gauche, trait plein), de la viabilité (gauche, pointillés) et du pH (droite) de la lignée cellulaire lors de traitement encourageant la prolifération (jours 0 à 2) puis l'apoptose (Jours 2 à 4). En abscisse, l'échelle est en jours. Adaptée de^[47]

En plus d'accompagner la croissance et l'apoptose, une variation de pH peut être à l'origine d'un changement de comportement : une première preuve a été apportée par Gottlieb *et al.*^[45] grâce à l'utilisation d'une base faible pour empêcher la diminution du pH. Cette méthode permet d'inhiber la mort cellulaire et entraîne la survie de cellules qui étaient entrées en phase d'apoptose. Au contraire, lorsqu'on diminue artificiellement le pH_i de la cellule, de nombreuses protéines chargées de « digérer » l'ADN deviennent actives. Ces protéines, comme par exemple l'endonucléase présentée à la page précédente, vont détruire le matériel génétique et induire l'apoptose. Une augmentation du pH_i permet, quant à elle, de démarrer la production d'ADN nécessaire à la mitose et ce, quelle que soit la phase dans laquelle la cellule était précédemment^[49]. La vitesse de cette production augmente même avec le pH que ce soit pour de l'ADN cellulaire^[50] ou des réplifications de génome viral^[51]. En réalité tout le processus de mitose est accéléré à pH 8 par rapport à pH 6,6 comme l'ont montré Obara *et al.*^[52].

Tous ces exemples montrent que le contrôle du pH est nécessaire pour la cellule car celui-ci implique un contrôle des processus physiologiques. Une valeur anormale du pH est révélatrice d'une mauvaise régulation de celui-ci et donc de dysfonctionnements à l'intérieur de la cellule. Comme la variation de pH est concomitante au dérèglement cellulaire, un pH anormal est souvent le signe d'une maladie. Il s'agit même d'un signe précoce apparaissant souvent avant les symptômes physiologiques macroscopiques. A titre d'exemple, les cellules cancéreuses sont légèrement plus acides (valeurs de 5,8 à 6,6^[53]) et la mesure de leur pH permettrait de détecter relativement tôt un possible cancer pour le traiter avant l'apparition d'autres symptômes.

1.B. De nombreuses sondes fluorescentes déjà disponibles

Différentes méthodes existent pour mesurer le pH intracellulaire. Parmi les premières mises au point, figurent l'utilisation de microélectrodes sensibles au pH et la RMN du phosphore ^{31}P des phosphates inorganiques (Pi) présents l'organisme. Malheureusement, la première est extrêmement invasive et s'accompagne d'une dégradation de la membrane cellulaire. Elle ne peut ainsi s'appliquer qu'à des cellules immobiles et facilement accessibles. Quant à la seconde, comme toutes les techniques basées sur la RMN, elle souffre d'une faible sensibilité et nécessite donc un volume d'échantillon plus important. De plus, il est très difficile d'obtenir des informations précises spatialement et le pH enregistré ne correspond généralement qu'au pH cytoplasmique et non à celui des différents organites.

Une autre méthode développée depuis une trentaine d'années pour faire face à ces inconvénients est la microscopie par fluorescence. A travers la protonation d'une fonction chimique, il est possible de modifier les propriétés spectroscopiques de la molécule et d'obtenir une sonde sensible à la variation de la concentration de protons. La partie suivante est consacrée à la description des sondes fluorescentes sensibles à des variations de pH_i autour du pH physiologique.

1.B.i BCECF, star des fluorophores sensibles au pH

La figure de proue de ces fluorophores est la sonde 2',7'-bis(carboxyéthyle)-5(6)-carboxyfluorescéine (**BCECF**, voir Figure II-4). Introduite par Tsien *et al.*^[54] en 1982, elle est aujourd'hui la plus utilisée pour mesurer le pH intracellulaire.

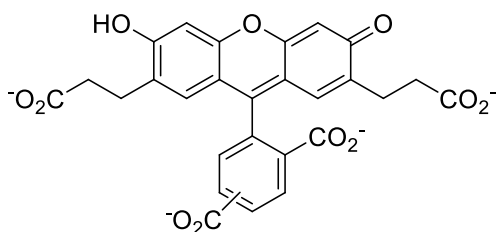


Figure II-4. Structure du fluorophore BCECF synthétisé par Tsien *et al.*

Basée sur un cœur fluorescéine, elle présente les avantages d'un rendement quantique de fluorescence élevé en milieu basique (84 %) et d'un pKa égal à 7,0 adapté au pH physiologique. Grâce à ses 4 groupements carboxylates déprotonés à pH neutre et donc porteurs de charge négative, le fluorophore est bien retenu dans la cellule, ce qui empêche une dilution du signal dans tout l'organisme. Ces mêmes charges négatives empêchent, par contre, l'entrée dans la cellule. Il faut donc protéger les groupements carboxylates sous forme d'esters acétoxyméthyles. Ces derniers sont

II.1 : Quel intérêt à étudier le pH cellulaire ?

ensuite clivés par les estérases présentes dans le cytoplasme. Les propriétés spectroscopiques de cette sonde sont présentées Figure II-5 (adaptée de [55]) avec une émission de couleur verte présentant un maximum d'intensité à 535 nm et une excitation dont la forme dépend du pH. Le maximum d'excitation est situé à $\lambda = 495$ nm et l'intensité correspondante varie en fonction du pH. A contrario, lors d'une excitation à $\lambda = 439$ nm, l'intensité de fluorescence est indépendante du pH (point isoémitif).

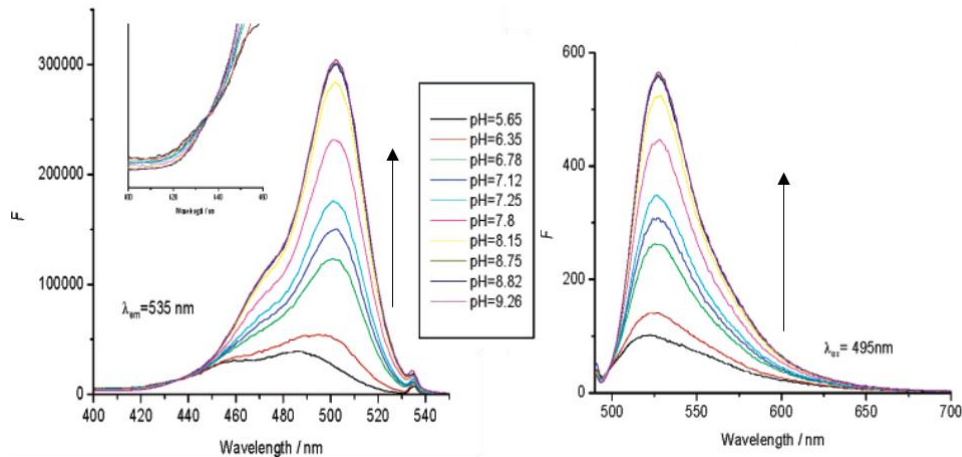


Figure II-5. Gauche : Spectres d'excitations ($\lambda_{em} = 535$ nm) de BCECF en fonction du pH. L'insert représente un grossissement du point pseudo-isoémissif à 439 nm. Droite : Spectres d'émission ($\lambda_{ex} = 495$ nm) en fonction du pH. Les flèches noires marquent l'évolution accompagnant une augmentation du pH. Adapté de [55]

En général, les variations de fluorescence ne sont pas uniquement liées à des variations de pH : Un photo-blanchiment de la sonde ou une diminution de la concentration de la sonde due à des phénomènes de relargage hors de la cellule peuvent entraîner une diminution de l'intensité mesurée. L'utilisation d'une seule longueur d'onde d'excitation ne permet donc pas d'obtenir à elle seule une mesure de pH_i . On utilise alors une excitation à une seconde longueur d'onde : le point isoémitif. Avec cette excitation, l'intensité de fluorescence est indépendante du pH et ne dépend que de l'environnement de la sonde (concentration, blanchiment, ions environnants). Le rapport d'intensité entre les deux mesures est indépendant de tout facteur extérieur et permet alors une évaluation du pH. Cette approche est appelée mesure ratiométrique en excitation.

Concrètement, pour **BCECF**, on effectue des mesures d'intensité à 535 nm avec deux longueurs d'ondes d'excitation : 439 nm et 495 nm. Le rapport entre les deux mesures permet de remonter au pH.

Cependant, l'absorbance à 435 nm est extrêmement faible, la fluorescence qui en résulte est donc, elle aussi, relativement faible, ce qui diminue la précision de la mesure. Pour surmonter ce problème, une nouvelle sonde a été proposée par Liu *et al.* [56] : 2',7'-bis-(2-carboxypropyl)-5-(and-6)-carboxyfluoréscéine (**BCPCF**, Figure II-7) avec l'allongement des bras espaceurs éthyles en propyles. Le

Chapitre II : De l'optimisation du pKa à la synthèse de sondes sensible au pH

pKa n'est pas modifié mais cet allongement permet de décaler le point isobestique (d'iso-absorption) vers le rouge de 19 nm, de 435 nm à 454 nm et s'accompagne d'une augmentation importante de l'absorption. Le fluorophore **BCPCF** semble ainsi être une meilleure sonde pour une détection ratiométrique en excitation.

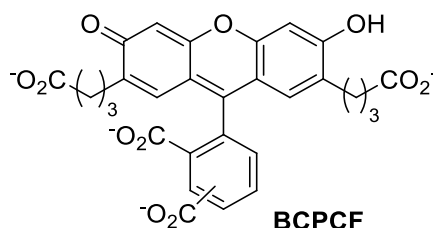


Figure II-6. Sonde BCPCF avec un allongement des bras espaceurs de la BCECF (d'où le P à la place du E dans le nom). Ces modifications structurales permettent un décalage du point isobestique de 435 nm à 454 nm.

Malheureusement, tout n'est pas pour le mieux dans le meilleur des mondes et ces deux sondes présentent quelques inconvénients. Le premier est un photo-blanchiment relativement rapide qui conduit à une baisse de la fluorescence et peut être nocif pour les cellules. Un autre inconvénient est dû à la longueur d'onde d'émission (525 nm) en dehors de la fenêtre de transparence biologique qui peut être parasitée par l'émission d'auto-fluorescence de protéines présentes dans la cellule.

1.B.ii La fonction phénol, très appréciée pour la détection du pH

Pour tenter de surmonter ces inconvénients, de très nombreuses autres sondes fluorescentes ont été synthétisées au cours des dernières années et un rapide tour d'horizon de la littérature permet de s'apercevoir de la prédominance de la fonction phénol^[57]. En effet, le pKa du phénol est de 9,95 et il est possible de le rapprocher des valeurs de pH physiologique assez facilement avec la présence de groupes électro-attracteurs qui peuvent stabiliser la forme phénoxyde. De plus, le groupement hydroxy OH est un faible groupe électro-donneur, quand la forme déprotonée O⁻ enrichit beaucoup plus le système avec une charge négative qui peut se délocaliser le long de la conjugaison. Le phénol et le phénolate correspondant présentent alors des caractéristiques très différentes en absorption et en émission.

Les sondes présentant un cœur benzoxanthène sont très utilisées. Ces fluorophores appartiennent principalement à trois catégories : seminaphthofluorones (pas d'acide carboxylique en 3', **SNAFR-1** est un exemple), seminaphthofluorescéines (SNAFL, dérivés de la fluorescéine donc avec un acide carboxylique en 3') et seminaphthorhodafuors (SNARF, moitié rhodamine, moitié fluorescéine donc avec un azote au lieu de l'oxygène attracteur). Ces sondes ont été présentées au début des années 1990 par Invitrogen^[58]. Les fluorophores SNARF sont généralement plus fluorescents

à pH basique (quasiment pas de fluorescence lorsqu'ils sont protonés) alors, qu'au contraire, les composés SNAFL présentent une intense émission lorsqu'ils sont protonés ($\Phi_f = 0.32$ à pH 5). L'ajout d'un second acide carboxylique sur le cycle aromatique au pied du xanthène permet de rajouter une charge négative à pH physiologique et entraîne une meilleure retenue du fluorophore dans la cellule. On parle alors de carboxy-SNAFR ou encore de C.SNAFR et de même de C.SNAFL et C.SNARF). La Figure II-7 présente quelques exemples de sondes avec un pKa proche des valeurs de pH physiologique et leurs caractéristiques sont présentées dans le Tableau II-1.

sonde	forme acide (nm)			forme basique (nm)			pKa	ratio excitation ou émission
	$\lambda_{\max,abs}$	$\lambda_{\max,em}$	Φ	$\lambda_{\max,abs}$	$\lambda_{\max,em}$	Φ		
BCECF	495	535	n.d.	495	535	0,84 (pH 10)	7,0	excitation
BCPCF	505	527	n.d.	505	527	0,83 (pH 10)	7,0	excitation
C.SNARF-1	544	575	0,03 (pH 5-6)	583	631	0,09 (pH 10)	7,5	les deux
C.SNAFL-1	510	539	0,32 (pH 5-6)	542	623	0,08 (pH 10)	7,8	les deux
1,4-DHPN	342	453	n.d.	402	483	n.d.	8,0	aucun
HPTS	405	514	1,0 (pH 5,5)	465	514	1,0 (pH 9,0)	7,3	excitation
Fluorene-pH	341	391	0,21 (pH 4)	382	580	0,56 (pH 10)	7,0	les deux
BODIPY-pH	489	607	0,18 (pH 4,1)	499	525	0,15	6,5	émission

Tableau II-1. Propriétés spectroscopiques des fluorophores les plus utilisés parmi ceux sensibles à des variations de pH physiologique.

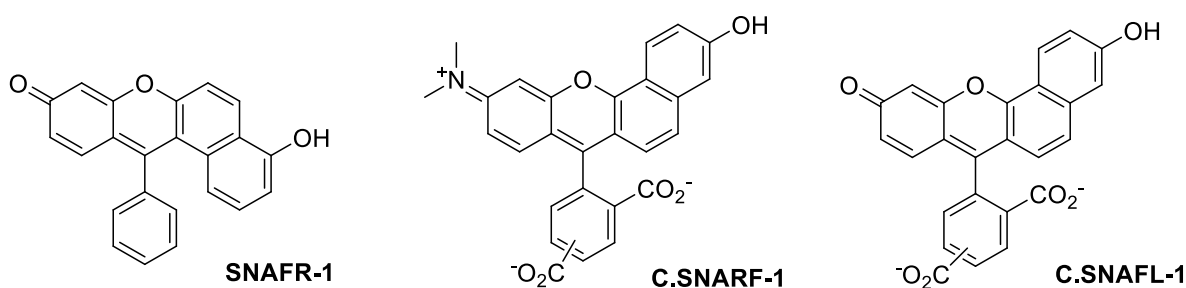


Figure II-7. Quelques exemples de fluorophores indicateurs de pH proche du pH physiologique basés sur des cœurs benzoxanthène ou dérivé. Les acides carboxyliques sont protégés sous forme d'ester acétoxyméthyle pour permettre l'internalisation dans la cellule avant d'être clivés par les estérases.

Les sondes les plus utilisées de ces catégories sont **C.SNARF-1** et **C.SNAFL-1** présentées Figure II-7. L'ajout d'un cycle naphthyle en lieu et place d'un phényle permet un allongement de la conjugaison et une complète modification des propriétés spectrales. La forme de l'émission dépend du pH (voir Figure II-8). En excitant à la longueur d'onde du point isobestique (534 nm pour **C.SNARF-**

Chapitre II : De l'optimisation du pKa à la synthèse de sondes sensible au pH

1), les formes phénols et phénolates ont le même coefficient d'absorption. L'intensité émise et mesurée à la longueur d'onde du phénol (585 nm) et du phénolate (637 nm) ne dépend que de la proportion de chacune des deux formes. Le rapport ainsi mesuré permet de déterminer le pH grâce à ce principe de mesure ratiométrique en émission.

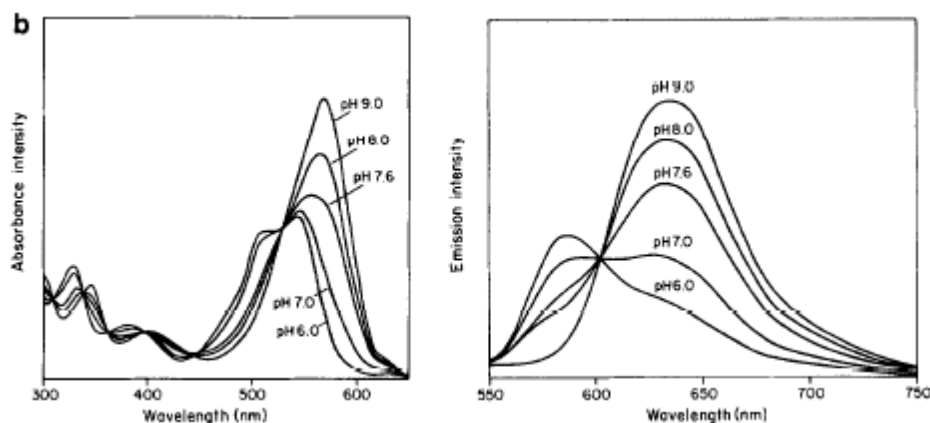


Figure II-8. Spectres d'absorption (gauche) et d'émission (droite) de C.SNARF-1 à différents pH. Pour les spectres d'émission, le fluorophore est excité au point isobestique, 534 nm. Tiré de^[58]

Le remplacement d'un oxygène par un azote (pour **C.SNARF-1**) permet de décaler vers le rouge les maxima d'absorption et d'émission vers le rouge (émission respectivement à 585 et 637 nm en milieu acide et basique). Ceci est très intéressant car on se rapproche de la fenêtre de transparence biologique et les mesures sont facilitées. Cependant ce décalage se fait au détriment du rendement quantique de fluorescence qui chute à moins de 10 % (3 % en milieu acide et 9 % à pH plus élevé pour **C.SNARF-1**).

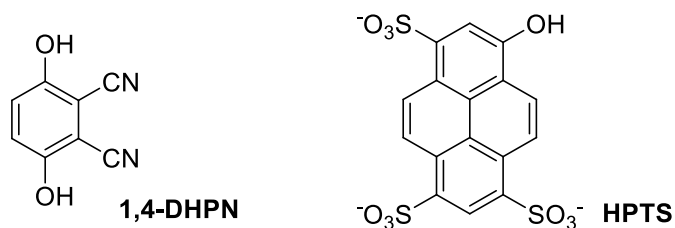


Figure II-9. Autres indicateurs fluorescents présent dans la littérature mais moins utilisés pour des raisons pratiques.

Avant d'être remplacé par le **BCECF**, un des premiers indicateurs pH utilisés était le 1,4-dihydroxyphthalonitrile^[59] (**1,4-DHPN**, Figure II-9) du fait de sa facilité d'utilisation. En effet, la longueur d'onde d'émission est directement corrélée au pH avec un décalage de 450 nm à 480 nm lors d'une augmentation de pH de 3 à 10. De plus, ce fluorophore n'est pas toxique pour la cellule et il est facile d'obtenir la version acétylée qui rentre dans la cellule. Cependant, il est rapidement excrété de la

cellule et relargué dans le milieu physiologique du fait de sa petite taille et du faible nombre de charges négatives (une à deux). De plus, les longueurs d'onde d'émission dans le bleu sont très loin d'être optimales et il est nécessaire d'utiliser une lumière excitatrice UV (350-360 nm) qui peut endommager les cellules. Enfin, cette molécule ne possède pas de point isobestique qui permette d'utiliser les méthodes ratiométriques considérées comme plus précises. Pour ces différentes raisons, cette sonde a été progressivement remplacée par les fluorophores présentés plus haut.

En termes de facilité d'utilisation, un autre fluorophore s'est très vite retrouvé dépassé. Il s'agit de l'acide 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfonique^[60] (**HPTS**, Figure II-9). Malgré une possibilité de l'utiliser en ratio d'excitation, le maximum de fluorescence est à 515 nm, ce qui est très éloigné des longueurs d'ondes préférentielles. De plus, il n'est absolument pas capable de passer à travers la membrane cellulaire. Cette limitation entrainera une très faible utilisation tant qu'il ne sera pas possible de protéger les acides sulfoniques par des groupes protecteurs qui seraient clivés à l'intérieur de la cellule par les enzymes présentes car le seul moyen actuel d'accomplir des mesures de pH_i avec cette sonde est de l'injecter directement à l'intérieur de la cellule à l'aide d'une micro-injection ou d'une électroporation.

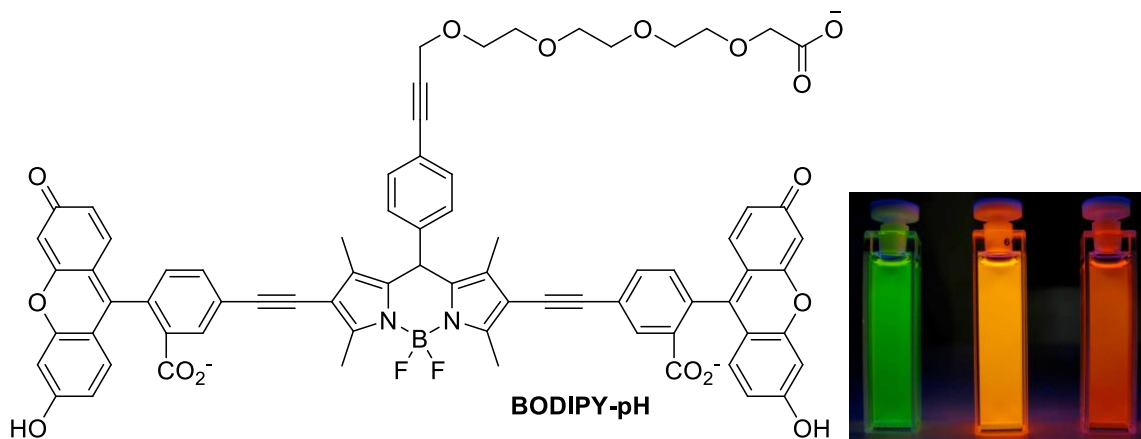


Figure II-10. Exemple de sonde pH basée sur le transfert d'énergie entre un groupe sensible au pH et un groupe accepteur. Droite : Fluorescence à divers pH : vert en milieu basique, pas de transfert d'énergie entre le cœur xanthène et la BODIPY. Orange en milieu acide avec émission de la BODIPY qui reçoit l'énergie du donneur. Jaune : émission des deux parties car le transfert n'est pas total.

Un dernier exemple basé sur la différence dans le caractère électro-donneur du phénol et du phénolate est présenté Figure II-10 (**BODIPY-pH**). Cette molécule^[61] est composée de deux motifs fluorescéine, un accepteur BODIPY et un groupement triéthylène glycol qui assure la solubilité aqueuse. Le transfert d'énergie par FRET entre la fluorescéine et la partie BODIPY dépend de l'état de protonation. En milieu acide ($pH < 6,0$), le xanthène est sous forme phénol et lorsqu'il est excité, le potentiel d'oxydation est idéal pour un transfert d'énergie total à la BODIPY qui à son tour fluoresce

Chapitre II : De l'optimisation du pKa à la synthèse de sondes sensible au pH

autour de 600 nm. Au contraire, sous forme phénolate, il n'y a plus de transfert d'énergie et la sonde fluoresce seulement par la partie xanthène ($\lambda = 520$ nm) d'où une couleur verte. Enfin, à un pH autour de 6,0, le transfert est seulement partiel et les deux parties fluorescent amenant la couleur jaune. Cette approche permet de conserver une molécule hautement fluorescente quel que soit le pH en excitant la fluorescéine. Le rapport d'intensité émise par chacune des deux parties dépend de l'efficacité du transfert qui elle-même ne dépend que du pH, ce qui permet une mesure ratiométrique.

1.B.iii La fonction amine, peu utilisée pour le pH physiologique

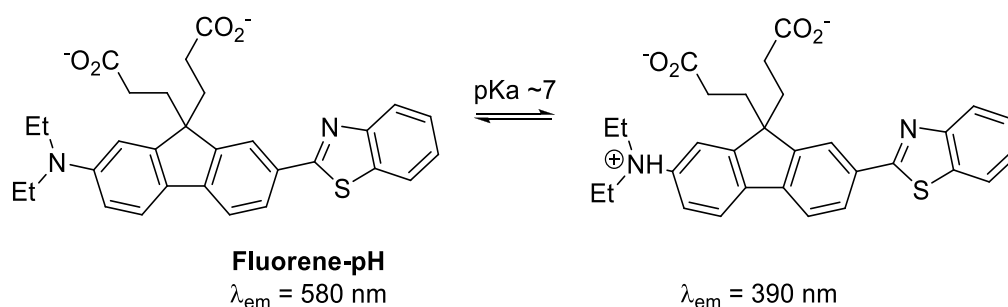


Figure II-11. Exemple de sonde sensible au pH basée sur la protonation d'une amine.

L'autre manière d'être sensible à la concentration en proton mais sans être porteur d'un groupement hydroxy est la protonation d'une amine comme présenté avec le **Fluorene-pH**^[62] (Figure II-9). Non protonée, cette fonction est fortement électro-donneuse grâce au doublet non liant de l'azote mais l'ammonium est, quant à lui, relativement électro-attracteur du fait de sa charge positive. Il y a alors une perte du caractère dipolaire de la molécule qui se traduit par un décalage vers le bleu de l'émission (de 580 à 390 nm) et une diminution du rendement quantique de fluorescence (quasiment divisé par 3, de 0,56 à 0,21). Ce dérivé de fluorène passe très facilement la membrane cellulaire et présente des propriétés d'optique non-linéaire grâce à une conjugaison très étendue : cette molécule a une absorption à deux photons non négligeable (100 GM à 800 nm). Malheureusement, le pKa d'un dérivé d'aniline est souvent plus faible que l'équivalent phénol (pKa = 4,2 pour une aniline simple) et les sondes basées sur un tel principe ne permettent souvent que de détecter des variations de pH acide qu'on peut retrouver dans certains lysosomes mais pas dans le cytoplasme d'une cellule.

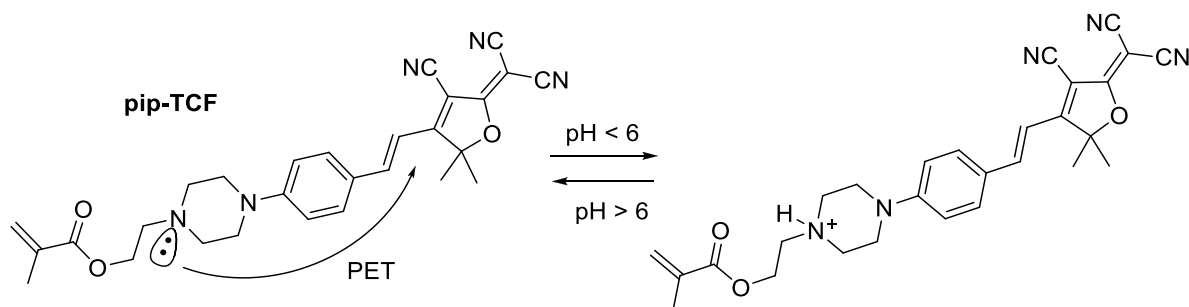


Figure II-12. Seule sonde sensible au pH possédant un motif TCF. Cette sonde est non fluorescente à pH élevé grâce à un effet PET et le devient lorsque l'azote est protoné.

C'est dans la catégorie amine qu'apparaît la seule sonde pH porteuse d'un groupement **TCF** : **pip-TCF**. Synthétisée par Jin *et al.*^[63], sa structure est présentée Figure II-12. Le groupement donneur correspond à une aniline porteuse d'un motif pipérazine qui est sensible au pH. A pH neutre et basique (pH > 6), la molécule présente une absorption très large. Lorsque on diminue le pH, la pipérazine se protone et l'absorption est décalée vers le bleu (528 nm, voir Figure II-13). Plus intéressant encore, la fluorescence est extrêmement faible à pH basique mais est multipliée par huit lorsqu'on baisse le pH avec un maximum d'émission à 617 nm (voir Figure II-13) proche de celui de **NH₂-TCF**

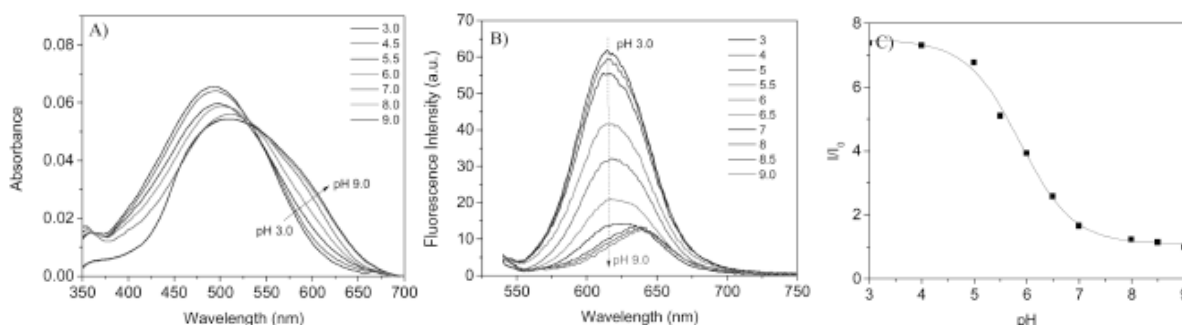


Figure II-13. Spectres d'absorption (gauche) et d'émission (centre, excitation 528 nm) de pip-TCF à différents pH. Droite : Evolution du rapport I/I_0 en fonction du pH. I : intensité à 617 nm I_0 : intensité à 617 nm à pH 9. Tiré de ^[63]

A pH élevé, l'extinction de fluorescence est due à un transfert photo-induit d'électron (photo-induced electron transfer, PET). Lorsque l'azote du groupe pipérazine n'est pas protoné, la molécule peut se désexciter par deux phénomènes : l'un radiatif, la fluorescence, et l'autre non radiatif le transfert d'électron. Ce dernier correspond au transfert d'un des deux électrons du doublet de l'azote non conjugué avec le fluorophore vers la HOMO de celui-ci (voir Figure II-14). Ceci aboutit à un état à charges séparées avec chaque fragment sous forme de radical. La recombinaison de ces charges conduit ensuite à l'état fondamental par un chemin de désexcitation non radiatif. Ces deux phénomènes sont en compétition et celle-ci se fait en défaveur de la fluorescence entraînant une diminution de l'intensité. Au contraire, lorsque la pipérazine est protonée, le niveau d'énergie du

Chapitre II : De l'optimisation du pKa à la synthèse de sondes sensible au pH

doublet a changé (car il permet la liaison avec l'hydrogène) et le transfert n'a pas lieu (les niveaux énergétiques ont été inversés, voir Figure II-14) conduisant à un rétablissement de la fluorescence et une augmentation de l'intensité mesurée.

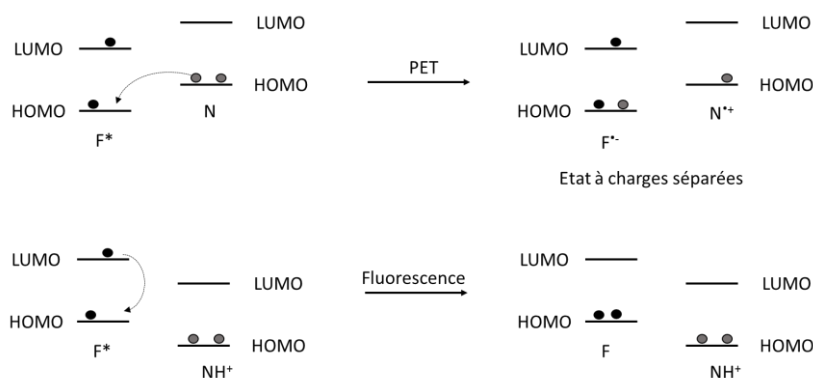


Figure II-14. Mécanisme de désexcitation par PET (en haut, pour l'amine) et par fluorescence (en bas, pour l'ammonium).

Cette sonde a été utilisée pour suivre les infections de macrophages par des bactéries. Son pKa, mesuré autour de 5,85, entraîne une fluorescence dans les compartiments acides de ces dernières (lysosomes). Ce n'est absolument pas une preuve de la compartimentalisation de la sonde dans ces organelles. En effet, même si la sonde est distribuée dans tout le volume des bactéries, elle n'exhibe de la fluorescence qu'en milieu acide donc que dans ces compartiments.

Malheureusement, les exemples basés sur des amines présentent souvent un pKa trop bas pour être pleinement exploité pour des mesures de pH du cytoplasme. Au contraire, comme on a pu le voir avec les exemples expliqués plus haut, les sondes basées sur des phénols exhibent des caractéristiques plus adaptées aux conditions physiologiques. Nous avons donc décidé d'adopter une nouvelle approche en utilisant une architecture dipolaire avec un phénol comme groupe donneur et un groupement **TCF** comme accepteur.

II.2 Qui a dit qu'une sonde pH devrait être compliquée à synthétiser ?

Les sondes présentées précédemment nécessitent souvent de nombreuses étapes de synthèse, en particulier lorsqu'elles sont basées sur un cœur fluorescéine ou un cœur SNARF avec des étapes de cyclisation catalysées au zinc qui ont un rendement peu élevé (par exemple 8 % dans le cas de la synthèse de **BCECF**) conduisant à un rendement global relativement faible. Le choix d'utiliser un

groupement **TCF** est, de ce point de vue, très intéressant. En effet, par un choix de rétro-synthèse judicieux, il est possible d'obtenir des fluorophores sensibles au pH en une à deux étapes avec donc des rendements de synthèse plus élevés.

2.A. Une synthèse générale optimisée

Les fluorophores présentés dans ce chapitre possèdent tous une architecture semblable dont la synthèse est relativement courte. La structure est celle d'une molécule dipolaire avec le motif **TCF** comme accepteur, conjugué via un pont vinylique à un cycle phénol ou naphthol (voir Figure II-15). Avec une telle architecture commune, la stratégie de rétro-synthèse est donc la même pour toutes les sondes ciblées. Celle-ci implique, comme étape clé, l'utilisation d'une condensation de Knoevenagel entre un aldéhyde et le groupement **TCF**.

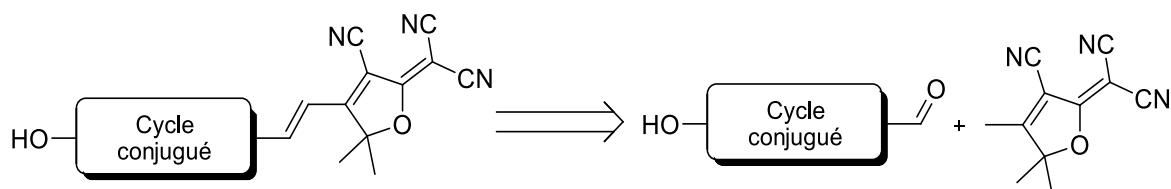


Figure II-15. Architecture des sondes synthétisées avec un **TCF** conjugué à un cycle aromatique porteur d'une fonction phénol. La rétrosynthèse envisagée fait intervenir le benzaldéhyde correspondant et une condensation de Knoevenagel.

La synthèse de ce dernier a été réalisée dans les conditions décrites par Mingqian *et al.*^[2] et est présentée Figure II-16. Deux équivalents de malononitrile sont ajoutés à la 3-hydroxy-3-méthylbutan-2-one (**II-1**) dans un ballon surmonté d'un soxhlet. Les deux réactifs sont dissous dans l'éthanol anhydre et une pointe de spatule de Lithium est ajoutée. Le tout est porté à reflux pendant la nuit. Cette réaction a été optimisée pour permettre les rendements maximum et une facilité de récupération du produit. En effet, la partie supérieure du Soxhlet est remplie de tamis moléculaire qui capte l'eau formée pendant la condensation du premier malononitrile sur la cétone. Ceci permet de déplacer l'équilibre de la réaction. De plus, le produit est très peu soluble dans l'éthanol, il précipite donc au fur et à mesure de sa formation dans le ballon. Une simple filtration après retour à température ambiante permet de le récupérer. Enfin, le lithium permet de se placer en milieu basique nécessaire pour déprotoner le malononitrile. Cependant, lorsque le milieu est trop basique (trop de lithium), le malononitrile a tendance à dimériser. Il faut donc en ajouter le minimum possible.

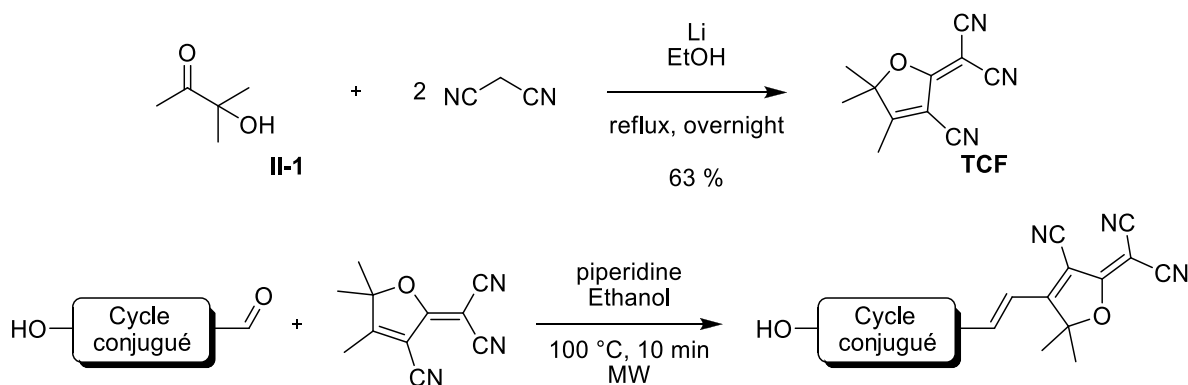


Figure II-16. Synthèse optimisée des différentes sondes pH en deux étapes : cyclisation du TCF puis condensation de Knoevenagel.

L'étape finale de la synthèse des chromophores est la même pour toutes les molécules présentées dans cette thèse. Il s'agit d'une condensation de Knoevenagel entre un aldéhyde aromatique et le dérivé TCF. Les méthodes habituelles se placent toutes en condition basique (piperidine^[30], pyridine^[12], triéthylamine^[64] et originellement hydroxyde de sodium^[1]) dans l'éthanol à reflux. Cependant, elles comportent un temps de réaction très long que nous avons voulu raccourcir.

C'est pourquoi nous nous sommes inspirés de la synthèse proposée par Liu *et al.*^[65] qui utilise une irradiation micro-onde. L'utilisation de micro-ondes permet un chauffage plus uniforme et mieux contrôlé ce qui diminue la formation de produits secondaires. De plus, il est possible de chauffer à une température plus élevée car on se place sous atmosphère scellée. Par exemple, les différentes réactions de condensation ont été réalisées à 100 °C dans l'éthanol alors que sa température de reflux à pression atmosphérique est de 79 °C. Tous ces éléments ont permis de réaliser des synthèses sur une durée de chauffage de 10 à 15 minutes seulement. L'aldéhyde et un très léger excès de TCF sont suspendus dans l'éthanol anhydre puis on ajoute deux à trois gouttes de piperidine comme base catalytique. Tous les produits sont dissous lors du chauffage à 100 °C et le mélange est laissé sous micro-ondes une dizaine de minutes à cette température. L'autre très grand avantage de cette voie de synthèse est la précipitation des produits dans le milieu réactionnel lorsque ce dernier refroidit. Une filtration suivie d'un lavage avec de l'éthanol froid permet d'obtenir le produit suffisamment propre sans qu'aucune purification supplémentaire ne soit nécessaire.

2.B. Une famille nombreuse et variée

Grâce à cette stratégie, la partie la plus difficile reste alors le choix et l'obtention des aldéhydes. Pour la synthèse de sondes sensibles au pH, nous nous sommes intéressés aux benzaldéhydes porteurs de fonction phénol. Pour présenter une fluorescence non négligeable, il faut que les motifs donneurs

II.2 : Qui a dit qu'une sonde pH devrait être compliquée à synthétiser ?

(-OH) et accepteurs (**TCF**) soient conjuguées. Nous avons donc exclu les benzaldéhydes porteurs d'un groupement hydroxyle en méta de l'aldéhyde.

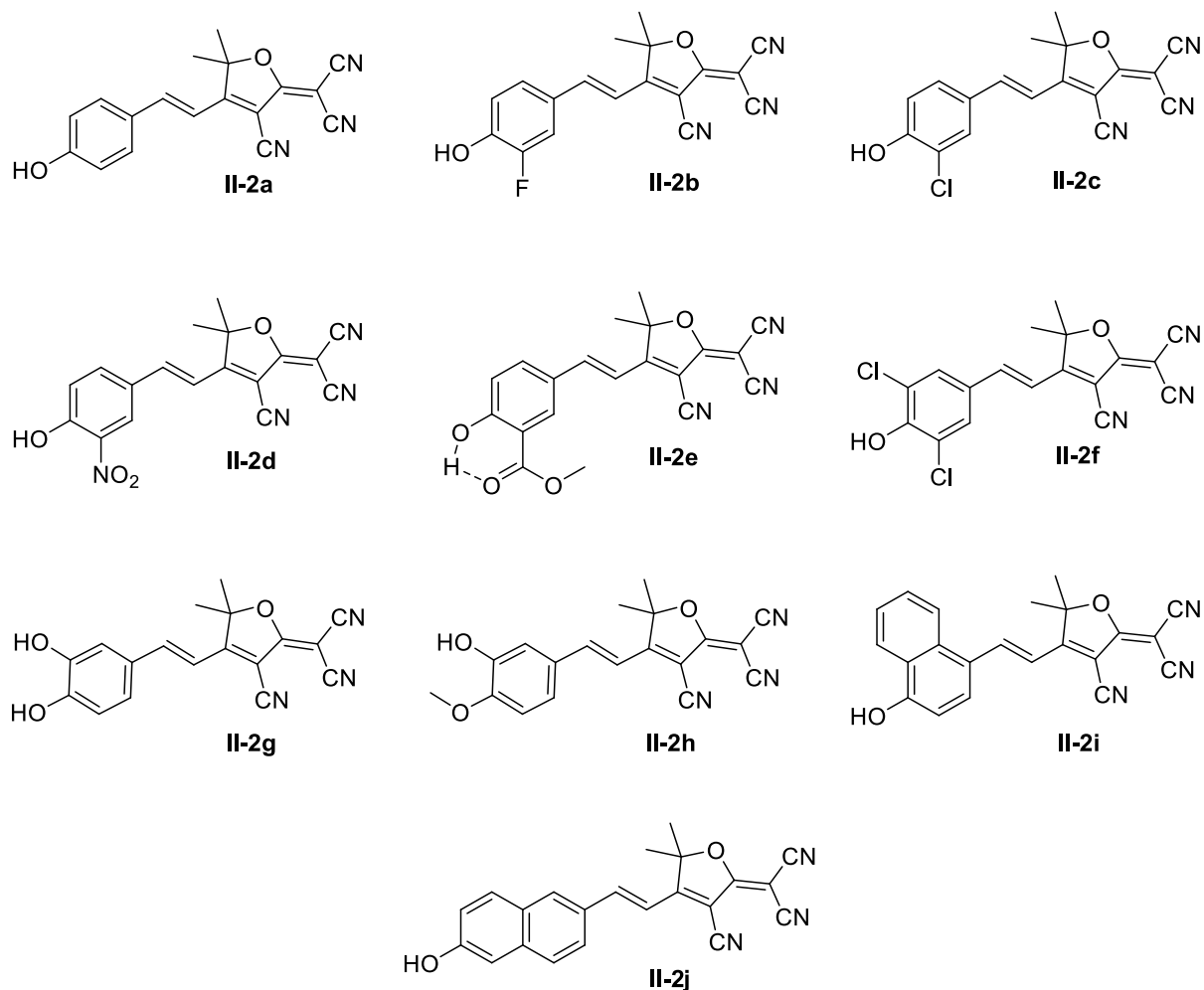


Figure II-17. Les 10 sondes synthétisées pour leur sensibilité au pH et étudiées dans ce chapitre.

Les 4-hydroxybenzaldéhydes (groupement en para de l'aldéhyde) nous ont semblés très intéressants car la densité électronique et donc le pKa de la molécule peut être modifié avec l'ajout de substituants sur le cycle aromatique. Les différentes sondes pH synthétisées à partir de l'aldéhyde correspondant sont présentées Figure II-17. A partir du plus simple d'entre eux, le (*E*)-2-(3-cyano-4-(4-hydroxystyryl)-5,5-diméthylfuran-2(5H)-ylidène)malononitrile (appelé **pH-TCF** pour plus de simplicité, **II-2a**) qui ne porte que des hydrogènes sur les autres positions, nous avons évalué l'influence de groupements positionnés en position 3 et 5 (méta) par rapport à l'aldéhyde. Parmi la liste figurent trois composés porteurs de groupes halogénés : avec un atome de fluor, 3-F-pH-TCF (**II-2b**), de chlore, 3-Cl-pH-TCF (**II-2c**) et même deux atomes de chlore 3,5-diCl-pH-TCF (**II-2f**). Nous avons aussi étudié l'influence de groupements attracteurs comme le groupement nitro (3-NO₂-pH-TCF, **II-2d**) ou un groupement ester (3-CO₂Me-pH-TCF, **II-2e**) et de groupements oxygénés comme un second groupe

hydroxyle (3-OH-pH-TCF, **II-2g**, avec un noyau cathécol) ou méthoxy dérivé de la vanilline (3-OMe-pH-TCF, **II-2h**). Enfin, pour essayer de décaler un peu plus vers le rouge les caractéristiques spectroscopiques, nous avons voulu étudier l'effet d'un allongement de la conjugaison avec l'introduction de groupement naphthalène : le premier avec le naphthyle substitué en position 2 et 6 (6-HO-Naphth-TCF, **II-2j**) et l'autre avec le naphthyle substitué perpendiculairement en position 1 et 4 (4-HO-Naphth-TCF, **II-2i**).

Ces différents composés ont été synthétisés en une étape à partir des aldéhydes commerciaux avec des rendements corrects (39 % à 87 %) largement supérieurs à ceux de nombreuses sondes fluorescentes. L'utilisation de micro-ondes au laboratoire étant effectuée dans des enceintes pouvant contenir au maximum 20 mL de solvant, la quantité maximale obtenue est de l'ordre du gramme mais celle-ci peut sûrement être augmentée avec l'utilisation de plus grands appareils.

II.3 Quand les couleurs changent avec le pH

Toutes les propriétés spectroscopiques de ces chromophores ont ensuite été étudiées en conditions aqueuses tamponnées au pH désiré par 100 mM d'HEPES. En milieu basique, le phénolate déprotoné porteur d'une charge négative est parfaitement soluble. Par contre, en milieu acide, le phénol est seulement partiellement soluble et précipite à des concentrations autour de 100 mM. Nous avons donc décidé d'effectuer les mesures dans un mélange DMSO/Tampon HEPES avec un rapport 1/5.

3.A. Du jaune, du violet sur demande

Comme expliqué dans l'introduction, le phénol ou le phénolate ne possèdent pas du tout les mêmes propriétés de conjugaison et présentent des propriétés optiques différentes. Ces caractéristiques sont présentées dans le tableau Tableau II-2.

3.A.i 2 formes suivant le pH

En milieu acide, seul le phénol est présent et les molécules présentent une bande d'absorption dans le visible avec un maximum dans le violet ou le bleu. Cette bande large est caractéristique de transfert de charge avec un maximum allant de 414 nm pour **II-2d** à 512 nm pour **II-2i** (voir Tableau II-2 et Figure II-20). L'influence des substituants est déjà remarquable lorsqu'on compare avec une substitution par des hydrogènes (**II-2a**, 448 nm) : un groupement électro-attracteur introduit un déplacement hypsochrome jusqu'à 34 nm pour un groupement nitro. Les absorptions s'échelonnent

ensuite de 423 nm (**3,5-diCl-pHTCF**), à 428 nm pour un groupement ester (**II-2e**), et à 436 et 438 nm pour un halogène (respectivement chlore puis fluor).

	Substituant	σ_p^a	Forme neutre ^b		Forme basique ^c	
			λ (nm)	ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	λ (nm)	ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)
II-2a	H	0	448	48 500	588	181 000
II-2b	F	0,06	436	39 400	586	238 000
II-2c	Cl	0,23	438	44 000	584	234 000
II-2d	NO ₂	0,78	414	60 000	537	203 000
II-2e	COOMe	0,45	428	43 200	570	201 000
II-2f	Cl, Cl	0,46	423	31 600	574	254 000
II-2g	OH	-0,37	465	56 600	605	165 000
II-2h	OMe	-0,27	462	60 800	610	134 000
II-2i	-	-	512	52 300	632	101 000
I-2j	-	-	465	51 500	582	-

Tableau II-2. Propriétés spectroscopiques en absorption (maximum en nm et coefficients d'absorption). des différents fluorophores en milieu acide et milieu basique. ^a paramètre de Hammett σ_p des substituants correspondant aux effets inductifs et mésomères, valeur tirée de [66]. ^b mesuré à pH 3 dans un tampon HEPES (10 μ M). ^c mesuré à pH 10 dans un tampon HEPES (10 μ M).

Dans le même temps, lors de l'ajout d'un groupement considéré comme mésomère donneur, le fluorophore absorbe avec un décalage d'une quinzaine de nanomètres vers le rouge (462 nm pour un hydroxyle et 465 nm pour un méthoxy). Enfin, comme attendu, l'introduction de groupement naphthyle permet un décalage bathochrome marqué : 465 nm pour **II-2j** et surtout 512 nm soit 64 nm pour **II-2i**. Pour les sondes pH dotées d'un cœur phénol, le maximum d'absorption dépend en réalité directement de la densité électronique sur le cycle comme le montre la corrélation Figure II-18 qui met en évidence le lien entre ce maximum et le paramètre de Hammett σ_p du substituant (qui prend en compte les effets inductifs et mésomères et dont les valeurs sont tirées de [66]).

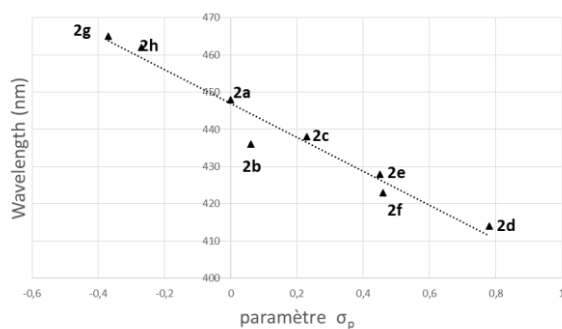


Figure II-18. Corrélation entre le maximum d'absorption et la densité électronique apportée par le substituant (σ_p).



Figure II-19. Photographie de la sonde **II-2a** (10 μM) en milieu acide (tampon HEPES, pH 3 jaune) et milieu basique (tampon HEPES, pH 10 violet).

Lors d'une augmentation du pH, il est possible d'observer un changement radical dans l'absorption comme le montre **II-2a** dans la Figure II-19. Le fluorophore en milieu acide présente une couleur jaune tandis qu'il est violet en milieu basique. Toutes les sondes présentent un comportement similaire en milieu basique avec une fine absorption décalée vers le rouge. Les absorptions sont maintenant comprises entre 537 nm, toujours pour le composé porteur d'un groupement nitro (**II-2d**), jusqu'à 632 nm pour **II-2i**. Une nouvelle fois, les groupements électro-attracteurs introduisent un décalage vers le bleu par rapport au simple phénolate **II-2a** (588 nm) mais à l'exception du nitro-phénolate, il est beaucoup moins marqué (entre 570 nm pour **II-2e** et 586 nm pour **II-2b**) qu'en milieu acide. Les groupements oxygénés, quant à eux, introduisent un décalage bathochrome (605 et 610 nm pour respectivement **II-2g** et **II-2h**). Enfin, parmi les deux composés avec un cœur naphthyle, seule une substitution perpendiculaire à l'axe du naphthyle (**II-2i**) permet un décalage vers le rouge avec une absorption centrée sur 632 nm. L'effet des substituants sur l'absorption est somme toute moins important sur les formes phénoxydes que sur les formes neutres.

Les coefficients d'absorption de la forme déprotonée sont bien plus importants que ceux de la forme neutre (voir Tableau II-2) avec des valeurs pouvant atteindre $255\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour le composé dichloré (**II-2f**). D'autres molécules atteignent des valeurs très élevées au-dessus de $200\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$: de peu pour les composés avec un groupement électro-attracteurs **II-2d** ($203\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) et **II-2e** ($201\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) ou plus largement pour les composés halogénés **II-2b** ($238\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) et **II-2c** ($234\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Les composés oxygénés ont une absorbance relativement importante mais plus faible à $134\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (**II-2h**) et $165\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (**II-2g**). Enfin les composés avec un groupement naphthyle ont une absorption plus faible autour de $100\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. En milieu acide, toutes les formes neutres ont une absorption plus faible : entre $31\,600\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (pour **II-2f**), $39\,400\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (**II-2b**) et jusqu'à $60\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour **II-2h** et **II-2d** avec de nombreuses molécules autour de $50\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (**II-2a**, **II-2g**, **II-2i**, **II-2j**).

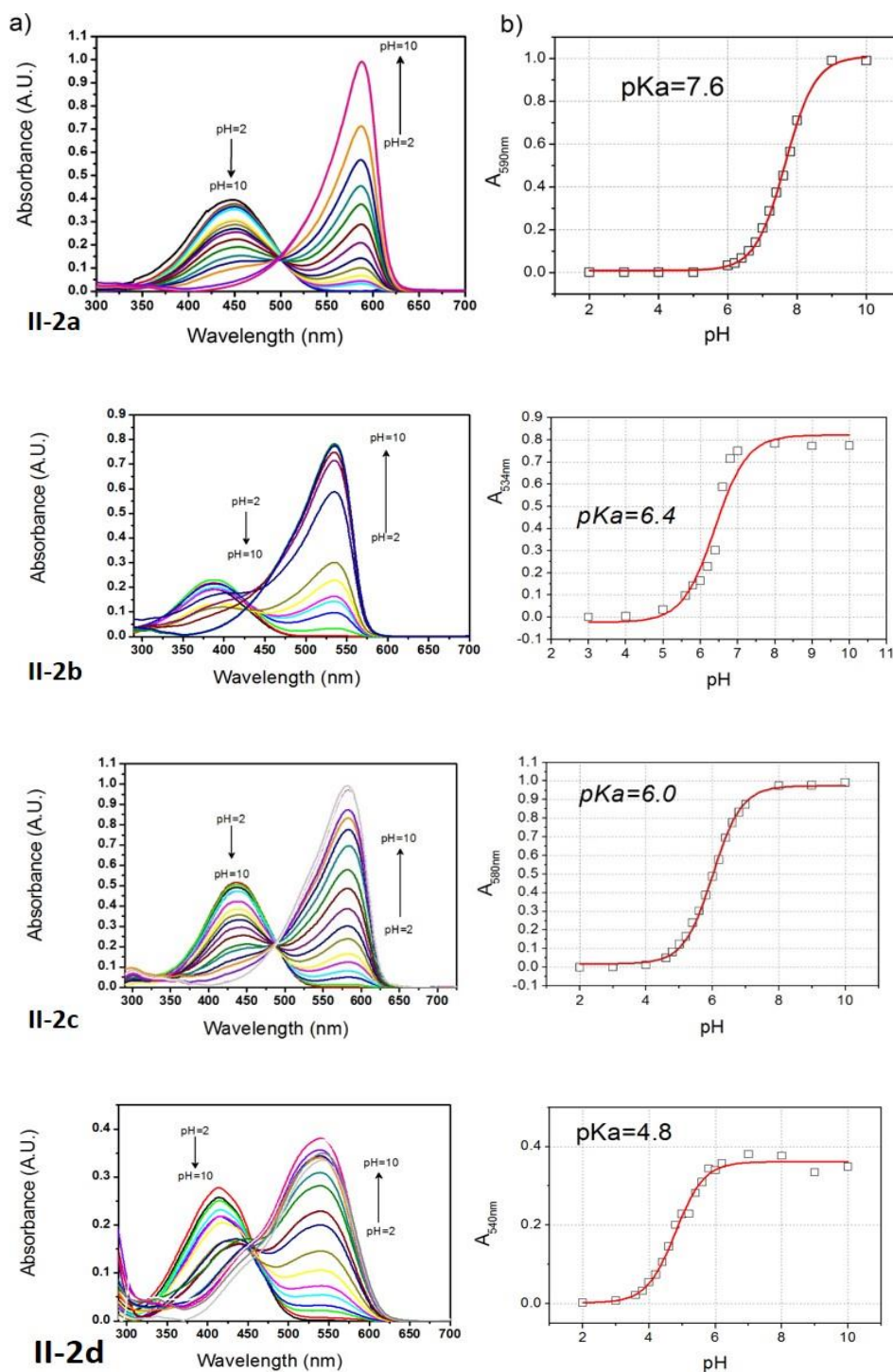


Figure II-20. Gauche : Spectres d'absorption des chromophores II-2a-d à différents pH (de pH = 2 à pH = 10). Droite : Absorbance en fonction du pH à la longueur d'onde d'absorption maximum de la forme basique (carré) et modélisation par l'équation (II-1) (ligne rouge).

Chapitre II : De l'optimisation du pKa à la synthèse de sondes sensible au pH

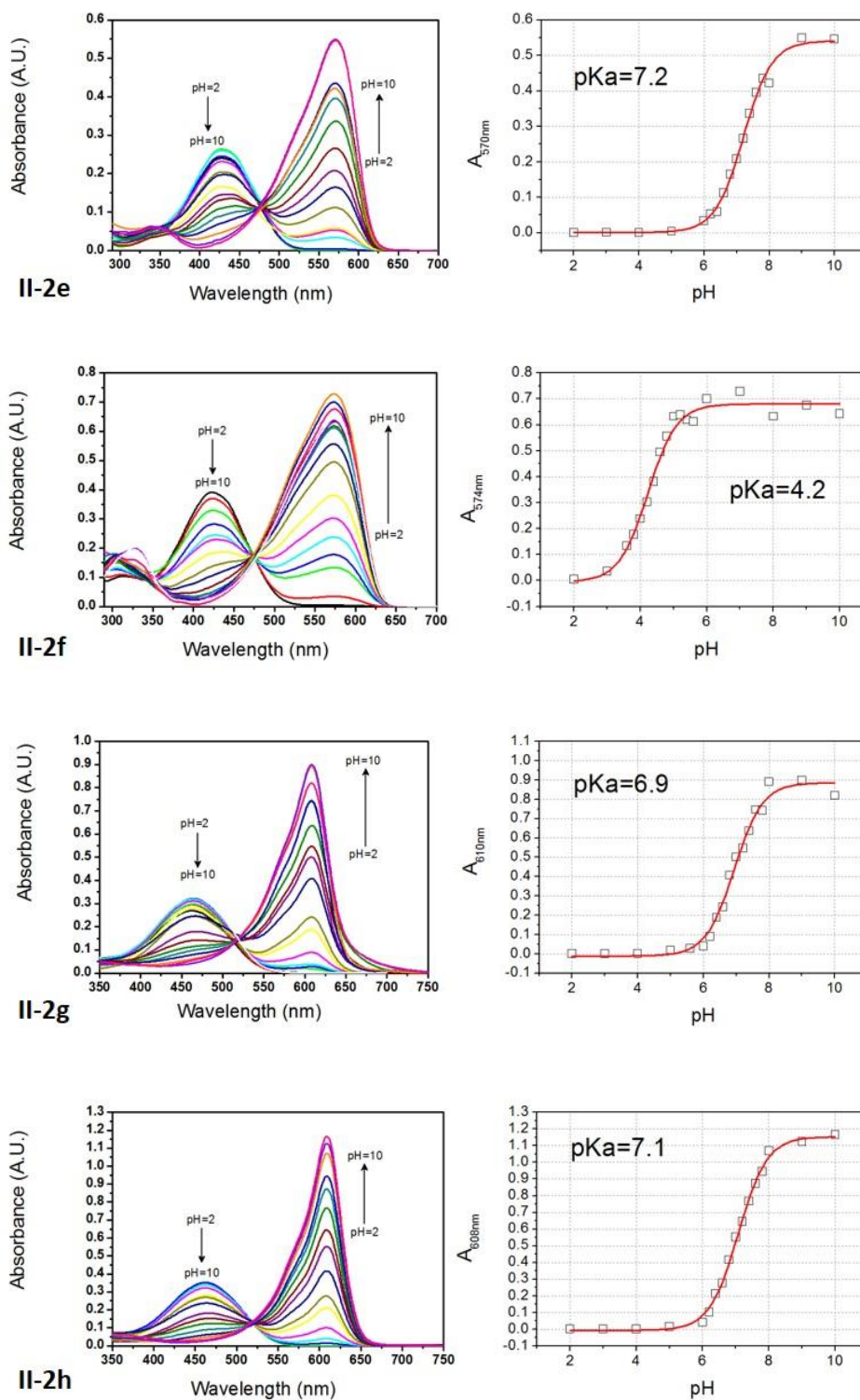


Figure II-21. Gauche : Spectres d'absorption des chromophores II-2d-h à différents pH (de pH = 2 à pH = 10). Droite : Absorbance en fonction du pH à la longueur d'onde d'absorption maximum de la forme basique (carré) et modélisation par l'équation (II-1) (ligne rouge).

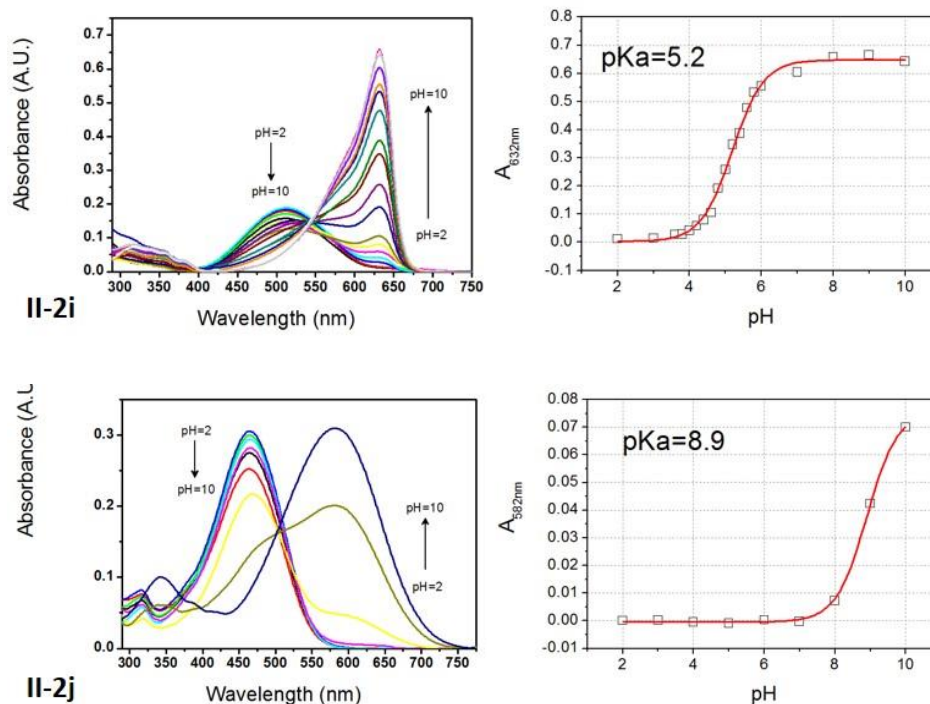


Figure II-22. Gauche : Spectres d'absorption des chromophores II-2i-j à différents pH (de pH = 2 à pH = 10). Droite : Absorbance en fonction du pH à la longueur d'onde d'absorption maximum de la forme basique (carré) et modélisation par l'équation (II-1) (ligne rouge).

3.A.ii Une évolution continue qui donne accès au pKa

Lorsque le pH varie d'un extrême à l'autre, les deux bandes s'interconvertissent avec un point isobestique qui correspond à la longueur d'onde où le phénol et le phénolate ont la même absorbance. La bande centrée autour de 450 nm disparaît lorsqu'on augmente le pH tandis que la seconde apparaît. Le phénomène inverse est observé lors d'un abaissement de pH. La présence du point isobestique prouve la conversion entre les deux formes sans espèce intermédiaire. L'évolution de l'absorption en fonction du pH est aussi très intéressante puisqu'elle permet de calculer le pKa grâce à l'équation de Henderson-Hasselbach (II-1) qui lie le pH, le pKa et l'absorption à une longueur d'onde d'une molécule :

$$pH = pKa + \log \frac{A - A_{acide}}{A_{base} - A} \quad (II-1)$$

Il est alors possible de remonter à la valeur du pKa (donnée dans le Tableau II-3) par régression non linéaire des moindres carrés (voir Figure II-20). Comme attendu, la présence du groupement **TCF** conjugué au phénol permet d'abaisser le pKa de 9,95 à 7,6 (pour **II-2a**) grâce à la stabilisation de la charge négative par le groupement attracteur. La grande variabilité des substituants proposés permet aussi de couvrir une très large gamme de pH avec des pKa variant de 4,2 pour **II-2f** à 8,9 pour **II-2j**. Comme attendu, la présence d'un groupement électro-attracteur introduit une réduction supplémentaire du pKa. Par exemple, **II-2d**, substitué par un groupement nitro est à peu près 1000 fois

Chapitre II : De l'optimisation du pKa à la synthèse de sondes sensible au pH

plus acide ($pK_a = 4,8$). La présence d'un halogène permet, elle aussi, d'abaisser le pK_a de la sonde : 6,4 avec le fluor (pour **II-2b**) et 6,0 en présence d'un chlore (**II-2c**). On peut d'ailleurs noter le caractère additif de cet effet car l'ajout d'un second chlore (**II-2f**) permet d'obtenir un pK_a extrêmement bas : 4,2.

De façon plus surprenante, en présence de groupement oxygénés électro-donneurs, le pK_a est aussi abaissé : respectivement 6,9 pour l'hydroxyle libre (**II-2g**) et 7,1 avec un méthoxy (**II-2h**). En réalité, plus que le caractère électro-donneur ou électro-attracteur, il semble que ce soit l'effet inductif donneur ou attracteur qui prime sur l'effet mésomère. On retrouve cette caractéristique en traçant la corrélation du pK_a des composés phényles (i.e. **II-2a-h**, Figure II-23) en fonction du paramètre de Hammett σ_m caractéristique de l'effet inductif du substituant^[66]. Les différents composés présentent un pK_a décroissant avec l'augmentation de ce paramètre. La déviation observée pour le composé porteur d'un ester (**II-2e**) avec un pK_a autour de 7,2 au lieu de 6,0 comme attendu peut être expliquée par la formation d'une liaison hydrogène entre le phénol et la liaison C=O de l'ester pour former un cycle à six qui stabilise le phénol et augmente le pK_a (voir Figure II-17, page 43).

Le même raisonnement sur les deux derniers composés n'est pas possible car les paramètres de Hammett ne sont tabulés que pour des cycles benzéniques. Cependant, il faut noter que le composé **II-2i** (avec le naphthyle perpendiculaire) a un pK_a relativement bas (5,2) contrairement à l'autre naphthyle **II-2j** dont le pK_a (8,9) est le plus élevé de la série. Ce dernier a un pK_a extrêmement proche de celui d'un simple phénol non substitué.

	substituant	σ_m^a	pK_a^b	pK_a^{*c}
II-2a	H	0	7,6	0,5
II-2b	F	0,34	6,4	-1,3
II-2c	Cl	0,37	6,0	-1,8
II-2d	NO ₂	0,71	4,8	-3,3
II-2e	COOMe	0,37	7,2	-0,8
II-2f	Cl, Cl	0,74	4,2	/
II-2g	OH	0,12	6,9	0,2
II-2h	OMe	0,12	7,1	0,3
II-2i	/	/	5,2	0,9
II-2j	/	/	8,9	/

Tableau II-3. Paramètre de Hammett et pK_a à l'état fondamental et à l'état excité. ^a Valeur de l'effet inductif tiré de Hansch et al.^[66], ^b calculé à partir de (II-1) par régression non linéaire des moindres carrés des valeurs expérimentales d'absorption et d'émission. ^c valeur calculée à partir de l'équation (II-2) et des données expérimentales.

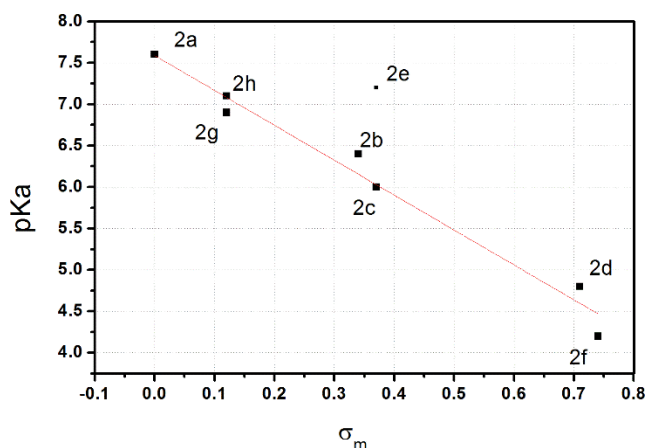


Figure II-23. pKa en fonction du paramètre σ_m pour les composés phényl (II-2a-h) montrant une bonne corrélation entre le pKa et l'effet inductif du substituant. La ligne rouge montre la régression linéaire ($r = 0,971$).

3.A.iii Des sondes totalement réversibles

Pour pouvoir utiliser ces sondes en milieu biologique, il convient de vérifier qu'elles sont totalement réversibles, i.e. qu'elles ne vont pas rester bloquées dans un état qu'il soit protoné ou non et qu'elles ne peuvent pas atteindre de troisième état. Par exemple, lors d'une déprotonation, la charge se délocalise et la double liaison entre le cycle aromatique et le TCF perd sa stéréochimie E. Il est donc nécessaire de vérifier que le retour en milieu acide permet bien de retrouver cette stéréochimie sans avoir de formation de la double liaison Z.

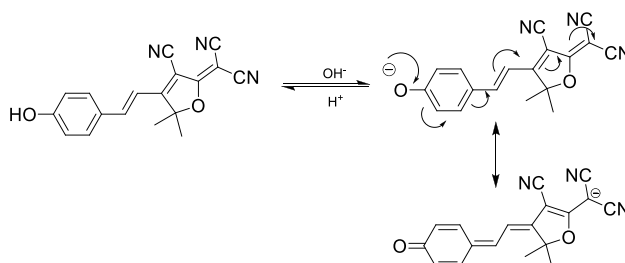


Figure II-24. Réversibilité de la sonde II-2a. la délocalisation de la charge en milieu basique permet de modifier radicalement les propriétés spectroscopiques de la molécule.

Cette vérification s'est faite sur II-2a à l'aide de deux mesures, l'une en RMN et l'autre par mesure des spectres d'absorption. Dans la première expérience (Figure II-25), on ajoute une base (ici Et_3N) à la solution de II-2a dans le DMSO. Le spectre RMN marque bien la disparition du proton du phénol (au-delà de 10) ainsi qu'un blindage général des protons aromatiques. Après ajout d'acide trifluoroacétique, on retrouve le spectre initial avec la même constante de couplage ($J = 16,4 \text{ Hz}$) entre les protons vinyliques, signe d'une double liaison E.

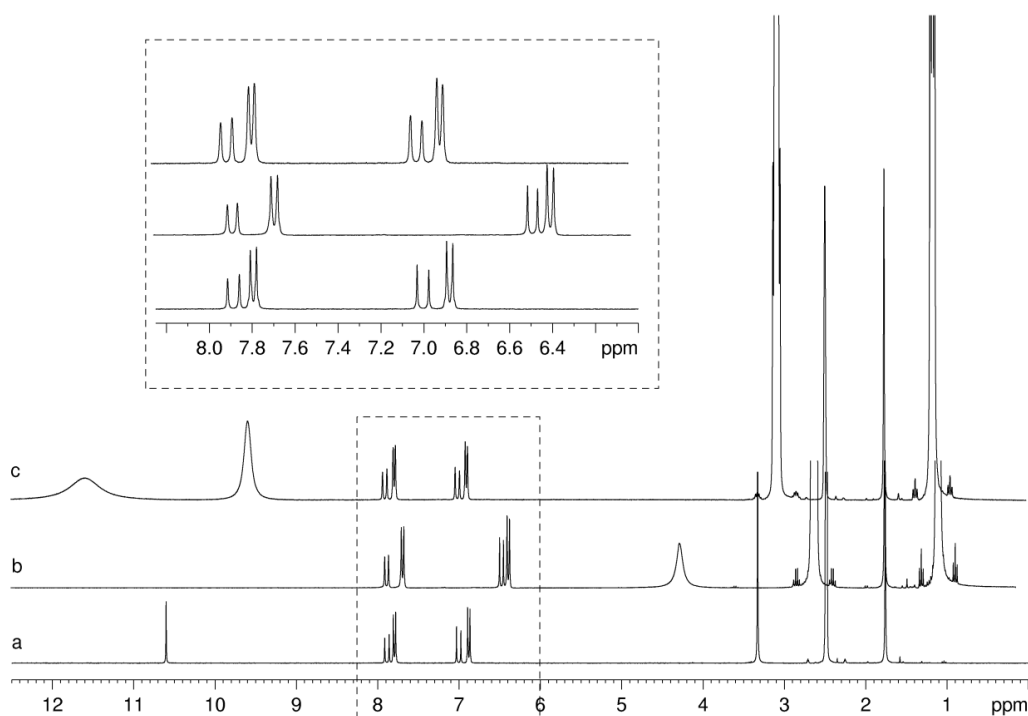


Figure II-25. Spectre RMN de **II-2a** montrant la réversibilité de l'échange de proton : (a) dans le DMSO- d_6 , (b) après addition de Et_3N , (c) après addition de Et_3N puis CF_3COOH . Agrandissement de la région des aromatiques dans l'encart.

Dans la seconde expérience, le spectre d'absorption de la molécule est enregistré lors d'une dizaine de cycle où on fait varier le pH entre pH 4 et pH 10. Comme on peut le voir sur la Figure II-26, les différents spectres ne montrent aucune dégradation au fur et à mesure des cycles avec une parfaite réversibilité des bandes d'absorption.

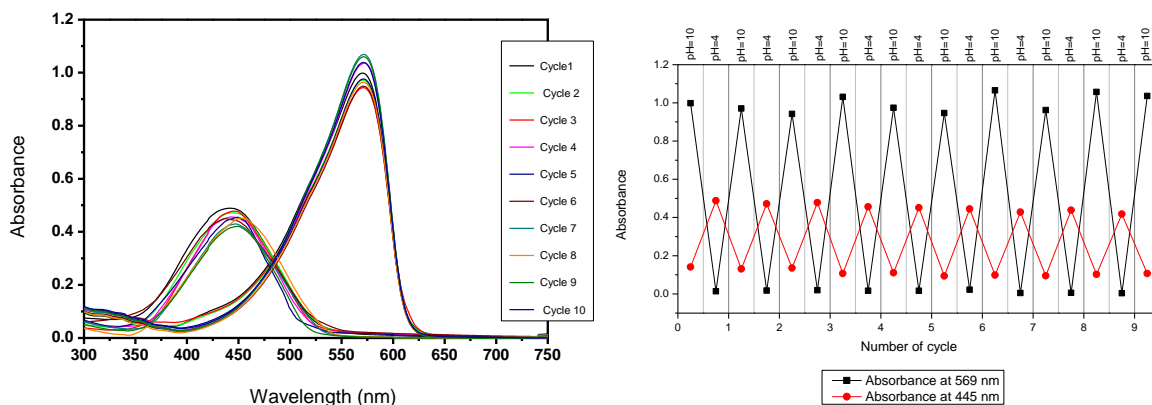


Figure II-26. Gauche : Evolution du spectre d'absorption de **II-2a** dans l'eau lors d'une variation de pH de 10 à 4 puis lors du retour à pH 10 (10 cycles). Droite : Evolution de l'absorbance à 569 nm (phénolate) et 445 nm (phénol) lors des cycles de variation de pH.

3.B. Les sondes sont fluorescentes

Les changements de couleurs et d'absorbances peuvent bien sûr être utilisés pour mesurer des variations de pH et ils l'ont été pendant des années, mais les échantillons ne sont habituellement pas transparents aux longueurs d'onde utilisées et peuvent fausser la mesure. Il est alors bien plus pratique et plus précis d'utiliser la fluorescence comme marqueur.

3.B.i La fluorescence est, elle aussi, bipolaire

Comme en absorption, les deux formes possèdent une fluorescence très différente (voir Tableau II-4). Le phénol présente une large bande d'émission avec un large déplacement de Stokes. Les maxima d'émission s'échelonnent de 542 nm (**II-2d**) à 648 nm (**II-2j**) pour les phénols avec une nouvelle fois un décalage hypsochrome pour les groupements électro-attracteurs, de 23 nm pour le nitro et 13 nm pour l'ester (550 nm pour **II-2e**) par rapport à l'émission du phénol simple (563 nm pour **II-2a**). La présence d'un seul atome halogène n'a que peu d'influence sur la longueur d'émission (entre 560 nm et 565 nm) contrairement aux groupements oxygénés qui induisent un décalage bathochrome d'une trentaine de nanomètres : 595 nm pour **II-2g** et 598 nm pour **II-2h**.

	Forme neutre ^a				Forme phénoxyde ^b			
	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\lambda^c$ (nm)	Φ^d ($\epsilon \cdot \Phi$)	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\lambda^c$ (nm)	Φ^e ($\epsilon \cdot \Phi$)
II-2a	448	563	115	1,1 % (530)	588	614	26	0,2 % (360)
II-2b	436	565	129	1,7 % (670)	586	618	32	0,4 % (950)
II-2c	438	560	122	1,5 % (660)	584	619	35	0,7 % (1640)
II-2d	414	542	128	1,5 % (900)	537	614	77	5,3 % (10760)
II-2e	428	550	122	0,5 % (215)	570	611	41	1,2 % (2410)
II-2f	423	-- ^f	-- ^f	-- ^f	574	626	52	1,2 % (3050)
II-2g	465	595	130	1 % (570)	605	650	45	< 0,5 % (< 825)
II-2h	462	598	136	5 % (3040)	610	644	34	< 0,5 % (< 500)
II-2i	512	634	122	3,5 % (1830)	632	655	23	0,3 % (300)
II-2j	465	648	183	10 % (5100)	582	-		

Tableau II-4. Propriétés de fluorescence en milieu acide et basique des sondes **II-2a-j**. λ_{exc} est placé à la longueur d'onde du point isobestique en absorption. ^a mesuré dans un tampon HEPES/DMSO à pH 3 ^b mesuré dans un tampon HEPES/DMSO à pH 10 ^c différence entre les maximum en absorption et en émission ^d mesuré dans le DMSO avec la Coumarine 153 dans le méthanol ($\Phi=0,45$) comme référence. ^e mesuré dans le DMSO avec le crésyl violet dans le méthanol ($\Phi=0,54$) comme référence. ^f en milieu acide, la fluorescence enregistrée correspond à celle du phénolate uniquement.

Chapitre II : De l'optimisation du pKa à la synthèse de sondes sensible au pH

Pour se décaler encore plus vers le rouge, il est nécessaire, comme attendu, d'augmenter la conjugaison avec deux cycles aromatiques au lieu d'un seul qui permet d'obtenir un décalage bathochrome important avec une émission à 634 nm pour **II-2i** et 648 nm pour **II-2j**.

De plus, tous les phénols possèdent un très grand décalage de Stokes, autour de 4500 cm^{-1} (soit environ 130 nm en longueur d'onde), qui permet de séparer très facilement la lumière excitatrice de la fluorescence émise. Malheureusement, les rendements quantiques de fluorescence mesurés dans le DMSO sont relativement faibles, autour de 1 à 2 % seulement sauf lors d'une substitution avec un méthoxy (5 % pour **II-2h**). Ce dernier exemple montre qu'une fonctionnalisation d'un des groupements hydroxyles présente plusieurs avantages : une augmentation du rendement quantique ainsi que l'introduction d'une nouvelle fonctionnalité sur la sonde qui sera utilisée plus tard dans le chapitre. Enfin, les deux sondes avec un cœur naphthyle ont aussi un meilleur rendement quantique avec un maximum très intéressant à 10 % pour **II-2j** grâce à une rigidité accrue.

La fluorescence de la forme phénolate est plus fine et décalée vers le rouge. Pour le simple phénol **II-2a**, l'émission est centrée autour de 615 nm. Ce maximum ne varie quasiment pas en présence d'atome d'halogène ou de groupements électro-attracteur. Seule l'introduction de groupement électro-donneur oxygéné semble décaler l'émission vers de plus grandes longueurs d'ondes avec des émissions jusqu'à 644 nm pour **II-2h** et 650 nm pour **II-2g**. En comparaison avec la forme phénol, le déplacement de Stokes est bien plus faible, seulement un millier de cm^{-1} (30 à 40 nm en longueur d'onde).

Les rendements quantiques, eux aussi sont plus faibles que sous la forme acide. Ils sont autour de 1 % avec l'exception notable de **II-2d** qui présente une fluorescence plus élevée en milieu basique (5 %). Cependant, ces faibles rendements quantiques sont compensés par de très grands coefficients d'extinction molaire au-delà de $200\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. C'est pourquoi la brillance totale est supérieure à 1000 pour plusieurs composés (**II-2b-f** et jusqu'à 10 000 pour **II-2d**) et est suffisante pour permettre une utilisation comme sonde pH dans des cellules.

3.B.ii La forme de l'émission dépend du pH

Pour l'étude de la fluorescence en fonction du pH, les sondes sont excitées à la longueur d'onde du point isobestique, longueur d'onde pour laquelle les deux formes absorbent autant. Cette méthode permet de déterminer le pH en comparant l'intensité émise par la forme acide et la forme basique car celle-ci est proportionnelle à la quantité de chacune des deux formes. Cette technique, appelée « ratiométrique en émission », permet de s'affranchir de variations d'intensité dues à des variations de concentration ou de photo blanchiment. Le ratio R mesuré est ainsi défini comme le

rapport entre l'intensité de la fluorescence émise par la forme acide (F_{acide}) et l'intensité de la forme basique (F_{basique}). Les spectres de fluorescence à différents pH ainsi que l'évolution de ce ratio $R = F_{\text{acide}}/F_{\text{basique}}$ en fonction du pH sont présentés Figure II-27 à 29.

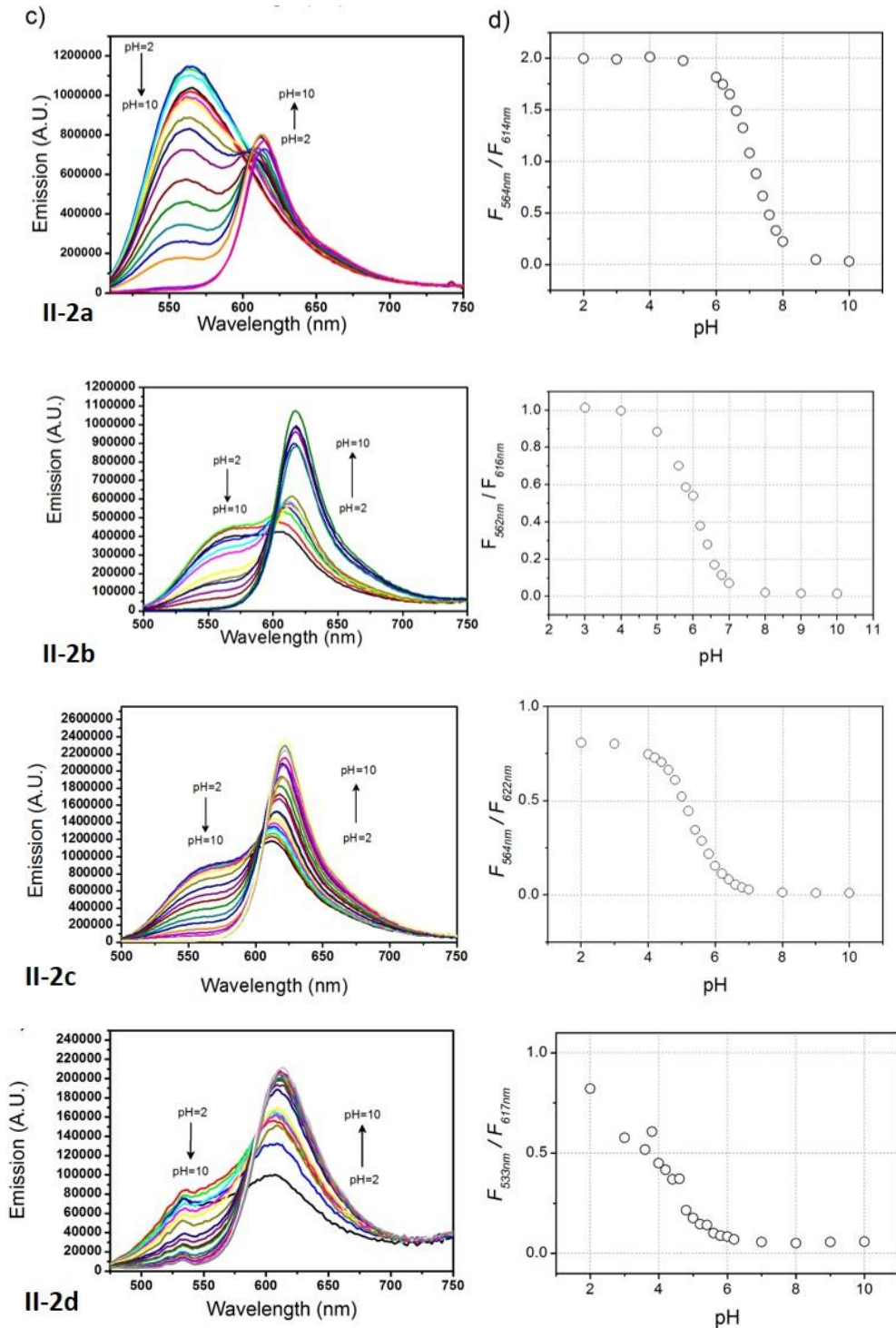


Figure II-27. Gauche : Spectres d'émission de II-2a-2d à différents pH dans un tampon HEPES, l'excitation est fixée au point isobestique. Droite : Changement dans le ratio de l'intensité mesurée ($R = F_{\text{acide}}/F_{\text{basique}}$) sur la gamme de pH 2 à 10.

Chapitre II : De l'optimisation du pKa à la synthèse de sondes sensible au pH

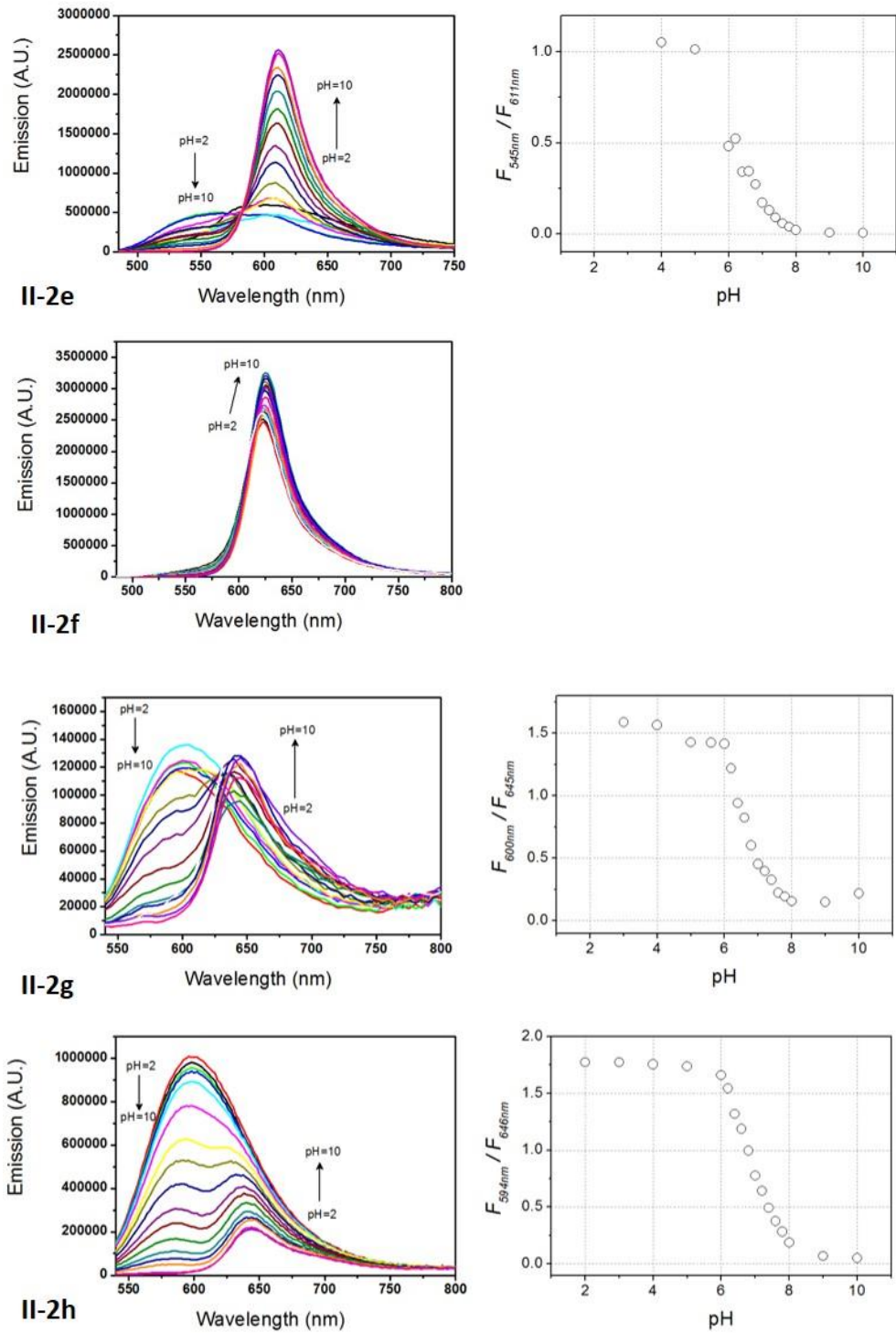


Figure II-28. Gauche : Spectres d'émission de II-2e-2h à différents pH dans un tampon HEPES, l'excitation est fixée au point isobestique. Droite : Changement dans le ratio de l'intensité mesurée ($R = F_{\text{acide}}/F_{\text{basique}}$) sur la gamme de pH 2 à 10.

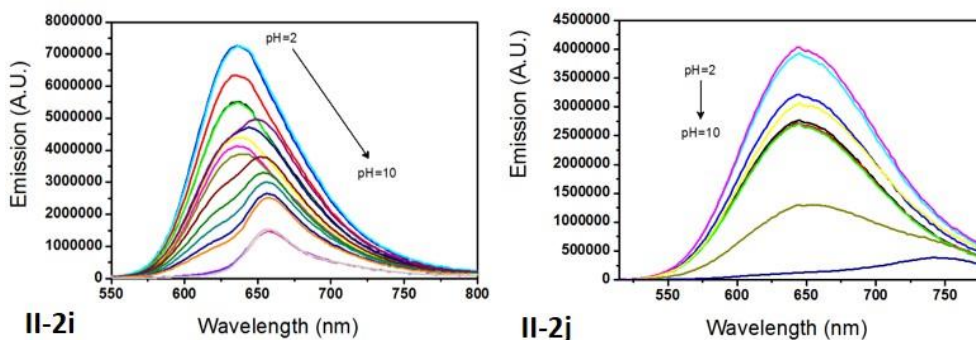


Figure II-29. Gauche : Spectres d'émission de **II-2i** et **II-2j** à différents pH dans un tampon HEPES, l'excitation est fixée au point isobestique. Il n'a malheureusement pas été possible de déterminer un ratio R pour ces deux composés.

Des différences significatives ont été observées suivant la nature des substituants. En effet, à pH acide, les quatre composés présentant les pK_a les plus élevés (**II-2a**, **II-2g**, **II-2h** et **II-2j**) ainsi que **II-2i** présentent une seule bande d'émission lorsqu'ils sont excités à la longueur d'onde du point isobestique (voir Figure II-28 pour **II-2g-j**). Cette émission peut être attribuée à celle du phénol. Cependant, pour les cinq autres (**II-2b-e**, voir Figure II-27), l'excitation du phénol à pH acide se traduit par une émission constituée de deux bandes, l'une caractéristique du phénol et l'autre du phénoxyde et ce, même si seul le phénol est présent en solution. Enfin, l'ajout d'un second chlore sur le cycle aromatique modifie encore plus drastiquement les propriétés spectroscopiques en milieu acide : l'émission de **II-2f** semble n'être constituée que de l'émission du phénolate avec un pic à 623 nm.

Ces deux phénomènes peuvent être expliqués par la présence d'un pK_a à l'état excité (pK_a^*) comme montré sur la Figure II-30. Le phénol ($Ar-OH$ dans la figure) est excité en $Ar-OH^*$ et cette espèce peut être déprotonée en $Ar-O^-$ qui peut alors se désexciter en émettant la fluorescence caractéristique du phénoxyde. Cet équilibre acido-basique à l'état excité est en général plus favorable à la forme basique avec une valeur du pK_a^* plus faible que le pK_a à l'état fondamental. Sa valeur peut être estimée en utilisant l'équation du cycle de Förster^[67] (II-2) :

$$pK_a - pK_a^* = \frac{hc}{2(2,303 kT)} (\bar{\nu}_{Abs}^{ArOH} - \bar{\nu}_{Abs}^{ArO^-} + \bar{\nu}_{em}^{ArOH} - \bar{\nu}_{em}^{ArO^-}) \quad (II-2)$$

où $\bar{\nu}$ représente les énergies des transitions électroniques pour les espèce $Ar-OH$ et $Ar-O^-$ obtenues à partir des maximum d'absorption et d'émission à pH acide et basique.

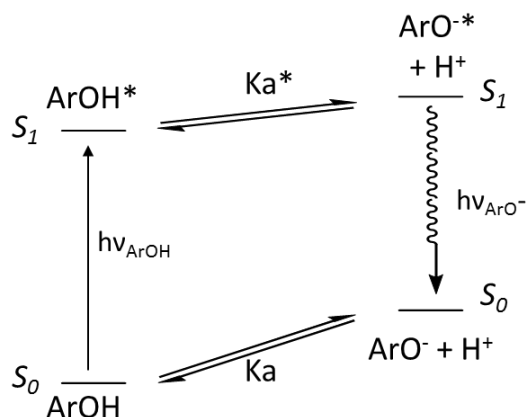


Figure II-30. Les deux équilibres acido-basiques cohabitent, l'un à l'état fondamental (pK_a) et l'autre à l'état excité (pK_a^*).

Les estimations des pK_a^* sont données dans le Tableau II-3 page 50 et montrent une claire différence entre les photoacides forts ($pK_a^* < 0$ pour II-2b-e) avec un pK_a^* pouvant atteindre -3,3 pour II-2d et les photoacides plus faibles avec des pK_a^* supérieurs à 0 pour II-2a, II-2g-i. La sonde II-2f (2 chlores) présente, quant à elle, un pK_a^* que l'on suppose encore plus négatif car même si il n'est pas possible de calculer le pK_a^* , la fluorescence en milieu acide représente la fluorescence du phénolate. Enfin, les estimations du pK_a à l'état fondamental mesuré avec l'évolution de la fluorescence donnent des valeurs extrêmement proches de celles obtenues avec les données d'absorption.

Les différentes sondes expriment une grande variation du ratio R autour de leur pK_a . Ainsi, les sondes II-2a, II-2b, II-2g et II-2h semblent très intéressantes pour mesurer le pH physiologique (voir Figure II-27) avec, par exemple, une augmentation du ratio R de 0,03 en milieu basique à 2 en milieu acide pour II-2a (multiplication par 60). D'autres sondes telles II-2c semblent, elles, adaptées à des compartiments plus acides avec un pK_a de 6,0 et un ratio variant de 0,0078 à 0,78 soit une multiplication par 100.

3.C. Petite parenthèse avec les substitutions ortho

En parallèle de l'étude des composés portant un groupement $-\text{OH}$ en position quatre du cycle aromatique, nous nous sommes intéressés à ceux portant ce groupement en position deux, i.e. avec une substitution ortho. Les molécules étudiées sont présentées dans la Figure II-31. Dans la famille pH-TCF, l'ajout d'un atome de chlore permet d'abaisser le pK_a jusqu'à une valeur de 6,0. Nous avons donc voulu voir si un tel effet est conservé avec un changement de position du groupement hydroxyle. Les trois composés étudiés dans cette partie sont alors o-pH-TCF avec seulement le groupe hydroxyle comme substituant, 3-Cl-o-pH-TCF et 5-Cl-o-pH-TCF suivant la position de l'atome de chlore. La

synthèse est la même que précédemment avec une condensation de Knoevenagel à partir du benzaldéhyde commercial.

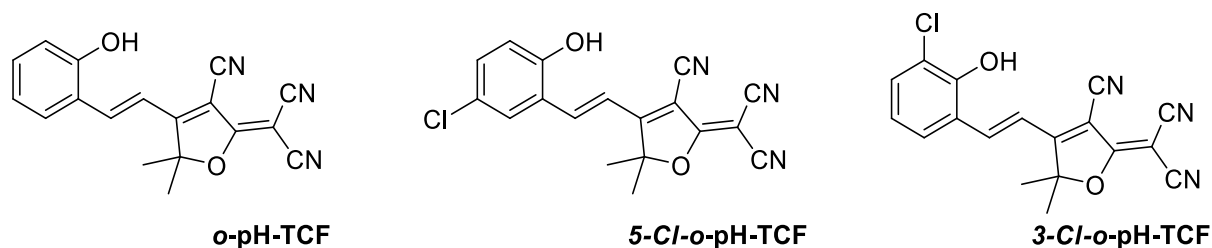


Figure II-31. Les trois nouvelles sondes substituées en position ortho par un groupement hydroxyle. Un atome de chlore a été ajouté à diverses positions pour évaluer son effet sur le pKa et la fluorescence.

3.C.i Une nouvelle espèce spiropyrane

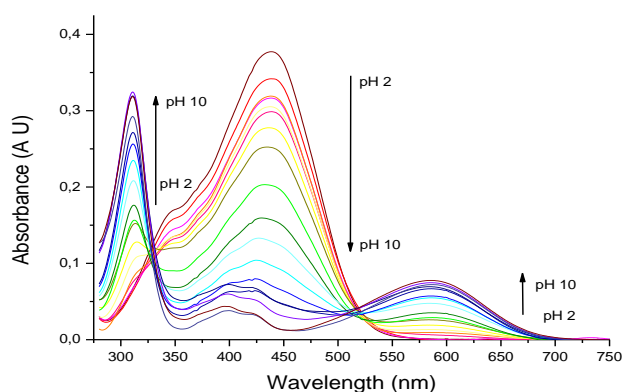


Figure II-32. : Spectres d'absorption de **5-Cl-o-pH-TCF** (10 μ M) à différents pH (de pH = 2 à pH = 10) dans un tampon HEPES/DMSO.

L'étude en absorption pour déterminer le pKa a présenté des résultats surprenants comme le montre la Figure II-32 sur la sonde **5-Cl-o-pH-TCF**. L'absorption en milieu acide est tout ce qu'il y a de plus classique pour cette famille avec une bande d'absorption large et un maximum autour de 430 nm. Cependant, en augmentant le pH, la bande décalée vers le rouge caractéristique de la forme phénolate est très peu intense avec un coefficient d'absorption autour de seulement 5 000 $M^{-1}.cm^{-1}$. De plus, une seconde bande, relativement plus intense, apparaît mais avec un décalage hypochrome et un maximum autour de 314 nm. Alors que le phénol est stable en milieu acide, il semble que le phénolate réagisse en milieu basique pour donner une espèce qui n'absorbe pas dans le visible.

Après quelques recherches bibliographiques, il est apparu que ce type de molécule portant un groupement **TCF** est susceptible de former une cyclisation intramoléculaire pour former un spiropyrane métastable (voir Figure II-33). Deux papiers décrivant des molécules très semblables à

Chapitre II : De l'optimisation du pKa à la synthèse de sondes sensible au pH

celles de notre étude (Peng *et al.*^[68] pour Figure II-33 a et Johns *et al.*^[69] pour Figure II-33 b) ont même été publiés par la suite, renforçant notre hypothèse. Ce sont des composés photochromiques négatifs qui lors d'une irradiation par une lumière visible subissent une cyclisation avec un décalage vers l'UV de l'absorption (ici 314 nm) à cause de la perte de la conjugaison entre les groupements donneurs et accepteurs.

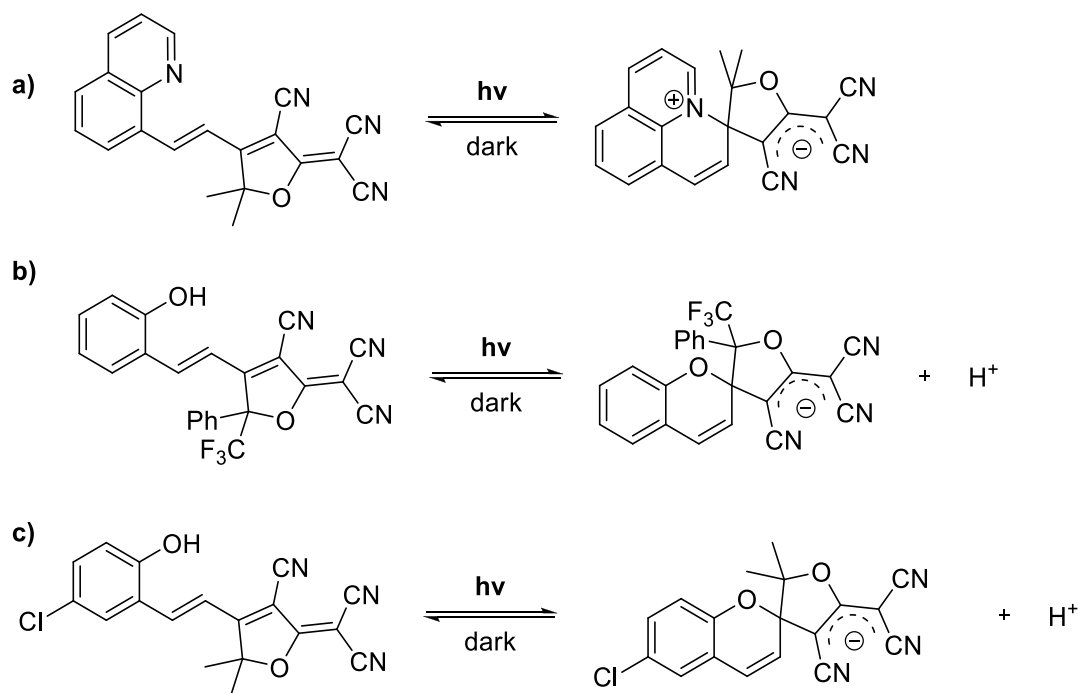


Figure II-33. a) et b) exemple de spiropyrane décrits par Peng *et al.*^[68] (a) et Johns *et al.*^[69] (b). c : Photoréaction de cyclisation du composé **5-Cl-o-pH-TCF** permettant la formation du composé spiropyrane quasiment transparent dans le visible.

Ceci est confirmé par la mesure du spectre RMN du composé **5-Cl-o-pH-TCF** juste après la préparation et après une heure au soleil. Après exposition au soleil, les protons vinyliques sont décalés vers les champs forts (de 8,10 ppm à 6,69 ppm et de 7,47 à 5,76 ppm). Ceci est dû au fait que cette double liaison n'est plus conjugué avec le groupement **TCF** fortement accepteur. De plus, la constante de couplage passe de 16,4 Hz à 10,0 Hz, signe d'une transformation trans-cis de cette liaison. On retrouve le même blindage pour les protons aromatiques dont le déplacement chimique devient inférieur à 7,2 ppm à cause, là aussi, de la rupture de la conjugaison. D'après les intégrations des pics, le ratio est de 75/25 en faveur de la forme ouverte.

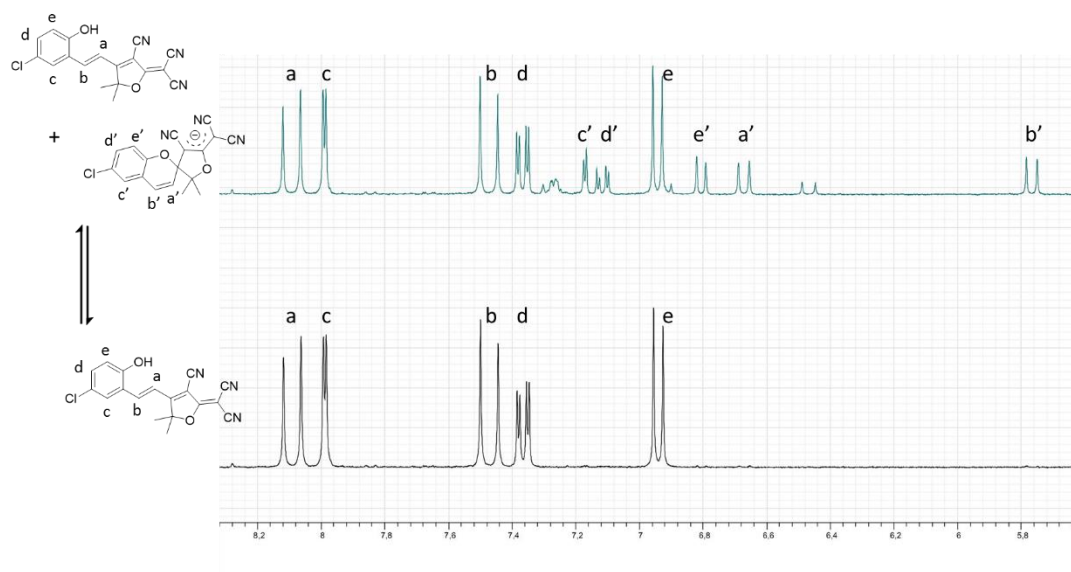


Figure II-34. Spectres RMN de 5-Cl-o-pH-TCF fraîchement préparé (bas) et après 1 heure au soleil (haut). On remarque l'apparition de la forme spiropyrane (25 %) avec un blindage des signaux dû à la rupture de conjugaison avec le groupement TCF attracteur.

3.C.ii Un effet totalement réversible

Comme l'a montrée l'expérience RMN, la forme ouverte n'est pas stable dans le DMSO. Exposée à la lumière, une solution peu concentrée dans le DMSO (20 μM) se cyclise spontanément en trente minutes comme le montre la Figure II-35 (gauche) avec l'apparition d'une bande d'absorption à 310 nm et la quasi-disparition de la bande à 450 nm. Au contraire, lorsque la sonde est conservée dans le noir, la forme la plus stable est la forme ouverte et la bande centrée sur 450 nm réapparaît tandis que la seconde disparaît (Figure II-35, droite). Cependant, l'intensité du pic à 450 nm reste inférieure à l'intensité de départ avec un épaulement toujours présent à 310 nm. Ceci semble montrer que les deux formes sont en équilibre constant.

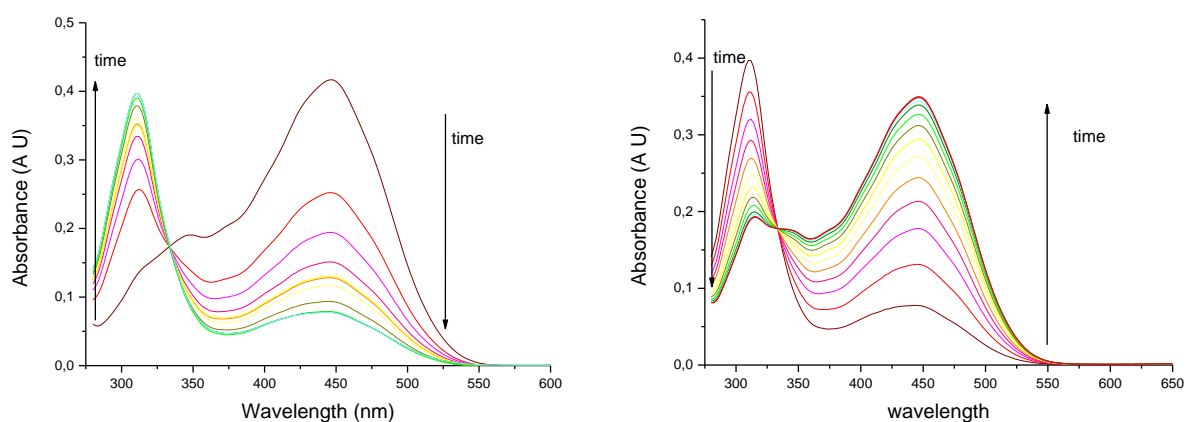


Figure II-35. Evolution de l'absorbance d'une solution de 5-Cl-o-pH-TCF (10 μM dans DMSO) exposée à la lumière (gauche) et dans le noir (droite).

Chapitre II : De l'optimisation du pKa à la synthèse de sondes sensible au pH

La conversion d'une forme vers l'autre peut aussi être accélérée par irradiation. Une solution fraîchement préparée de **5-Cl-o-pH-TCF** et irradiée à 450 nm pendant deux minutes réagit pour donner quasi-exclusivement la forme fermée. Celle-ci, lorsqu'elle est à son tour irradiée à 310 nm pendant deux minutes, est convertie en forme ouverte tout aussi rapidement. Cette conversion est quasiment réversible puisqu'il est possible de répéter ce cycle d'irradiation une dizaine de fois avec une très faible dégradation inférieure à 5 % (voir Figure II-36).

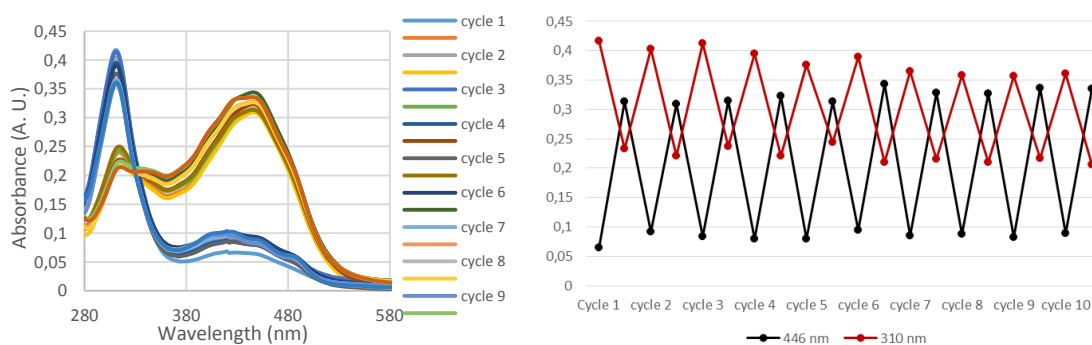


Figure II-36. Gauche : absorbances d'une solution de **5-Cl-o-pH-TCF** ($10 \mu\text{M}$ dans le DMSO) au cours de cycles comportant 2 minutes d'excitation à 450 nm (les courbes bleues sont enregistrées après cette étape) puis 2 minutes à 310 nm (courbes jaunes). Droite : Absorbance à 310 nm et 450 nm au cours de ces cycles.

L'étude de la fluorescence de ses sondes n'a pas été poussée plus loin car, lors de l'excitation de celles-ci, la désexcitation prioritaire est la formation de spiropyrane (comme montré au-dessus avec l'excitation à 450 nm). Ces molécules sont donc non-fluorescentes et ne peuvent servir pour détecter une variation de pH. Cependant, comme l'ont montré Johns *et al*^[69], il est possible de les utiliser comme photo-acides qui vont libérer ou absorber un proton suivant l'excitation reçue. Ils ont ainsi montré qu'il est possible de faire varier d'une unité le pH d'une solution contenant ce type de molécules.

II.4 A la rencontre de la cellule

A la suite de ces résultats prometteurs sur les sondes **pH-TCF** et ses dérivés substitués en para, nous avons décidé de d'utiliser ces sondes pour de l'imagerie *in vitro*, en particulier en mesurant le pH de cellules HeLa. Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Pr Jacques Samarut à l'Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon et en particulier grâce à l'aide du Dr Cyrielle Billon et a fait l'objet d'une publication dans *Organic & Biomolecular Chemistry*.

4.A. Les cellules déroulent le tapis rouge de bienvenue

Pour traverser la membrane cellulaire et mesurer le pH_i , une molécule ne doit pas porter de charges négatives, ce qui explique par exemple pourquoi les groupements acides carboxyliques sont généralement protégés sous forme d'esters. Comme nous notre but n'était pas de vectoriser nos molécules, nous avons décidé, dans un premier temps de réaliser les images *in-vitro* sur les molécules n'étant pas chargées à pH neutre et donc de laisser de côté les sondes possédant un pK_a acide telles que **II-2c** ou **II-2d**. Les tests préliminaires d'entrée dans la cellule ont été réalisés avec les sondes **II-2a**, **II-2b**, **II-2g** et **II-2j**. Si les trois premières sont intéressantes pour la mesure du pH, la dernière a été choisie pour servir de témoin car elle est entièrement sous forme phénol à pH physiologique. et possède le rendement quantique le plus élevé.

L'étude a été réalisée sur une culture de cellules HeLa avec une concentration finale de $1 \mu\text{M}$ de sonde. Après à peine une minute, les images obtenues par microscopie confocale montrent une très forte fluorescence dans le cytoplasme alors que le milieu extra-cellulaire présente un bruit de fond quasiment négligeable (voir Figure II-37 et Figure II-38), sans besoin d'un lavage du milieu de culture. C'est le signe que les molécules entrent extrêmement rapidement dans la cellule.

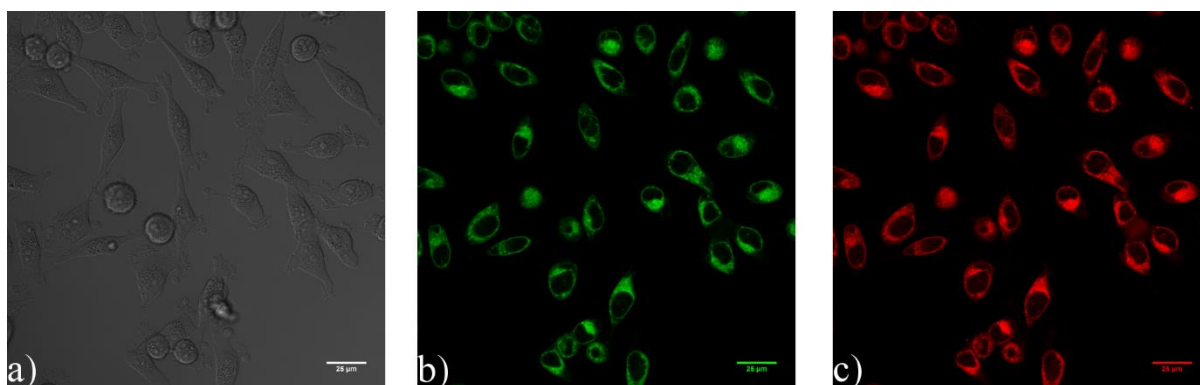


Figure II-37. Images obtenues par microscopie confocale de cellule HeLa incubées à pH 7,4 avec $1 \mu\text{M}$ **II-2a** ($1 \mu\text{M}$) pendant 1 minute à 37°C ($\lambda_{\text{exc}}=488 \text{ nm}$) : a) image par transmission, b) émission dans le canal « vert » (500-550 nm) correspondant à la forme acide, c) émission dans le canal « rouge » (600-650 nm) correspondant à la forme basique. ; échelle : $25 \mu\text{m}$.

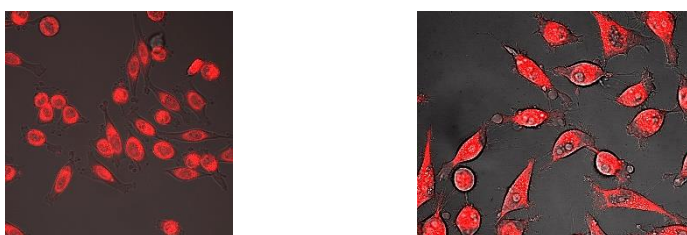


Figure II-38. Images de cellules HeLa obtenues par microscopie confocale après incubation pendant 1 minute à 37°C . Gauche : **II-2b** $1 \mu\text{M}$, droite : **I-2j** $1 \mu\text{M}$

Comme attendu, la sonde **II-2j** est internalisée sous forme phénol : lors d'une excitation au point isobestique, le spectre d'émission récolté présente un maximum à 650 nm correspondant au phénol tandis qu'aucune fluorescence n'est mesurée au-delà de 700 nm, là où est attendue celle du phénolate. De même, lors d'une excitation à 650 nm, longueur d'onde pour laquelle seul le phénoxyde absorbe, il n'est pas possible de récolter de fluorescence.

L'internalisation très rapide de la sonde peut s'expliquer par, d'un côté, la faible taille de la sonde qui lui permet de traverser facilement la membrane cellulaire et d'un autre, par la faible hydrophilicité de la molécule qui permet de retenir celle-ci dans la cellule. En effet, malgré le faible nombre de charges négatives (entre 0 et 1), le signal de fluorescence reste quasi-constant en intensité pendant une heure avec une très faible augmentation du bruit de fond dans le milieu extra-cellulaire, signe d'un très faible relargage. Les diverses sondes semblent se localiser dans le cytoplasme car toute la cellule à l'exception du noyau est fluorescente. Cependant, en l'absence de co-marquage, il n'est pas possible de déterminer une localisation plus précise. Cette localisation ainsi que la toxicité des sondes devra être étudiée en vue de d'applications ultérieures. En effet, on sait que les cellules survivent pendant une heure avec 1 μM voire 10 μM comme lors de nos différentes expériences. Cependant, aucune étude n'a été menée sur des concentrations plus élevées ou un temps plus long. Il est alors possible que ces sondes s'accumulent dans certains compartiments cellulaires, pouvant mener à une mort cellulaire.

4.A. Une très bonne sensibilité autour du pH physiologique

Pour vérifier l'intérêt de ces sondes pour des mesures de pH_i , nous avons utilisé des cellules HeLa cultivées à différents pH (6,8, 7,0, 7,2, 7,4). Cette expérience a été conduite sur les sondes **II-2a** et **II-2g**. Quel que soit le pH, les cellules présentaient la même viabilité après ajout des fluorophores, ce qui tend à démontrer une faible toxicité des sondes. Les molécules sont excitées au point isobestique (488 nm pour **II-2a** et 514 nm pour **II-2g**) et la fluorescence est récupérée suivant deux canaux : le « canal vert » correspond à l'émission de la forme acide (500/550 nm pour **II-2a** et 530/590 nm pour **II-2g**) tandis que le « canal rouge » correspond à l'émission de la forme phénoxyde (respectivement 600/650 nm et 650/710 nm). L'intensité émise à l'intérieur de chaque cellule est alors mesurée sur chaque canal pour permettre une estimation du ratio $F_{\text{acide}}/F_{\text{base}}$. Les images obtenues ainsi que l'intensité mesurée sont présentées Figure II-39 et Figure II-40.

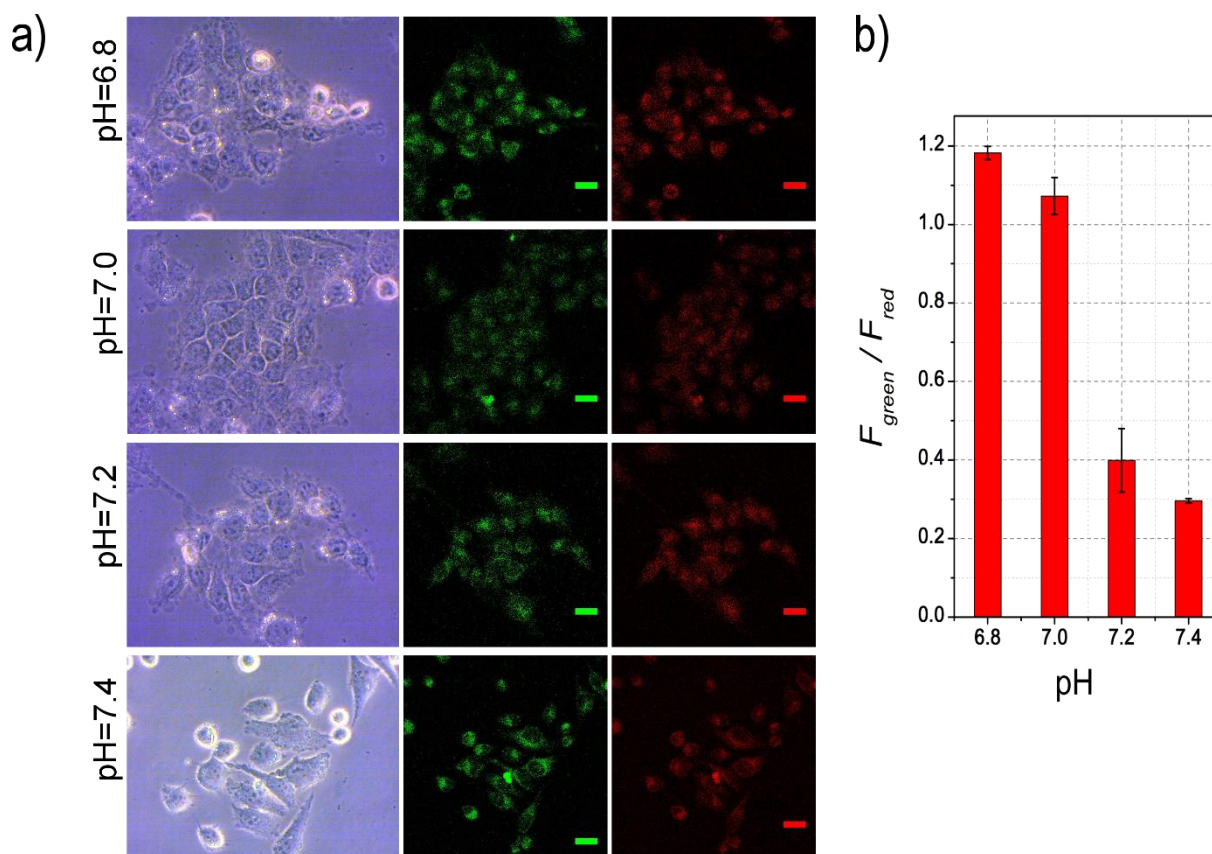


Figure II-39. a) Images de cellules HeLa incubées avec $1 \mu\text{M}$ **II-2a** pendant 5 min à 37°C à différents pH avec une longueur d'onde d'excitation à 488 nm. 1^{ère} colonne : image en transmission, 2^{ème} colonne : canal vert (500/550 nm), 3^{ème} colonne : canal rouge (600/650 nm). Barre d'échelle : $25 \mu\text{M}$. b) Evolution du ratio $R = F_{\text{vert}}/F_{\text{rouge}}$ en fonction du pH. Les carrés noirs représentent l'évolution obtenue lors de la titration.

L'évolution de la fluorescence dans les cellules est relativement similaire à celle observée lors de la titration. Pour **II-2a**, le ratio entre les fluorescences acides et basiques est multiplié par 4 avec une évolution entre 0,3 à pH 7,4 et 1,2 à pH 6,8. La sonde **II-2g**, quant à elle, présente une augmentation plus faible de ce ratio (seulement 2,5 fois) mais suffisante pour des mesures de faibles variations de pH.

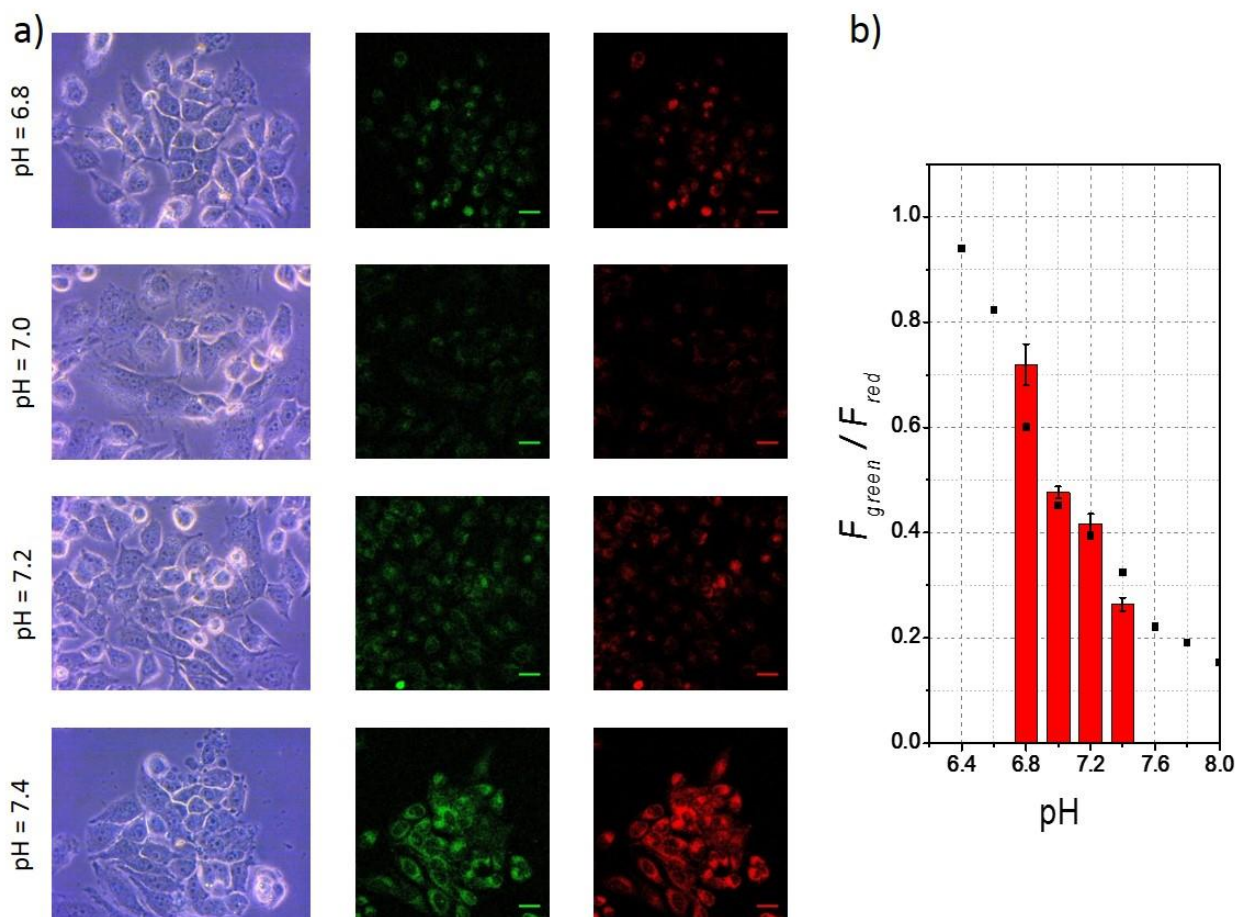


Figure II-40. a) Images de cellules HeLa incubées avec 1 μM II-2g pendant 5 minutes à 37 °C à différents pH avec une longueur d'onde d'excitation à 488 nm. 1^{ère} colonne : image en transmission, 2^{ème} colonne : canal vert (530/590 nm), 3^{ème} colonne : canal rouge (650/710 nm). Barre d'échelle : 25 μM . b) Evolution du ratio $R = F_{\text{vert}}/F_{\text{rouge}}$ en fonction du pH. Les carrés noirs représentent l'évolution obtenue lors de la titration.

II.5 Un exemple de fonctionnalisation : la localisation intracellulaire

Pour développer l'utilisation de ce type de sondes, nous avons tenté de fonctionnaliser les sondes en ciblant certains organites particuliers. En effet, le pH_i n'est pas constant au sein de la cellule : pour que tous les processus biologiques puissent avoir lieu, certaines enzymes sont à l'intérieur de compartiments dont le pH est différent de celui du cytoplasme. Un des exemples les plus connus est celui des lysosomes chargés de la digestion intracellulaire. Ceux-ci présentent un pH compris entre 3,5 et 5 indispensable au fonctionnement des enzymes qui se trouvent à l'intérieur. Parmi les exemples de ces nombreux organites, un, en particulier, a retenu notre attention. Il s'agit des mitochondries dont le pH est légèrement alcalin, autour de 7,8^[70]. Cette mesure a été principalement réalisée avec des dérivés de protéine GFP mutées^[71] dont la fluorescence est sensible aux variations de

concentration en protons. Cependant, ces mutants se sont aussi révélés sensibles aux différents oxydants présents dans les mitochondries, entraînant une incertitude sur la valeur des mesures de pH effectuées^[72].

Demaurex *et al.*^[71] ont défini les propriétés nécessaires à une sonde pour une mesure précise du pH des mitochondries : (a) cibler les mitochondries, (b) avoir une réponse rapide et réversible aux variations de pH, (c) avoir un pKa alcalin supérieur à 7,0 pour correspondre au pH mitochondrial et (d) présenter une très haute spécificité au pH pour discriminer entre des variations de pH et d'autres variations comme la force ionique, ou les conditions rédox. La famille **pH-TCF** nous paraissait intéressante de ce point de vue, car elle présente une réponse rapide et réversible au pH et il est possible de faire varier le pKa pour qu'il s'adapte à la gamme voulue. Ceci permet de réaliser deux des conditions nécessaires. La partie suivante permet de montrer comment nous avons essayé de remplir les conditions restantes.

5.A. Adaptation aux mitochondries

Les mitochondries sont habituellement ciblées à l'aide de cations lipophiles. La méthode la plus utilisée est celle développée par Murphy *et al.*^[73] et qui consiste à greffer un groupement triphénylphosphonium sur la sonde par une chaîne alkyle non conjuguée^[74-76]. La présence de la charge positive stabilisée permet, dans un premier temps, un passage rapide à travers la membrane cellulaire puis une internalisation dans la mitochondrie du fait du potentiel de membrane de cette dernière qui nécessite des charges positives pour s'équilibrer (et ne peut le faire avec des protons car on est en milieu basique à l'intérieur).

5.A.i Synthèse d'une nouvelle cible

Les sondes **II-2g** et **II-2h** se révèlent extrêmement intéressantes pour cet objectif. En effet, la présence d'un second groupement hydroxyle permet une fonctionnalisation à l'aide d'un bras espaceur. De plus, l'alkylation de l'oxygène (**II-2h**) induit une hausse de pKa qui, même si elle est relativement faible (seulement 0,2 unité de pH) permet de se rapprocher d'un pKa approprié pour le pH alcalin des mitochondries.

Chapitre II : De l'optimisation du pKa à la synthèse de sondes sensible au pH

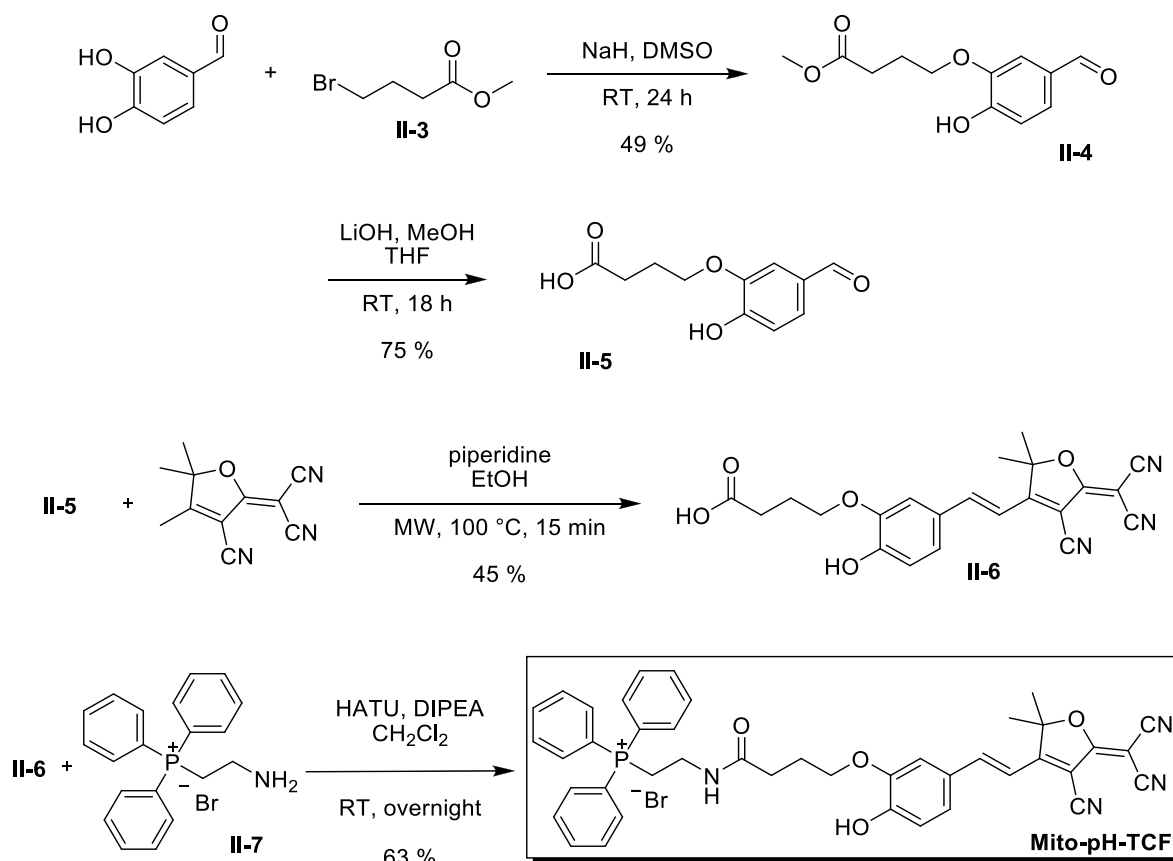


Figure II-41. Synthèse de la cible Mito-pH-TCF en 4 étapes avec ajout du groupement triphénylphosphonium à la dernière étape par un couplage peptidique.

La synthèse de la cible finale **Mito-pH-TCF** est présentée Figure II-41. Cette synthèse a été optimisée pour introduire le groupement triphénylphosphonium à la dernière étape afin d'éviter des problèmes de solubilité en milieu organique à cause des charges électrostatiques. Ce groupement, greffé sur une amine (**II-7**), est ainsi introduit par couplage peptidique sur un acide carboxylique libre. La stratégie de synthèse est donc d'introduire cet acide sur une sonde dérivée de **II-2g**.

La première étape est la fonctionnalisation d'un seul des deux groupements hydroxyyles du 3,4-dihydroxybenzaldehyde par un équivalent de méthyl-4-bromobutanoate (**II-3**). La régiochimie de cette substitution peut être contrôlée grâce à la déprotonation totale des deux fonctions –OH par un excès d'hydrure de sodium. Le phénolate positionné en 3 n'est pas conjugué et est moins stabilisé que celui en position 4, il réagit donc plus rapidement sur le carbone électrophile de **II-3**. Les expériences RMN 2D (HSQC et HMBC) ont montré que le produit obtenu en majorité est bien le composé **II-4**. Le faible rendement s'explique par la dialkylation des deux sites. L'ester est ensuite saponifié en présence de LiOH pour obtenir l'acide carboxylique libre (**II-5**).

II.5 : Un exemple de fonctionnalisation : la localisation intracellulaire

On effectue alors la condensation de Knoevenagel habituelle avec le **TCF** pour donner un solide violet (**II-6**). Le groupement triphénylphosphonium est alors introduit par l'intermédiaire d'un couplage peptidique en présence d'agent de couplage (HATU) et de l'amine **II-7** porteuse du groupement triphénylphosphonium, préalablement synthétisée (Figure II-42) par une simple alkylation entre la triphénylphosphine et un équivalent de bromoéthylamine^[74]. Cette dernière étape permet l'obtention du composé final en seulement quatre étapes. Malheureusement, chacune d'entre elles possède un rendement peu élevé ce qui conduit à un rendement total particulièrement faible, de seulement 10 %.

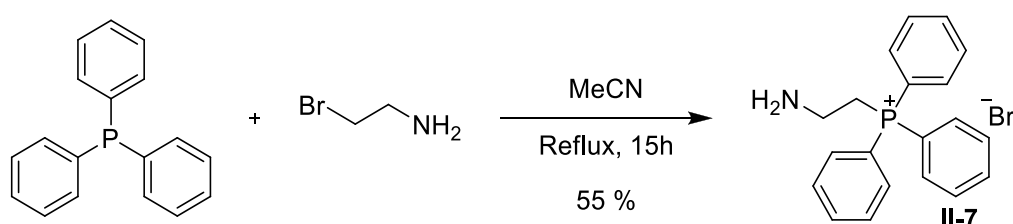


Figure II-42. Synthèse de l'amine **II-7** qui permet l'introduction du groupement triphénylphosphonium par couplage peptidique à la fin de la voie de synthèse envisagée.

5.A.ii Un pKa plus élevé pour s'adapter aux mitochondries

L'étude en absorption a ensuite été menée pour déterminer le pKa de la sonde **Mito-pH-TCF**. Comme attendu, ses propriétés sont relativement proches de celles de **II-2h** (voir Figure II-43, détaillées dans le Tableau II-2, page 45).

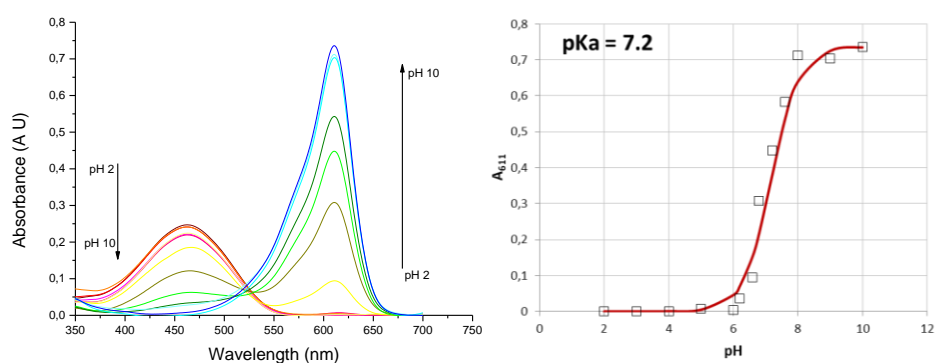


Figure II-43. Gauche : Spectres d'absorption de **Mito-pH-TCF** (10 μM) à différents pH dans un tampon HEPES. Droite : Absorbance en fonction du pH à 615 nm (carré) et modélisation par l'équation (II-1) (ligne rouge)

En milieu acide, le fluorophore présente une bande large centrée autour de 463 nm. Lorsqu'on augmente le pH, cette bande disparaît et laisse place à une bande plus fine et plus intense dont le maximum est situé à 611 nm. Ces deux bandes s'interconvertissent avec un point isobestique bien

défini, situé à 520 nm. Les coefficients d'absorption sont relativement équivalents à ceux de la sonde **II-2h** avec des valeurs de $54\ 000\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ en milieu acide et $122\ 000\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ sous forme phénolate.

	forme phénol ^a				forme phénolate ^b				pKa
	λ_{abs}	λ_{em}	$\Delta\lambda^c$	$\Phi^d (\epsilon\cdot\Phi)$	λ_{abs}	λ_{em}	$\Delta\lambda^c$	$\Phi^e (\epsilon\cdot\Phi)$	
Mito-pH-TCF	463	600	137	6 % (3 500)	611	644	33	1 % (1700)	7,2

Tableau II-5. Propriétés spectroscopiques de la sonde Mito-pH-TCF. Les longueurs d'ondes sont données en nm. ^a mesuré dans l'eau à pH 3 ^b mesuré à pH 10 ^c différence de longueur d'onde (nm) ^d mesuré dans l'eau avec la Coumarine 153 dans le méthanol ($\Phi=0,54$) comme référence. ^e mesuré dans l'eau avec le crésyl violet dans le méthanol ($\Phi=0,54$) comme référence.

Par la même méthode que pour les autres sondes sensibles au pH, il est possible d'obtenir une approximation du pKa du phénol. La valeur obtenue par régression des moindres carrés indique un pKa de 7,2, légèrement supérieur à celui obtenu pour **II-2h**. Ce résultat est en accord avec la corrélation obtenue précédemment avec les paramètres de Hammett. En effet, le groupement triphénylphosphonium n'est pas conjugué avec le cycle aromatique à cause de l'espaceur alkyle. Une des meilleures manières de modéliser l'apport électronique de tout le groupement fonctionnel est alors de ne considérer que le bras espaceur. Or le paramètre σ_m pour un tel type de chaîne alkoxy à deux, trois ou quatre carbones est de 0,10, soit légèrement plus faible que pour un groupement méthoxy et conduit, d'après la corrélation obtenue avec la Figure II-23, à un pKa de 7,25, proche de la valeur obtenue expérimentalement.

5.B. Mesure du pH

Les propriétés de fluorescence ont aussi été étudiées dans des solutions tamponnées à différents pH. Grâce à la charge positive portée par le phosphore, la sonde est parfaitement soluble en milieu acide. En milieu basique, lorsque le phénol est déprotoné, le fluorophore est sous forme zwitterionique, avec une solubilité un peu moindre mais suffisante pour les mesures.

5.B.i Une fluorescence sans mauvaise surprise

Lorsqu'elles sont excitées à leur maximum d'absorption, les deux formes émettent une fluorescence dont les caractéristiques sont résumées dans le Tableau II-5. En milieu acide, la fluorescence émise par la forme phénol est centrée sur 600 nm avec un très large déplacement de Stokes ($4930\ \text{cm}^{-1}$ correspondant à un décalage de à 130 nm). En milieu basique, la fluorescence enregistrée est, quant à elle, moins intense, avec un maximum à 644 nm et un déplacement de Stokes de $800\ \text{cm}^{-1}$ (30 nm) relativement proche des caractéristiques de **II-2h**. Les rendements quantiques de

fluorescence sont de respectivement de 6,5 % et de 1,4 % pour les formes acides et basiques, ce qui est légèrement supérieur à la sonde **II-2h** avec un simple méthoxy.

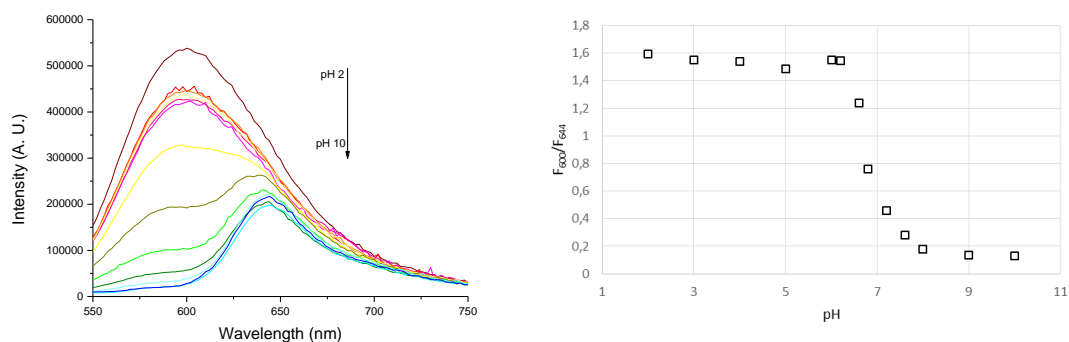


Figure II-44. Gauche : Spectres d'émission de **Mito-pH-TCF** (10 μM) à différents pH dans un tampon HEPES, avec excitation fixée à 525 nm (point isobestique). Droite : Changement dans le ratio de l'intensité mesurée ($F_{acide}/F_{basique}$) sur la gamme de pH 2 à 10.

En résumé, lorsqu'on compare **Mito-pH-TCF** et **II-2h**, le remplacement du groupement méthyle par une chaîne carbonée plus longue sur laquelle est greffée le triphénylphosphonium permet d'augmenter la solubilité et le pKa de la molécule tout en conservant les propriétés de fluorescence.

5.B.ii Utilisation ratiométrique en excitation

Comme pour les sondes présentées précédemment, il est possible d'effectuer une mesure ratiométrique du pH. Le rapport entre les deux émissions ($R_1 = F_{600}/F_{644}$) permet de calculer le pH comme le montre la Figure II-44. Ce rapport est multiplié par 10 entre pH = 8 et pH = 6. Cependant cette variation est maximale pour des pH en deçà de 7. Pour visualiser des variations à un pH supérieur, une première approche est de considérer le rapport inverse : $R_2 = F_{644}/F_{600}$ présenté sur la Figure II-45. R_1 et R_2 sont inversement proportionnels, R_2 augmente de 1,6 à 5,6 quand le pH passe de 7 à 8. Dans le même temps, R_1 est divisé par 3,5 entre 0,7 et 0,2. La précision est ainsi plus grande avec R_2 .

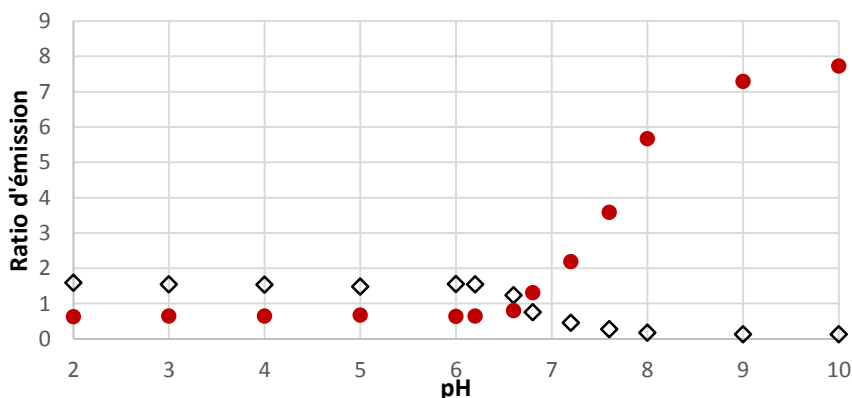


Figure II-45. Evolutions des ratio $R_1 = F_{600}/F_{644}$ (carrés noirs) et $R_2 = F_{644}/F_{600}$ (ronds bleus) en fonction du pH (**Mito-pH-TCF**, 10 μM, tampon HEPES). Le second permet une mesure plus précise d'un pH légèrement alcalin.

Chapitre II : De l'optimisation du pKa à la synthèse de sondes sensible au pH

Malheureusement, la sonde **Mito-pH-TCF** a une faible absorbance à la longueur d'onde du point isobestique. Ceci conduit à une fluorescence peu intense du phénol et du phénolate de la molécule. Un moyen de surmonter cette difficulté est d'utiliser un ratio en excitation. En effet, les deux formes ont une émission non négligeable autour de 640 nm comme le montre la Figure II-44 (gauche). En excitant successivement aux longueurs d'ondes d'absorption du phénol (460 nm) et du phénolate (600 nm), l'intensité collectée dépend directement de la proportion de chacune des deux formes. Ainsi à pH acide, le signal est intense lorsqu'on excite à 460 nm tandis qu'il est quasi nul avec une excitation à 570 nm et au-delà (voir Figure II-46). On obtient l'inverse à pH basique. De nouveau, il est plus intéressant de diviser la mesure collectée sur la forme basique par celle sur la forme acide pour avoir un maximum de variations autour de pH 8 ($R_3 = F_{600}/F_{460}$).

Les résultats de cette étude sont présentés dans la Figure II-46. R_3 est multiplié par mille entre pH 4 et pH 10 (de 0,01 à 12) avec une variation très importante entre pH 7 et pH 8 ($R_3 = 1,6$ à pH 7 et $R_3 = 5,6$ à pH 8). La variation de R_3 est la même que R_2 mais la fluorescence détectée est plus intense, ce qui permet une meilleure sensibilité.

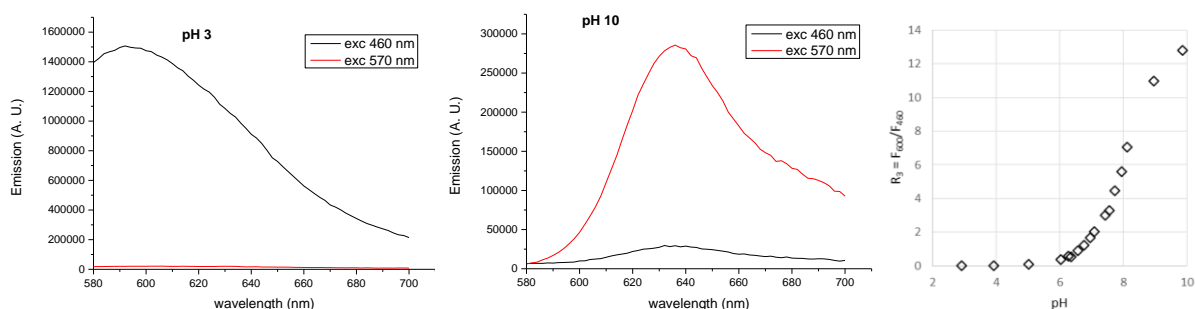


Figure II-46. Spectres d'émission de **Mito-pH-TCF** (10 μ M) dans un tampon HEPES à pH 3 (gauche) et 10 (centre) avec excitation de la forme phénol à 460 nm (noir) et de la forme phénolate à 570 nm (rouge). Droite : évolution de R_3 en fonction du pH.

5.B.iii Stabilité et influence extérieure

Avant d'utiliser cette sonde pour une application in-vitro, nous avons voulu vérifier la stabilité de celle-ci vis-à-vis du photo-blanchiment. En effet, sous une excitation intense, de nombreuses sondes fluorescentes sont dégradées et n'émettent plus. Nous avons comparé notre composé à la fluorescéine. Tous les deux ont été irradiés à 460 nm (maximum d'absorption de notre sonde) pendant une heure. L'intensité du Laser est suffisante pour blanchir 50 % de la fluorescéine. Dans le même temps, seulement 10 % de **Mito-pH-TCF** a été dégradé (voir Figure II-47), ce qui démontre une meilleure photostabilité.

II.5 : Un exemple de fonctionnalisation : la localisation intracellulaire

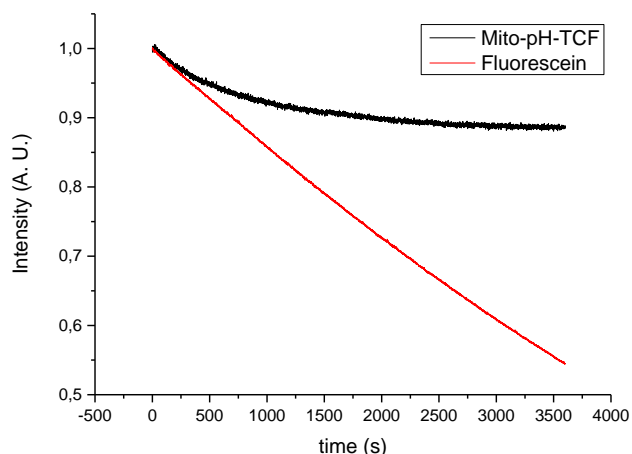


Figure II-47. Stabilité comparée vis-à-vis du photo-blanchiment de la sonde **Mito-pH-TCF** (noir, tampon HEPES) et de la fluorescéine (rouge). Exc 460 nm avec une concentration 10 μ M pour les deux fluorophores.

Une autre vérification importante concerne la dernière recommandation de N. Demaurex^[71] : la spécificité au pH par rapport aux autres ions et spécialement aux espèces oxydantes présentes dans la mitochondrie. La fluorescence mesurée à pH 7,4 (une partie de la sonde est protonée) en présence des principaux ions métalliques à 1mM (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} et Fe^{2+}), de thiols (GSH, 5 mM), ou d'espèces oxydantes (H_2O_2 , ClO^- , 1mM) conserve la même intensité. Le ratio R_3 mesuré ne présente que très peu de variations (Figure II-48). Seule la présence du fer (II) entraîne une réponse. Cela est dû à un affaiblissement de la fluorescence de la forme protonée dans ces conditions. En présence de peroxyde d'hydrogène et d'ions hypochlorite (1 mM, Figure II-48), il y n'a là aussi aucun changement notable, ce qui indique que **Mito-pH-TCF** peut être utilisée pour mesurer le pH de mitochondries sans perturbation due à des espèces biologique.

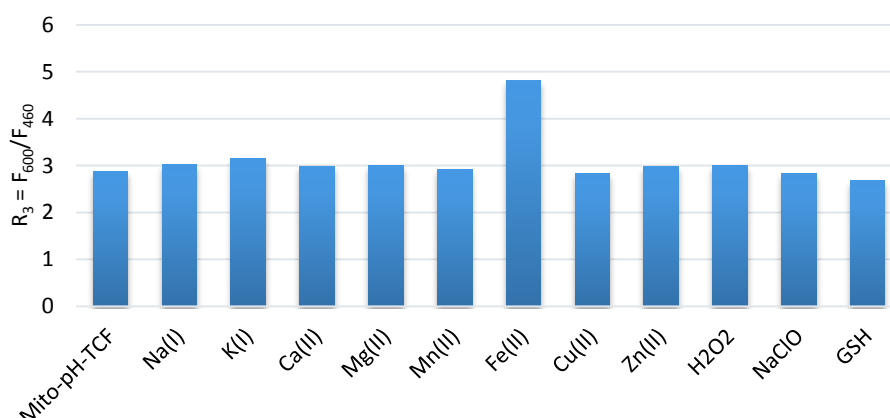


Figure II-48. Ratio d'excitation de **Mito-pH-TCF** en présence de divers ions métalliques (1mM, Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}), 5mM GSH et 1mM H_2O_2 et NaClO dans un tampon HEPES à pH 7,4.

5.C. Expériences *in-vitro* ?

Nous avons ensuite souhaité appliquer cette sonde à l'imagerie cellulaire. Malheureusement dans les tampons phosphates utilisés pour la culture cellulaire, il semble que les sondes précipitent et ne sont pas capables de passer la membrane cellulaire. Contrairement aux tampons HEPES utilisés pour les mesures spectrométriques la sonde n'est pas soluble en présence de phosphates. Le précipité est de couleur bleue, ce qui semble indiquer que c'est le zwitterion qui précipite.

Une solution proposée pour dépasser ce problème est la protection du groupement phénol sous forme d'ester acétoxy méthyle (**AM-Mito-pH-TCF**, voir Figure II-49) à la manière de la protection des acides carboxyliques présents sur les sondes décrites dans l'introduction. L'action des estérases présentes dans les cellules et en particulier dans les mitochondries permettrait de retrouver la sonde **Mito-pH-TCF**.

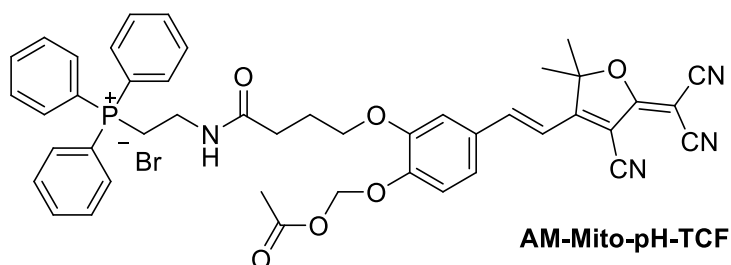


Figure II-49. Nouvelle cible : AM-Mito-pH-TCF dont le phénol est protégé sous forme d'ester acétoxy méthyle.

Malheureusement, par manque de temps la synthèse n'a pas été achevée à l'heure de la rédaction du manuscrit. Il n'a donc pas été possible de tester cette sonde en conditions physiologiques et surtout de vérifier l'entrée dans les cellules et la solubilité d'une telle architecture.

II.6 Conclusion

L'objectif de ce premier chapitre était de synthétiser des sondes fluorescentes sensibles à des variations de pH. L'utilisation d'un groupement phénol permet d'obtenir une espèce qui peut être protonée ou déprotonée suivant le pH. Cette caractéristique structurale s'accompagne d'une modification des propriétés électroniques et spectroscopiques. De plus, la condensation de Knoevenagel avec le **TCF** permet d'introduire un groupement très fortement électro-attracteur, ce qui abaisse directement le pKa à une valeur de 7,4 proche du pH physiologique.

La grande liberté offerte dans le choix de l'aldéhyde a permis de synthétiser une large famille de molécules couvrant une gamme de pKa très large : de 5 à 9. Ces molécules sont stables et réagissent

de façon réversible à des variations de pH avec une forme phénol qui absorbe autour de 460 nm et une forme déprotonée dont les propriétés sont décalées vers le rouge.

Les propriétés d'émission de ces molécules permettent une mesure ratiométrique du pH avec une très bonne précision aux alentours du pKa. Les longueurs d'onde utilisées se rapprochent de la fenêtre de transparence biologique avec des maxima d'émission au-delà de 600 nm. Ces propriétés intéressantes nous ont permis de mesurer le pH intracellulaire au cours d'une collaboration avec l'équipe du Pr Jacques Samarut et ont fait l'objet d'une publication dans *Organic & Biomolecular Chemistry*. Cette dernière est fournie en annexe à la fin du manuscrit.

Enfin, il est possible de facilement fonctionnaliser ces sondes pour ajouter un groupement ciblant les mitochondries. Les propriétés spectroscopiques peuvent être adaptées aux pHs légèrement alcalins qu'on trouve dans ces organites. Malheureusement, pour des raisons de solubilité, la sonde **Mito-pH-TCF** n'a pu être testée en cellule. Une solution proposée est la protection de cette dernière sous forme d'ester acétoxyméthyle.

Pour se hisser au rang des meilleures sondes présentes sur le marché, il est cependant nécessaire d'améliorer deux propriétés spectroscopiques. Tout d'abord, décaler les longueurs d'onde d'absorption et d'émission vers le rouge. Les caractéristiques des sondes **II-2i** et **II-2j** offrent une solution possible à condition de substituer les groupements naphthyles pour ramener le pKa à des valeurs proches du pH physiologique. Ensuite, il faut augmenter l'intensité de fluorescence émise par les sondes. Une piste envisagée est la rigidification de la structure et de la liaison vinylique en greffant directement le groupement **TCF** sur les cycles aromatiques, comme on peut le voir sur la Figure II-50, à la manière des composés synthétisés par Lord *et al.*^[24,77] avec des amines. Une autre possibilité est l'inclusion de nos molécules dans des hydrogels permettant de rigidifier l'environnement et donc d'augmenter l'intensité émise.

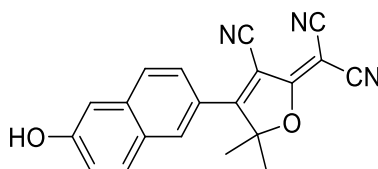


Figure II-50. Proposition de sonde pH rigidifiée permettant une fluorescence plus intense

Chapitre III Application du principe OFF/ON à la détection du peroxyde d'hydrogène

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à la détection du peroxyde d'hydrogène à l'aide de sonde portant le groupement **TCF**. Ce chapitre va permettre de mettre en évidence l'importance et la nécessité d'une architecture dipolaire pour obtenir la fluorescence en créant des sondes de type OFF/ON.

Le peroxyde d'hydrogène est un composé produit en très larges quantités à l'échelle industrielle pour ses propriétés oxydantes qui servent dans le blanchiment de la pâte à papier, le traitement des eaux ou comme désinfectant. Nous nous sommes, quant à nous, intéressés à la détection du peroxyde d'hydrogène présent dans les cellules et impliqué dans de nombreux processus physiologiques.

III.1 Le peroxyde d'hydrogène dans la cellule

A l'échelle d'un organisme, le peroxyde d'hydrogène est produit principalement dans les mitochondries. C'est un sous-produit de la respiration aérobie : environ 0,5 % de tout l'oxygène consommé^[78] subit une réduction incomplète qui s'arrête à H₂O₂. Parmi les différentes espèces réactives de l'oxygène (ROS pour Reactive Oxygen Species) comme l'anion superoxide (O₂⁻), le radical hydroxyle (HO⁻) ou l'anion hypochlorite (ClO⁻), le peroxyde d'hydrogène a la plus faible réactivité, la plus grande stabilité (la plus longue demi-vie) et surtout la plus grande concentration intracellulaire (voir Figure III-1).

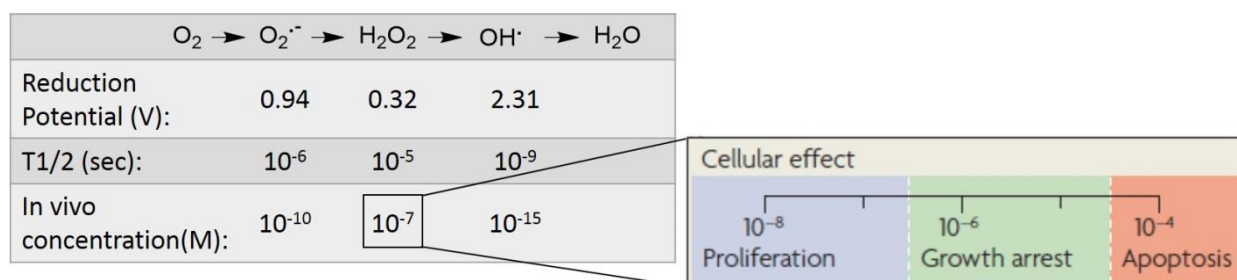


Figure III-1. Présentation des différentes ROS ayant un rôle biologique dans le corps humain avec leur potentiel standard, temps de demi-vie et concentration. L'encart montre les effets biologiques d'une variation de la concentration cellulaire en H₂O₂. Tiré de ^[79]

1.A. Un rôle ambivalent

La concentration en espèce oxydante est contrôlée au sein de la cellule. Cependant une mauvaise régulation entraîne une accumulation de ces espèces et cause ce que l'on appelle le stress oxydant, nocif pour la cellule. Par exemple, la concentration en H_2O_2 dans *Escherichia Coli* est relativement constante (autour de $0,2 \mu M$) en dépit de fluctuations mais devient toxique lorsqu'elle atteint une valeur autour de $1 \mu M$ ^[80]. De plus, comme montré dans l'encart de la Figure III-1, le traitement de différentes cellules avec des doses croissantes de peroxyde d'hydrogène entraîne la prolifération puis, en augmentant la dose, l'apoptose de celles-ci. Une grande concentration en peroxyde d'hydrogène fragilise la membrane cellulaire^[81] et la rend perméable au milieu extérieur, ce qui entraîne la destruction de la cellule elle-même.

Le stress oxydant s'accompagne d'une oxydation de protéines^[82] ou d'acides nucléiques^[83] et d'une modification du matériel génétique^[84]. Pris séparément, ces effets néfastes peuvent être traités, mais un stress oxydant prolongé entraîne une accumulation irréversible des dommages, ce qui engendre à terme le vieillissement cellulaire ainsi que des maladies qui lui sont liées comme des maladies neurodégénératives, des diabètes ou des cancers^[85].

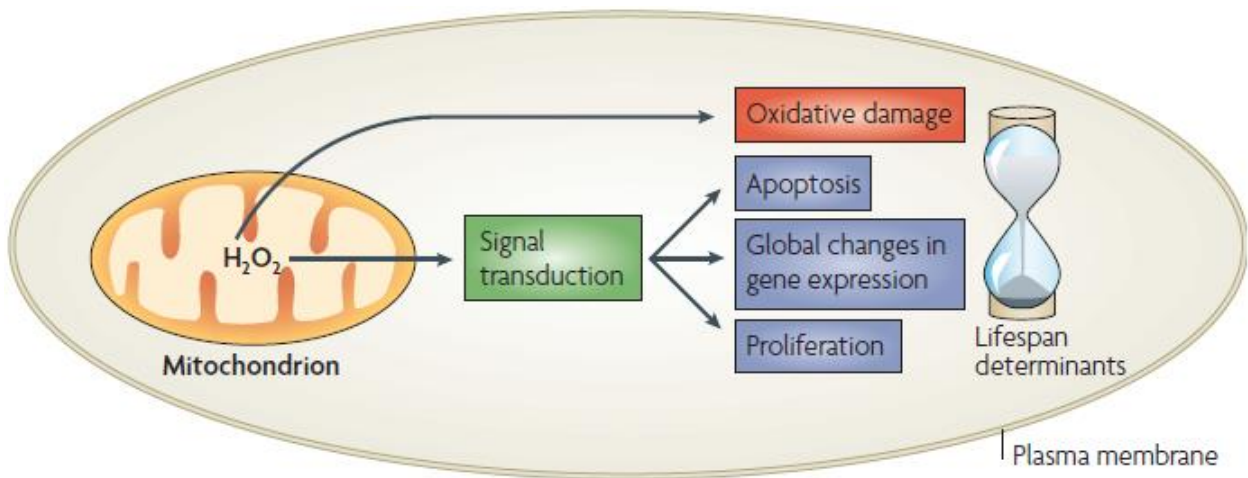


Figure III-2. Le peroxyde d'hydrogène produit dans les mitochondries permet de réguler la durée de vie en agissant en tant que molécule de transduction de divers signaux et à travers le stress oxydant. H_2O_2 peut affecter la prolifération ou l'apoptose des cellules par activation ou désactivation de protéines. Le stress oxydant résulte en une détérioration chronique des fonctions cellulaires qui conduit au vieillissement de celle-ci. Extrait de ^[79]

Cependant, H_2O_2 peut aussi être produit spécifiquement par plusieurs enzymes^[86]. C'est d'ailleurs la seule ROS pour laquelle il existe de telles enzymes^[79]. Ceci montre son importance au sein de la cellule et son apport indispensable. Le peroxyde d'hydrogène est en effet utilisé pour transmettre des signaux au sein de la cellule en réponse à des stimuli de croissance ou de stress^[87] (voir Figure III-2). Par exemple, par l'oxydation réversible de cystéines, H_2O_2 permet la formation de liaisons disulfures

au sein de protéines et le changement conformationnel qui en résulte module l'activité de celle-ci^[88,89] (activation ou inhibition suivant la protéine).

Dans un environnement inflammé, H₂O₂ sert de réponse immunitaire : les macrophages produisent de larges quantités d'espèces oxydantes^[90] (H₂O₂ peut atteindre des concentrations aussi élevées que 10 à 100 µM) qui vont altérer les agents pathogènes extérieurs. En parallèle à la désinfection, le peroxyde d'hydrogène est aussi un signal déclenchant la cicatrisation^[91] par la prolifération de cellules endothéliales, de fibroblastes et de kératinocytes, qui vont respectivement former les vaisseaux sanguins, le derme et l'épiderme.

1.B. La fluorescence au service de la détection

Ces quelques exemples montrent le caractère ambigu du peroxyde d'hydrogène (stress ou signal) et la nécessité de mieux comprendre tous les effets dont il est responsable. Dans ce but, l'imagerie optique et en particulier la fluorescence, présente de très nombreux avantages pour l'étude des différentes ROS dans l'organisme : étude non-invasive avec une grande résolution spatiale et temporelle. Au cours des années, de très nombreuses sondes fluorescentes ont été développées et ont permis une meilleure compréhension des différents phénomènes dans lesquels H₂O₂ est impliqué. Les pages suivantes présentent quelques exemples de ces sondes qui ont permis d'identifier l'action du peroxyde d'hydrogène dans l'organisme.

1.B.i Des premiers exemples non sélectifs

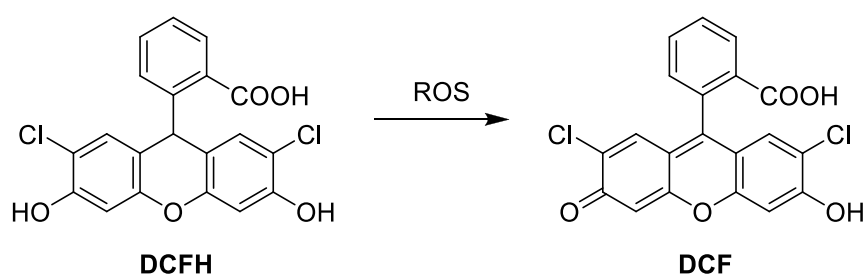


Figure III-3. Exemple de sonde sensible aux espèces oxydantes basée sur une dihydrofluorescéine. La DCFH non fluorescente est oxydée en DCF fluorescente.

La première sonde sensible au peroxyde d'hydrogène publiée dans la littérature est la 2',7-Dichlorodihydrofluorescéine^[92] (**DCFH**). Cette molécule peut être oxydée par H₂O₂ pour donner la 2',7'-dichlorofluorescéine (**DCF**, voir Figure III-3) qui est complètement conjuguée et possède une intense fluorescence. **DCFH** n'est pas du tout fluorescent avant l'oxydation, ce qui permet d'avoir une sonde dite « Turn-on » ou « OFF/ON » qui s'allume uniquement en présence de l'analyte étudié, ici

Chapitre III : Application du principe OFF/ON à la détection du peroxyde d'hydrogène

H_2O_2 . Dans la même veine, la dihydrorhodamine 123 (**DHR123**)^[93] ou d'autres dérivés de dihydrofluorescéine ont pu être utilisés^[94,95].

Cependant ce type de sonde souffre de deux inconvénients majeurs : tout d'abord, les fluorescéines sont très photosensibles et elles ont tendance à s'auto-oxyder sous excitation lumineuse. Ceci produit un très fort signal de fond en absence d'espèce oxydante. De plus, ces composés manquent de sélectivité pour H_2O_2 parmi les différentes ROS. Il est même maintenant prouvé que **DCFH** ne réagit pas avec le peroxyde d'hydrogène si un catalyseur, le cytochrome C, est absent^[96]. En réalité, la seule espèce oxydante qui réagit directement avec cette sonde est le radical HO \cdot .

Un autre exemple intéressant est basé sur l'oxydation d'une phosphine^[97]. La sonde **DPPEA-HC** (7-hydroxy-2-oxo-N-(2-(diphénylphosphin)éthyl)-2-[H]-chromèn-3-carboxamide) contient un groupement diphénylphosphine qui éteint la fluorescence par phénomène PET (Figure III-4). Lorsque celui-ci est oxydé en phosphine oxyde, le transfert d'électrons n'a plus lieu et la fluorescence est restaurée. Même si il est possible de détecter des concentrations en peroxyde d'hydrogène autour du millimolaire, le caractère OFF/ON n'est pas entièrement réalisé car le transfert d'énergie par PET est incomplet : le fluorophore est fluorescent avant oxydation et la fluorescence n'est multipliée que par 1,3. De plus, cette dernière sonde réagit avec $O_2^{\cdot -}$ aussi rapidement qu'avec H_2O_2 et n'est donc pas sélective par rapport à toutes les autres ROS.

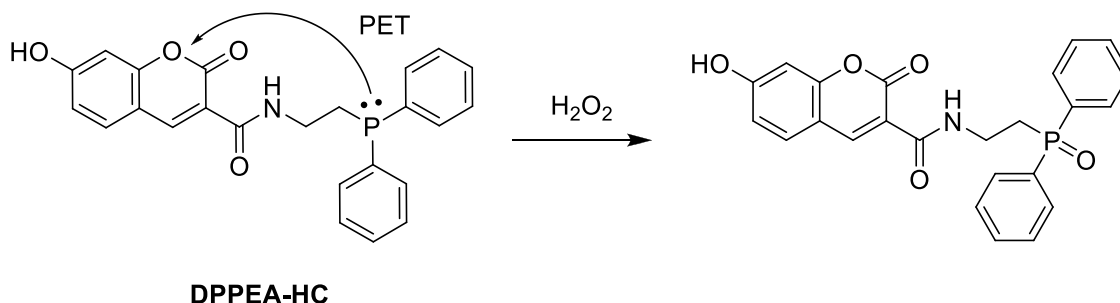
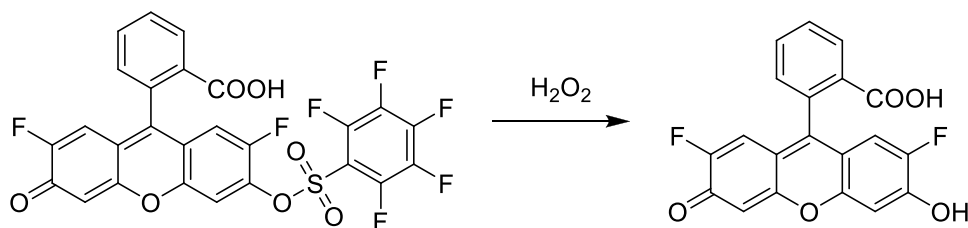


Figure III-4. **DPPEA-HC** réagit avec H_2O_2 pour oxyder la phosphine qui ne peut plus désexciter la sonde par PET

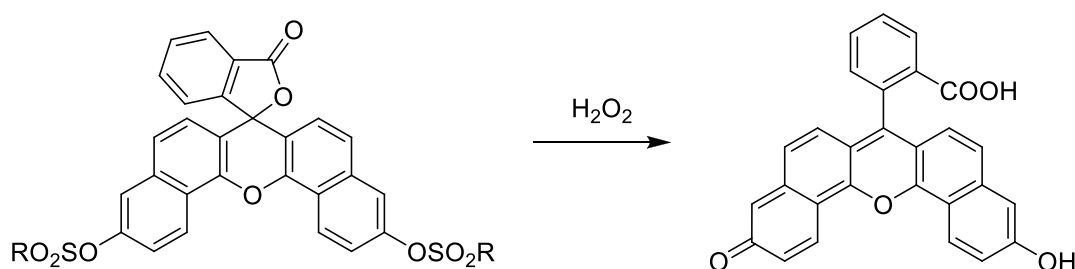
Ces résultats montrent que ces composés ne sont pas adaptés à la détection sélective de ROS, mais peuvent servir pour détecter le niveau général d'activité oxydante dans un tissu. Cependant, comme chaque ROS a sa propre activité physiologique, il est très important d'avoir des sondes capables de discriminer entre chacune de ces espèces.

La première sonde sélective a été synthétisée par Maeda *et al.*^[98]. Elle consiste en une fluorescéine protégée par un ester perfluorobenzènesulfonique (voir Figure III-5), qui est déprotégé par H_2O_2 pour régénérer la fluorescence. Sa très grande sensibilité, autour de quelques nano-molaires,

ainsi que sa bonne sélectivité la rendent intéressante mais, malheureusement, la cinétique de cette déprotection est relativement lente. Sans améliorer cette cinétique, Xu *et al.*^[99] ont tenté de se rapprocher de la fenêtre de transparence biologique avec l'utilisation de naphthofluorescéine pour décaler vers le rouge les longueur d'ondes d'absorption ($\lambda_{\text{max}} = 595 \text{ nm}$) et d'émission ($\lambda_{\text{max}} = 660 \text{ nm}$).



fluorescein pentafluorobenzenesulfonic ester



Naphthofluorescein disulfonyl ester

Figure III-5. Exemple de sondes basées sur la déprotection d'ester sulfonique développés par Maeda *et al.* (haut) et Xu *et al.* (bas)

1.B.ii Le groupement ester pinacolboronique change la donne

Pour améliorer la sélectivité et la détection du peroxyde d'hydrogène vis-à-vis des autres espèces oxydantes, Chang *et al.*^[100] ont eu l'idée d'utiliser comme groupement protecteur un ester de bore : l'ester pinacolboronique. L'idée est ici d'utiliser la réactivité particulière de H_2O_2 . Le peroxyde d'hydrogène possède une liaison O-O qui lui permet de réagir en tant qu'oxydant électrophile qui peut récupérer deux électrons. De plus, H_2O_2 est aussi un bon nucléophile grâce à l'effet α des orbitales non-liantes adjacentes sur les oxygènes^[101,102]. Les esters de bore semblent, de leur côté, tout à fait complémentaire avec cette réactivité (voir Figure III-6) : le bore réagit en tant qu'électrophile avec H_2O_2 pour former un complexe de bore tétrahédrique qui est chargé négativement, puis la liaison C-B devient à son tour nucléophile et attaque un oxygène. Le départ du phénol lors de l'hydrolyse permet de libérer un fluorophore qui était masqué auparavant.

Chapitre III : Application du principe OFF/ON à la détection du peroxyde d'hydrogène

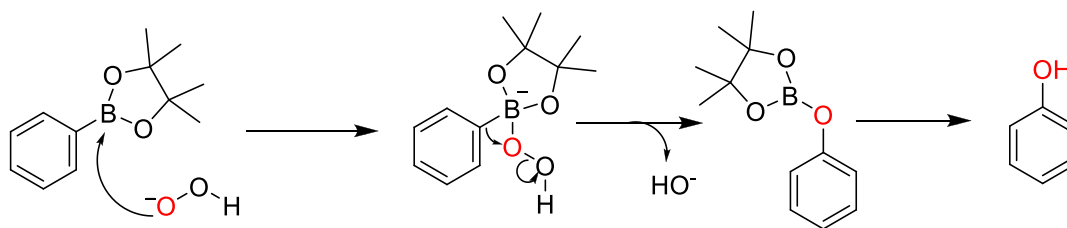


Figure III-6. Mécanisme de la réaction entre le peroxyde d'hydrogène et un ester boronique faisant intervenir les deux types de réactivité du peroxyde d'hydrogène.

Cette approche a été utilisée avec succès avec la sonde Peroxy-Fluorescein 1 (**PF1**, Figure III-7). L'utilisation de deux groupements esters boroniques force une configuration lactone fermée non fluorescente. La réaction avec H_2O_2 libère les phénols et ouvre la lactone, ce qui conduit à une très intense augmentation de la fluorescence (supérieure à 1000). De plus, cette réponse est extrêmement sélective vis-à-vis des autres ROS. Malheureusement, cette première génération de sonde n'est sensible qu'à des concentrations de l'ordre du micro-molaire, ce qui correspond à un état de stress oxydant et non à un niveau de signalisation.

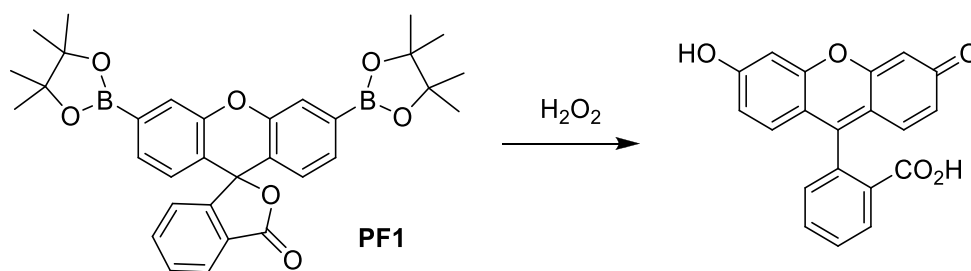


Figure III-7. La Peroxy-Fluorescéine 1 est la première sonde basée sur le groupement protecteur ester boronique. La réaction avec H_2O_2 permet de révéler la fluorescéine masquée.

Ce type de sonde a ensuite été amélioré au cours des dernières années pour augmenter sa sensibilité : PeroxyGreen 1 (**PG1**, Figure III-8) peut ainsi détecter le peroxyde d'hydrogène à des niveaux correspondant à la signalisation moléculaire^[103] (centaine de nanomolaire) car il n'y a besoin de déprotéger qu'un seul ester boronique. D'autres efforts ont été réalisés pour cibler certains organites tels que les mitochondries^[104] (**MitoPY1**), pour augmenter la rétention avec des charges négatives^[105] (**PF6AM**), ou pour avoir une émission ratiométrique qui permette une mesure plus précise des concentrations en peroxyde d'hydrogène^[106] (**RPF1**). Cette approche a même été utilisée avec des complexes de terbium^[107] (**TPR1**) pour profiter de durées de vie de fluorescence plus longues et diminuer l'auto-fluorescence du milieu. Ces sondes sont présentées dans la Figure III-8 et leurs caractéristiques sont résumées dans le Tableau III-1.

sonde	sonde $\lambda_{abs}/\lambda_{em}$ (nm)	produit $\lambda_{abs}/\lambda_{em}$ (nm)	turn-on	commentaires
PF1	NA/NA	494/521	> 1000	détection de H ₂ O ₂ exogène
PG1	460/510	460/510	10	détection de faibles concentrations
MitoPY1	510/540	510/528	4,5	cible les mitochondries
PF6AM	460/530	492/517	7	meilleure rétention dans les cellules
RPF1	420/464	420/517, 461	8	détection ratiométrique
TPR1	226/545	226/545	6	luminescence de lanthanide

Tableau III-1. Propriétés de sondes synthétisées dans l'équipe de Christopher Chang pour la détection du peroxyde d'hydrogène.

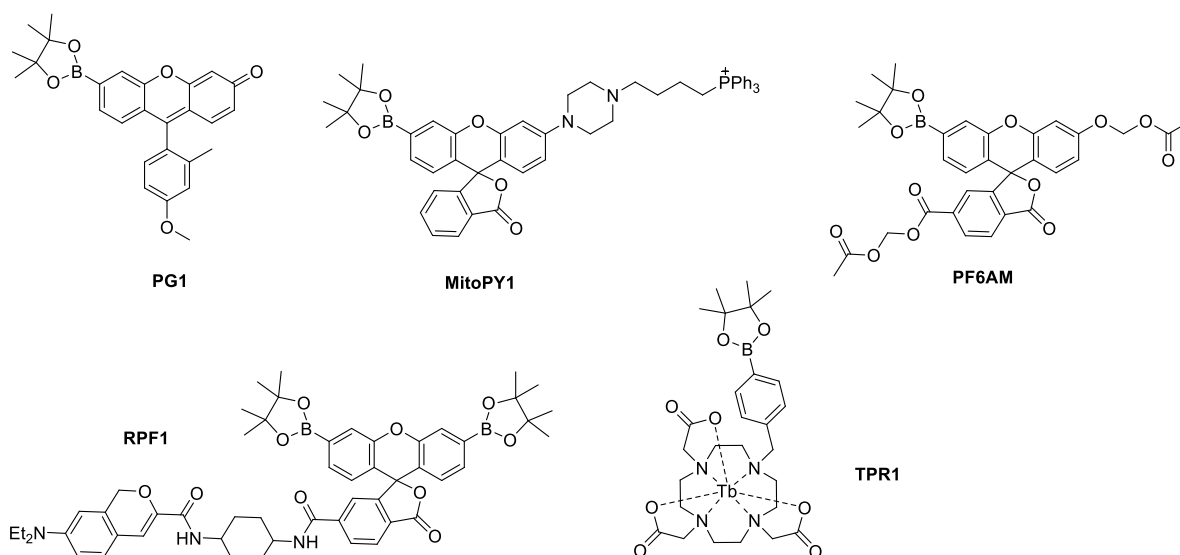


Figure III-8. Quelques exemples de sondes développées au sein du laboratoire de Christopher Chang.

Bien sûr, d'autres équipes se sont emparées de cette avancée pour améliorer les sondes existantes, avec, en particulier, d'autres fluorophores. Par exemple, pour décaler les longueurs d'onde d'absorption et d'émission vers le rouge, Shabat *et al.* ont exploité une cyanine porteur d'un groupement boronate^[108] à travers un bras espaceur (Figure III-9, haut). En l'absence de H₂O₂, le phénol est protégé, la cyanine n'est plus conjuguée car le cycle aromatique du phénol rompt la conjugaison : la sonde n'est pas émissive. Après action du peroxyde d'hydrogène, le phénol est oxydé en quinone, ce qui rétablit la conjugaison étendue du système et permet une émission intense dans le proche infra-rouge ($\lambda_{em} = 720$ nm). Plus récemment, une nouvelle sonde fluorescente a été synthétisée au sein du laboratoire de Lin^[109]. Basée sur une hydroxycoumarine dont la conjugaison est étendue, cette sonde

Chapitre III : Application du principe OFF/ON à la détection du peroxyde d'hydrogène

présente une fluorescence à 708 nm cent quatre-vingt fois plus intense après action du peroxyde d'hydrogène (Figure III-9, bas).

Il faut noter l'ajout d'un espaceur entre l'acide boronique et le noyau aromatique. Cet espaceur est éjecté sous forme de quinone après l'action du peroxyde d'hydrogène. Ceci permet d'améliorer la cinétique de la réaction au prix du relargage d'une espèce hautement réactive dans l'organisme.

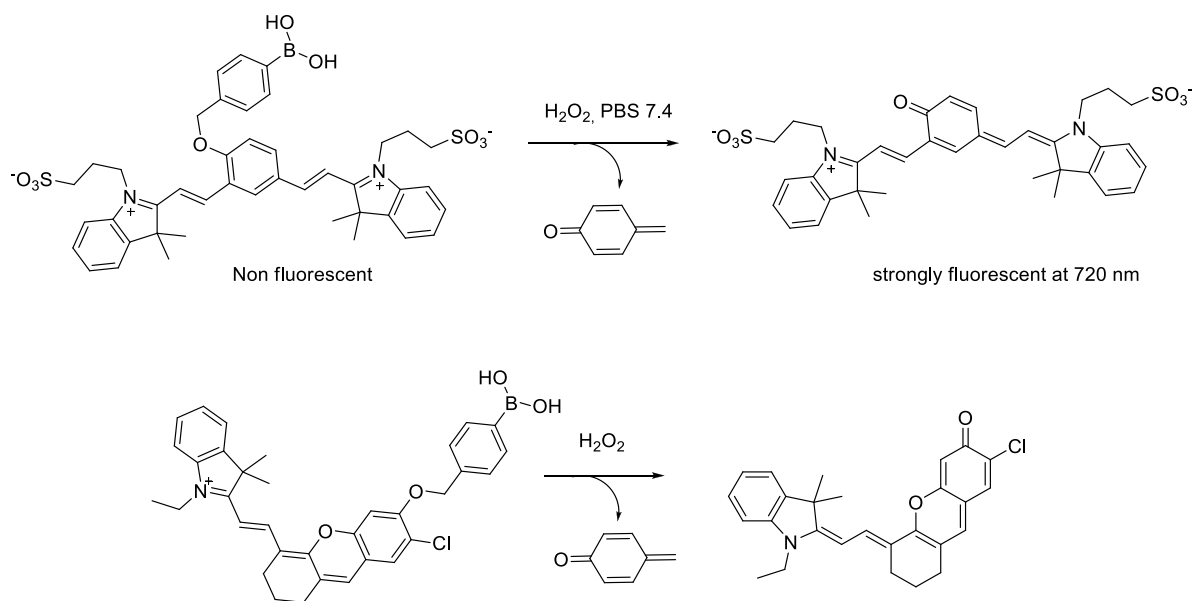


Figure III-9. Nouvelles sondes émettant dans le proche-infrarouge développées par Shabat et al. (haut) et Yuan et al. (bas) pour la détection du peroxyde d'hydrogène.

III.2 Une première sonde comme preuve de concept

Pour pouvoir éteindre la fluorescence des dipôles TCF, il faut rompre le caractère dipolaire de la molécule. Ceci peut être simplement réalisé avec le remplacement du groupe $-OH$ électro-donneur par un groupement beaucoup plus neutre électriquement. Ayant perdu son architecture, D- π -A, la molécule n'exhibe alors plus de fluorescence.

C'est dans cette idée que le groupement ester pinacolboronique est très intéressant car le bore lié au cycle aromatique est légèrement électro-attracteur ($\sigma = 0,12$) quand le groupement hydroxyle est fortement électro-donneur ($\sigma = -0,37$). Ce remplacement devrait normalement permettre une extinction de fluorescence qui pourrait être retrouvée après action du peroxyde d'hydrogène (voir Figure III-10). L'utilisation d'un espaceur oxygéné comme sur les deux derniers exemples n'est pas possible avec notre approche car le caractère dipolaire serait encore présent. Nous avons donc choisi de directement greffer le groupement ester pinacolboronique sur le noyau aromatique.

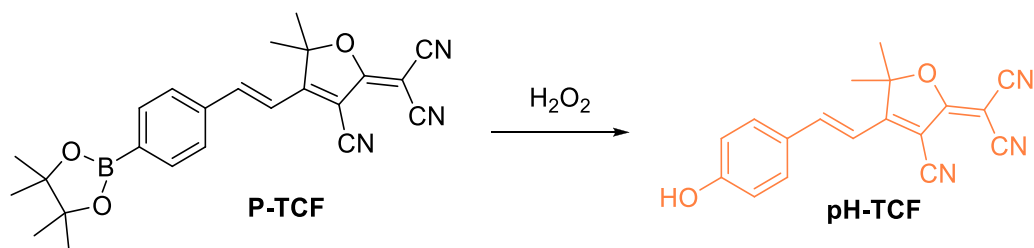


Figure III-10. Stratégie de sonde fluorogène dont la fluorescence est activée après action du peroxyde d'hydrogène.

2.A. Synthèse du boroester

La Figure III-10 présente la sonde Peroxy-TCF (**P-TCF**) qui correspond à cette approche : l'action du peroxyde d'hydrogène devrait permettre la réapparition du groupement phénol et révéler la sonde **pH-TCF** présentée au chapitre précédent. La première étape de synthèse est un couplage de Miyaura entre le 4-Bromobenzaldéhyde et le bis(dipinacolato)dibore (abusivement appelé dibore ultérieurement). Ce couplage catalysé par une espèce au palladium en présence de base permet l'introduction du groupement pinacolborane à la place du brome.

Les premiers essais ont été effectués à 80 °C avec 2,5 équivalents de dibore et 5 équivalents d'acétate de potassium, en présence de PdCl₂(dppf)^[110]. Quel que soit le solvant utilisé (DMSO et dioxane) et le temps de réaction (jusqu'à 64 h), les réactifs ont été récupérés et un taux de conversion extrêmement faible a été observé.

Pour augmenter le taux de conversion, il est nécessaire d'ajouter une irradiation micro-onde^[111]. Avec les mêmes réactifs, une agitation à 140 °C pendant 40 minutes et sous irradiation micro-onde permet une conversion totale (Figure III-11). Après traitement et colonne, le produit **III-1** a été obtenu, sans pour autant être entièrement séparé du dibore (reconnaissable à son signal en RMN 1H à 1,26 ppm) avec un rendement de 97%. Une fraction du produit a été cristallisée pour les analyses.

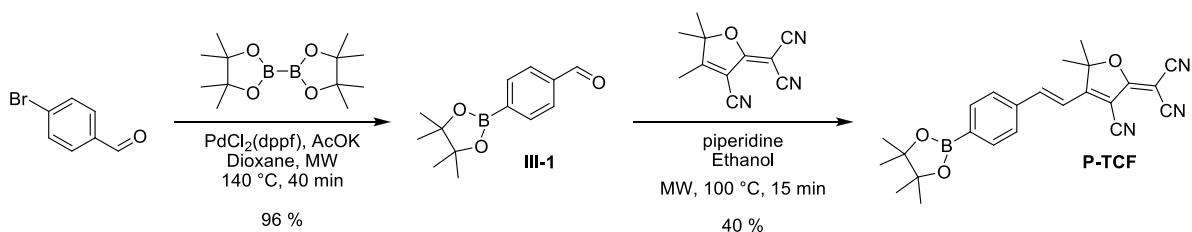


Figure III-11. Synthèse de la sonde **P-TCF** en deux étapes : couplage de Miyaura et condensation de Knoevenagel.

La dernière étape est l'habituelle condensation de Knoevenagel dans les conditions présentées au chapitre précédent. Elle permet l'obtention de la sonde finale Peroxy-TCF (**P-TCF**) avec un

rendement de 40 %. Le dibore qui n'avait pas été séparé à l'étape précédente est parfaitement soluble dans l'éthanol et le produit désiré est facilement purifié par filtration du solide orange. Le rendement total de la synthèse est de 38 %.

2.B. Un vrai caractère OFF/ON

Pour vérifier la solidité de nos hypothèses, la fluorescence de la sonde **P-TCF** a été étudiée en milieu aqueux. La solubilité dans un tampon HEPES 100 mM est suffisante pour se passer de la présence de DMSO comme co-solvant. Les propriétés spectroscopiques sont présentées Figure III-12. Tout d'abord, en comparant les spectres d'absorption et de fluorescence avec **pH-TCF**, il est possible de s'apercevoir du premier avantage (ou inconvénient, suivant de quel point de vue on se place), de cette sonde. En effet, à pH physiologique, **pH-TCF** est présent sous deux formes (phénol et phénolate) dues à son pKa proche de 7,4 (voir chapitre précédent). D'un côté, la fluorescence est partagée et couvre un domaine de de 500 à 700 nm avec une faible intensité maximale, qui n'est pas idéale pour détecter une faible quantité de peroxyde d'hydrogène. D'un autre côté, c'est une opportunité pour détecter deux évènements distincts : l'action du peroxyde d'hydrogène puis une mesure de pH.

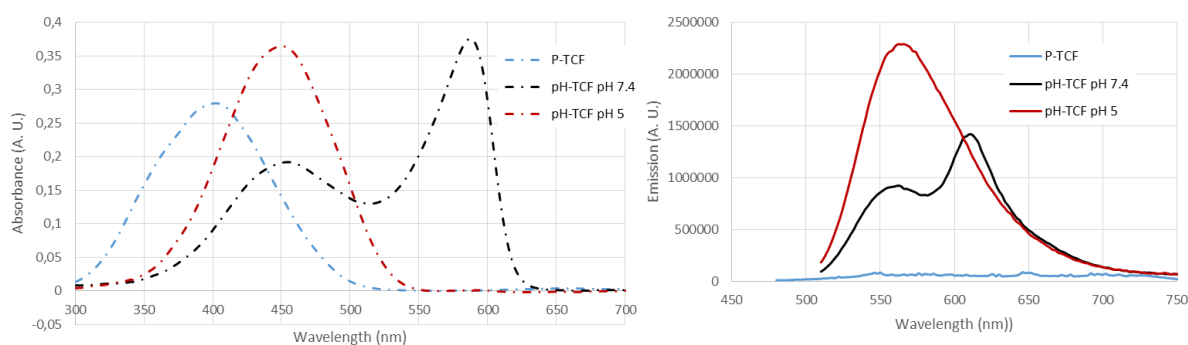


Figure III-12. Spectres d'absorption (gauche) et de fluorescence (droite) des sondes **P-TCF** (10 μ M, tampon HEPES, bleu), **pH-TCF** (10 μ M, tampon HEPES) à pH 7,4 (noir) et à pH 5 (rouge). La sonde **P-TCF** est excitée à 400 nm (maximum d'absorption) tandis que **pH-TCF** est excitée au point isobestique (500 nm).

Entre la sonde **P-TCF** et le phénol, il existe un décalage hypsochrome en absorption d'une quarantaine de nanomètres (405 nm contre 448 nm). La comparaison avec le phénolate est encore plus intéressante puisqu'il y a environ 140 nm de décalage. De plus, la sonde **P-TCF**, lorsqu'elle est excitée à 400 nm, ne présente qu'une très faible fluorescence avant activation par H_2O_2 . En comparaison, la sonde **pH-TCF** est 30 fois plus fluorescente à pH 5 (voir Figure III-12, droite) avec une excitation à 500 nm. A pH physiologique (7,4), le ratio maximum est beaucoup plus important lorsqu'on s'intéresse au phénolate : autour de 130 avec une excitation à 570 nm et une collecte à 605 nm. A ces

longueurs d'ondes, la sonde **P-TCF** est totalement transparente avec une absorbance quasi-nulle, la fluorescence est donc totalement inexistante.

Les études cinétiques de la déprotection du groupement boronate par H_2O_2 ont été menées en conditions de pseudo premier ordre cinétique avec une dégénérescence de l'ordre due à un grand excès en peroxyde d'hydrogène (environ cent fois plus important). A pH 5, elles montrent une complète transformation de **P-TCF** en **pH-TCF** en 30 minutes comme le montre la Figure III-13. Après ajout du peroxyde d'hydrogène, la fluorescence est multipliée par 25. Par régression linéaire, la constante cinétique apparente mesurée est $k_{\text{app}} = 1,7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ pour $[\text{H}_2\text{O}_2] = 5 \text{ mM}$, soit $k_{\text{P-TCF}} = 0,34 \text{ s}^{-1}$.

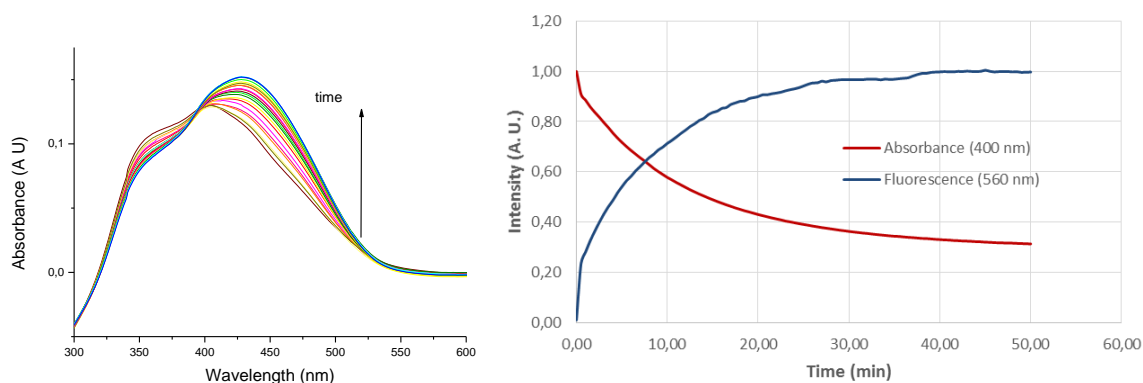


Figure III-13. Gauche : évolution de l'absorbance de **P-TCF** ($10 \mu\text{M}$, tampon HEPES) en fonction du temps en présence de 5 mM de H_2O_2 à pH 5 Droite : Cinétique de l'apparition de la fluorescence à 570 nm (bleu, exc 460 nm) et de la variation de l'absorbance à 405 nm (rouge) dans les mêmes conditions.

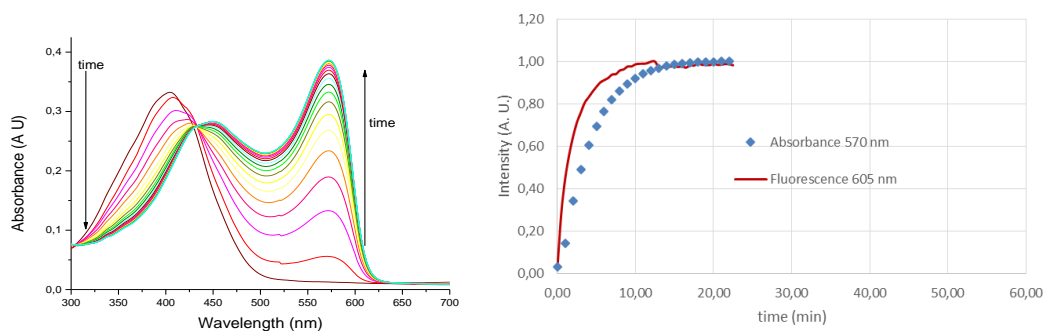


Figure III-14. Evolution de l'absorption d'une solution de **P-TCF** ($10 \mu\text{M}$) et H_2O_2 (1 mM) dans un tampon HEPES à pH 7,4 (gauche). Droite : Evolution cinétique de l'absorbance à 570 nm (carrés) et de la fluorescence à 605 nm (rouge, $\lambda_{\text{exc}} = 570 \text{ nm}$).

Cependant, la cinétique de cette réaction est accélérée avec une augmentation du pH^[112]. En effet, une expérience similaire réalisée à pH 7,4 montre une consommation totale de la sonde en un temps beaucoup plus court, alors que la concentration en peroxyde d'hydrogène est cinq fois plus faible (1 mM) : seulement cinq minutes sont nécessaires pour obtenir un signal maximal de

fluorescence (voir Figure III-14). La cinétique associée est beaucoup plus grande : $k_{P\text{-TCF}} = 9,9 \text{ s}^{-1}$. Cette valeur se situe dans la fourchette haute des valeurs relevées dans la littérature qui s'échelonnent entre 0,3 et 18 s^{-1} ^[113,114] (avec un grand nombre en dessous de 5 s^{-1}). De plus, le signal de fluorescence est multiplié par 45 ($\lambda_{\text{exc}} = 570 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 605 \text{ nm}$), ce qui démontre un grand caractère OFF/ON.

2.C. Une sondes adaptée aux explosions oxydatives

2.C.i Sensibilité et sélectivité intéressante

Pour envisager différentes applications, il est nécessaire de connaître la sensibilité de **P-TCF** à de faibles concentrations en peroxyde d'hydrogène. Après 5 minutes de réaction et toujours à pH 5, l'intensité de fluorescence mesurée en présence de différentes concentrations de H_2O_2 permet de détecter des quantités pouvant descendre jusqu'à $1 \mu\text{M}$ (voir Figure III-15). De plus, la réponse est relativement linéaire jusqu'à $20 \mu\text{M}$, permettant une calibration pour une détection totalement quantitative.

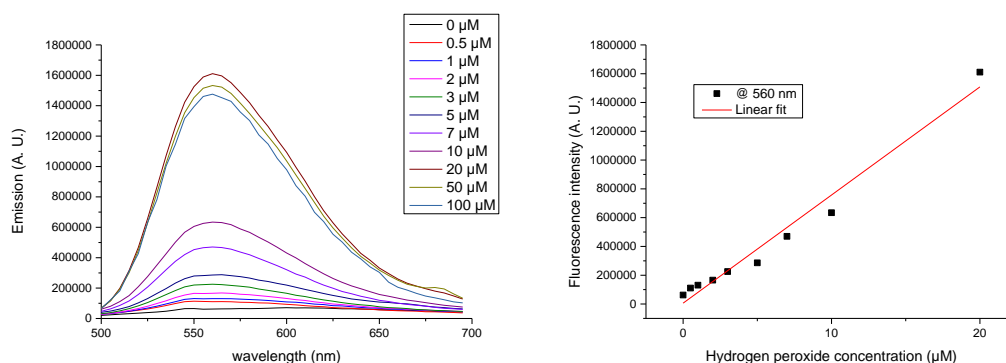


Figure III-15. Gauche : fluorescence enregistrée après 5 minutes de réaction (**P-TCF**, $10 \mu\text{M}$) avec diverses concentration de H_2O_2 ($\lambda_{\text{exc}} = 440 \text{ nm}$, tampon HEPES pH 5). Droite : l'intensité en fonction de la concentration de H_2O_2 .

A pH physiologique, la quantité détectée est sensiblement supérieure : 500 nM sont détectables après cinq minutes. Avec des temps plus long, la sensibilité est meilleure : 200 nM sont détectables après seulement dix minutes et en augmentant le temps d'attente jusqu'à une demi-heure, une concentration aussi faible que 100 nM permet d'obtenir une fluorescence mesurable (voir Figure III-16). Les explosions oxydantes sont généralement à des concentrations bien supérieures tandis que les concentrations habituellement rencontrées lors de signalisation cellulaire sont autour de la centaine de nanomolaire. Ainsi, nos sondes sont capables de détecter des conditions de stress oxydant ainsi que certaines augmentations soudaines de peroxyde d'hydrogène dues à des chemins de signalisation particuliers mais sont un peu justes pour détecter des niveaux de peroxyde d'hydrogène habituellement rencontrés dans des cellules.

III.2 : Une première sonde comme preuve de concept

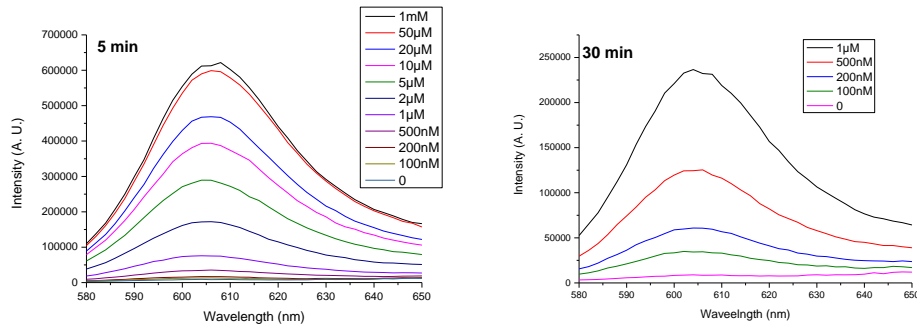


Figure III-16. Spectres d'émission de la sonde **P-TCF** (10 µM) à pH 7,4 après 5 minutes (gauche) et 30 minutes (droite) de réaction avec la quantité de peroxyde d'hydrogène indiquée dans la légende.

Une dernière condition pour être une sonde sensible au peroxyde d'hydrogène est la sélectivité vis-à-vis des autres espèces oxydantes comme l'ion hypochlorite (ClO⁻), le peroxyde de *tert*-butyle (*t*-BuOOH), ou les différents radicaux comme les radicaux hydroxyles (HO[•]), *tert*-butoxyles (*t*-BuO[•]) et superoxyde (O₂^{•-}). Pour une meilleure comparaison, nous avons fait réagir une concentration en H₂O₂ (1 mM) 5 fois plus faible que pour les autres espèces (5 mM). Ceci ne se retrouve pas en conditions physiologiques où c'est le peroxyde d'hydrogène qui est en concentration plus importante par rapport aux autres. Comme on peut le voir sur la Figure III-17, les différentes espèces oxydantes réagissent peu avec **P-TCF** : moins de 10 % de **pH-TCF** est formé pour la plupart des espèces oxydantes. Seul l'ion superoxyde présente une réactivité plus importante avec environ 25 % de conversion pendant le temps nécessaire à une réaction totale avec le peroxyde d'hydrogène. La même expérience avec une concentration de 1 mM d'ion superoxyde permet de vérifier la faible réactivité de cet ion : seulement 2 à 3 % de conversion. Notre sonde est donc bien sélective du peroxyde d'hydrogène grâce au groupement boronate.

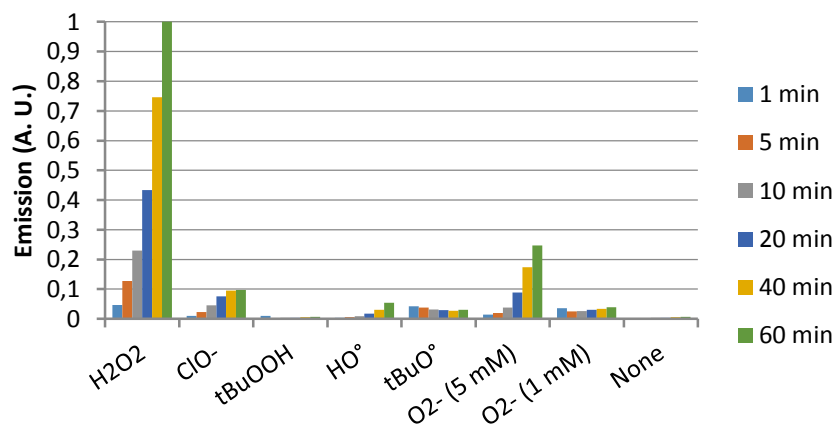


Figure III-17. Réponses de 10 µM **P-TCF** à diverses espèces oxydantes à pH 5 (H₂O₂ 1 mM, 5 mM pour les autres)

Chapitre III : Application du principe OFF/ON à la détection du peroxyde d'hydrogène

Dans cette figure apparaît aussi la stabilité de la sonde sans aucune espèce oxydante. Aucune fluorescence n'est détectée après une heure, ce qui démontre une bonne stabilité de **P-TCF**. De plus, des études d'absorbance ont aussi été menées à divers pH (pH = 5 et pH = 7,4). L'absorption ne varie pas au cours du temps (plusieurs heures), confirmant la stabilité de notre sonde à pH physiologique.

2.C.ii Une sonde pH déguisée

L'intérêt de libérer la sonde **pH-TCF** après réaction avec le peroxyde d'hydrogène est de mesurer le pH quasiment simultanément. Mais avant de faire ces mesures, nous avons voulu vérifier que la sonde réagit à trois pH différents : 6,6, 7,4 et 8,0. Comme nous l'avions déjà fait remarquer, la cinétique de la réaction diffère suivant le pH (Figure III-18). Pour conserver l'intensité la plus grande possible, la mesure s'est faite aux longueurs d'ondes du phénol à pH 6,6 et à celles du phénolate pour les deux autres pH. Les constantes mesurées valent $3,4 \text{ s}^{-1}$ à pH 6,6, $9,9 \text{ s}^{-1}$ à pH 7,4 et 17 s^{-1} à pH 8.

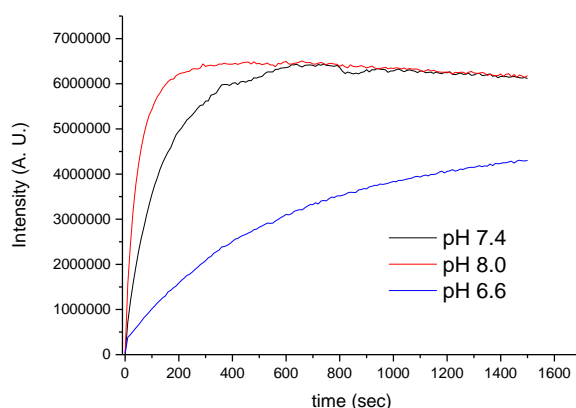


Figure III-18. Cinétique d'apparition de la fluorescence à différents pH. Conditions : **P-TCF** 10 μM , H_2O_2 1 mM. A pH 6,6, $\lambda_{\text{exc}} = 440 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 560 \text{ nm}$. Pour les deux autres pH, $\lambda_{\text{exc}} = 570 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 605 \text{ nm}$

Au cours de la réaction, l'excitation au point isobestique permet de mesurer le ratio $R_{564/614}$ comme au chapitre précédent. Quel que soit l'avancement de la réaction avec le peroxyde d'hydrogène, la mesure de pH n'est pas perturbée car la fluorescence de la sonde **P-TCF** est négligeable et le ratio mesuré ne dépend pas de la concentration de **pH-TCF**. Comme le montre la Figure III-19, au cours de la réaction, la valeur de ce ratio correspond aux mesures effectuées au chapitre précédent : 1,45 à pH 6,6, 0,42 à pH 7,4 et enfin 0,19 à pH 8,0. Il n'y a donc pas de modifications des propriétés de la sonde **pH-TCF** par la présence de peroxyde d'hydrogène. Ainsi, ces sondes peuvent permettre d'imager simultanément le peroxyde d'hydrogène présent dans la cellule et le pH.

III.3 : De l'utilité des sucres pour améliorer la cinétique

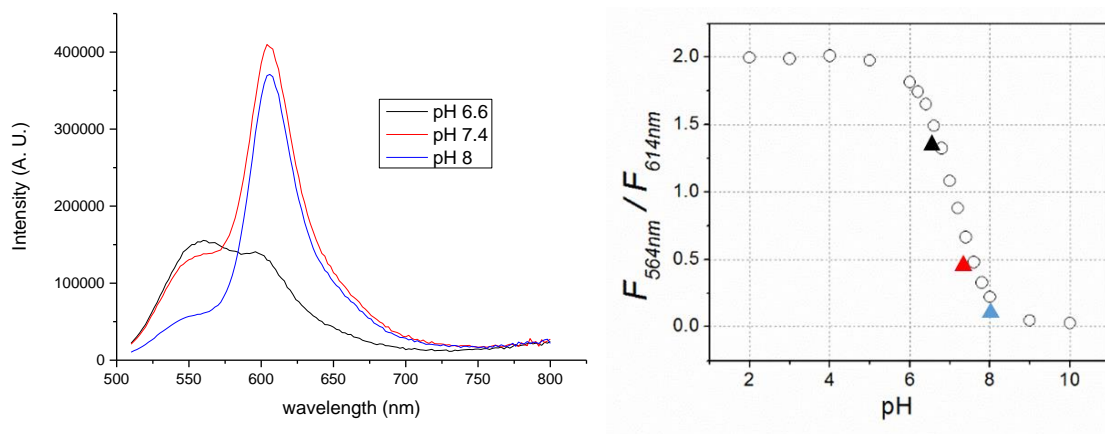


Figure III-19. Gauche : Spectres d'émission au cours de la réaction de P-TCF ($10 \mu\text{M}$, tampon HEPES, pH indiqué) avec $1 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ ($\lambda_{\text{exc}} = 500 \text{ nm}$). Droite : les triangles représentent le ratio mesuré au cours de cette réaction, les ronds sont la titration réalisée au chapitre précédent.

III.3 De l'utilité des sucres pour améliorer la cinétique

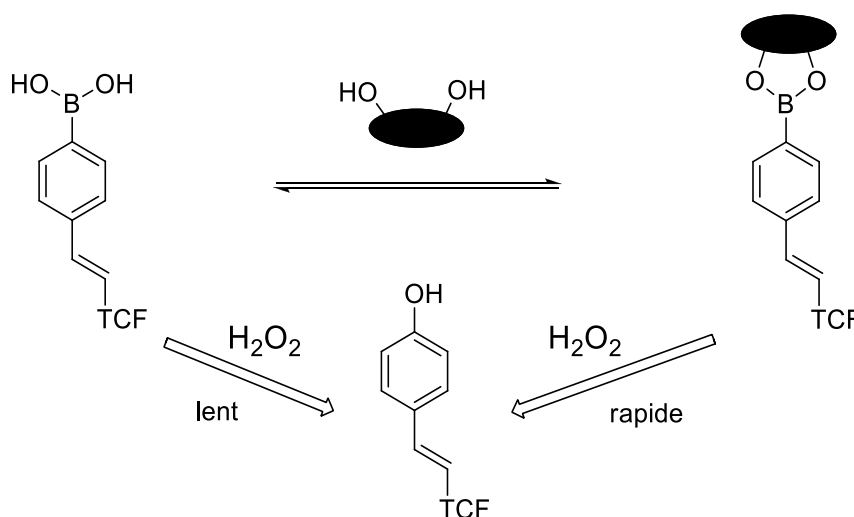


Figure III-20. Principe de fonctionnement des sondes associées à un sucre, adapté de ^[115]. III-2 est en équilibre avec l'adduit III-2-sucrose. Ce dernier réagit plus rapidement avec H_2O_2 que la forme ouverte. Le sucre est représenté sous forme d'ovale noir.

La sonde P-TCF possède de solides avantages comme une bonne sélectivité et une bonne détection de faible concentration de peroxyde d'hydrogène, mais nous avons voulu voir s'il est possible d'améliorer la cinétique de détection, en particulier pour une application biologique où le peroxyde d'hydrogène est présent en quantité beaucoup plus faible. Plutôt que travailler avec un ester pinacolboronique, nous nous sommes intéressés à l'équivalent acide boronique parce que Sun *et al.* ^[115] ont récemment montré qu'il est possible d'accélérer la cinétique de ce type de sondes à l'aide d'adduit de sucres (voir Figure III-20).

3.A. Acide boronique plutôt qu'ester pinacolique

Avant de pouvoir tester la réactivité de la sonde **P-TCF**, il faut déprotéger l'ester boronique pour former la fonction acide boronique. Ce sont les deux groupes hydroxyles libérés qui peuvent ensuite se complexer aux différents sucres comme le montre la Figure III-21. La déprotection est une coupure oxydante réalisée par IO_4^- en milieu acide. Celle-ci permet d'obtenir la sonde **III-2** avec de bons rendements (au-dessus de 80 %).

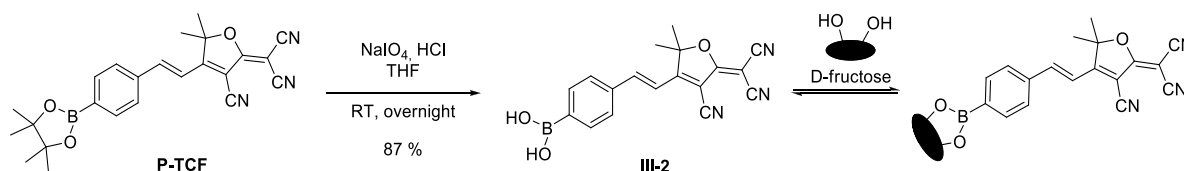


Figure III-21. Synthèse de la sonde acide boronique **III-2** pouvant se complexer aux sucres. Ici le D-fructose est représenté par un ovale noir.

Plutôt que synthétiser les esters couplés aux différents sucres, nous avons choisi de réaliser la formation d'adduit *in situ* pendant les dosages en se plaçant en très large excès de sucre par rapport à la sonde (environ 1 pour 100).

L'absorption de la sonde **III-2** toute seule est très proche de **P-TCF**, avec un petit décalage hypsochrome de 5 nm. Cependant, à pH physiologique, un petit épaulement apparaît à des longueurs d'ondes plus grandes (autour de 570 nm). Il s'agit certainement de l'absorption d'une forme anionique avec un troisième groupement hydroxyle greffé sur le bore. C'est cette forme qui prédomine en milieu plus basique.

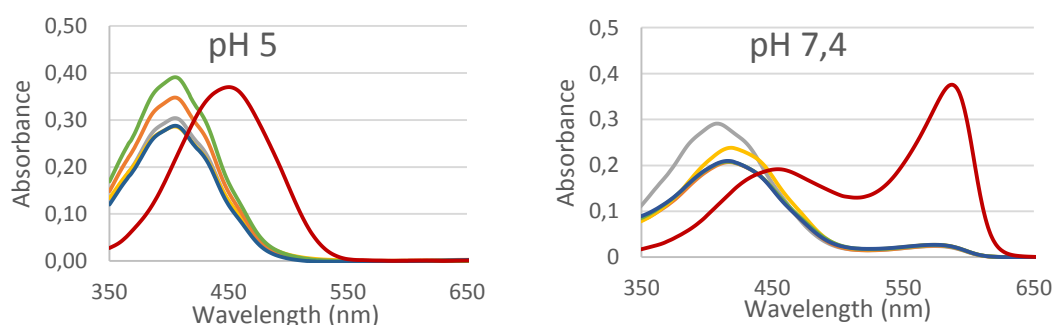


Figure III-22. Spectres d'absorptions des sondes ($10 \mu\text{M}$, tampon HEPES) **III-2** (gris), **III-2** en présence de mannose (orange), fructose (jaune), glucose (vert), galactose (bleu) et **P-TCF** (rouge) à pH 5 (gauche) et 7,4 (droite)

Suivant la stéréochimie des sucres, la complexation entraîne des variations d'absorption de la sonde **III-2**. En milieu acide, la présence du glucose et du mannose entraîne une légère augmentation de l'absorbance (voir Figure III-22). Les deux autres sucres, eux, ne présentent pas de variations de

celle-ci. A pH physiologique, au contraire, tous les sucres sont accompagnés d'une diminution de l'absorbance d'environ 0,1 unité, même si elle est un peu moins marquée pour le fructose. L'épaule à 570 nm est toujours présente. L'absorption est cependant très différente de celle de **pH-TCF** due à la déprotonation du phénol.

3.B. Une meilleure cinétique au détriment du caractère OFF/ON

La déprotection de l'ester pinacolboronique s'accompagne, malheureusement, d'une augmentation de la fluorescence. Celle-ci est encore plus marquée lors de la complexation avec les sucres. En effet, la présence d'un adduit avec le sucre renforce l'électrophilie du bore car le pKa est abaissé par rapport à un acide boronique ou un ester pinacolique^[116]. Le bore capte alors un troisième oxygène sous forme hydroxyle comme expliqué plus haut. Cet anion permet alors de retrouver un caractère dipolaire qui, même s'il est peu marqué, restaure une partie de la fluorescence (voir Figure III-23). A pH physiologique, même dans le cas le plus favorable, i.e. avec une excitation très décalée vers le rouge (500 nm ou 570 nm), les sondes sont un petit peu fluorescentes (voir Figure III-24).

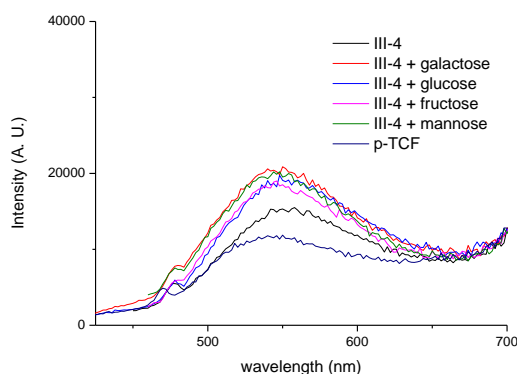


Figure III-23. Spectres d'émission de fluorescence à pH acide (tampon HEPES, pH 5) des sondes **P-TCF** et **III-2** (10 µM) en présence de différents sucres (10 mM), $\lambda_{exc} = 440$ nm.

Cette fluorescence diminue le caractère OFF/ON de la molécule puisque, à pH 5, on passe d'un ratio d'intensité autour de 30 pour **P-TCF** à une valeur plus faible, de 6 à 8, suivant le sucre (Tableau III-2) pour les sondes basées sur le diacide. De même, à pH physiologique, le ratio passe de 130 à environ 40 pour les différentes sondes. Ce désagrément est cependant compensé par une cinétique hautement améliorée à pH acide. La sonde **III-2** réagit à peu près cinq fois plus vite que **P-TCF**. En effet, en conditions de pseudo 1^{er} ordre cinétique, le temps de demi-réaction de **III-2** est quasiment le même avec une concentration cinq fois inférieure (510 s contre 480 s). Le calcul par régression linéaire de la constante cinétique donne $k_{app} = 1,4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ pour $[\text{H}_2\text{O}_2] = 1 \text{ mM}$ soit $k_{III-2} = 1,4 \text{ s}^{-1}$.

Chapitre III : Application du principe OFF/ON à la détection du peroxyde d'hydrogène

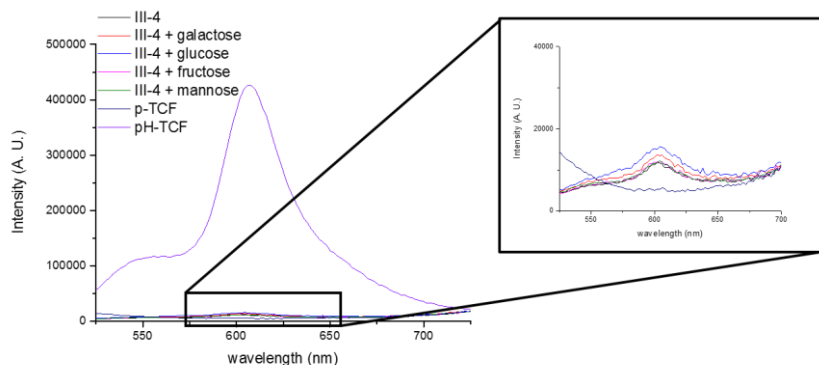


Figure III-24. Spectres d'émission à pH 7,4 des composés **P-TCF**, **pH-TCF** et **III-2** (10 µM) en présence de sucres. $\lambda_{exc} = 500$ nm, longueur d'onde du point isobestique permettant une mesure du pH. Encart : zoom sur les sondes non fluorescentes.

Sonde	pH 5			pH 7,4		
	Temps de demi-réaction (s)	constante apparente k ($10^{-3} s^{-1}$)	Turn ON	Temps de demi-réaction (s)	constante apparente k ($10^{-3} s^{-1}$)	Turn ON
P-TCF	480 (5mM)	0,34	30	70	9,9	130
III-2	510	1,4	8	60	11	40
III-2 + fructose	90	7,7	7	60	11	37
III-2 + galactose	240	2,9	6	170	4,1	33
III-2 + mannose	490	1,5	8	110	6,3	37
III-2 + glucose	360	1,9	7	120	5,8	30

Tableau III-2. Caractéristiques cinétiques et turn-on des différentes sondes présentées dans ce chapitre. L'abandon de groupement pinacolborane, remplacé par un adduit avec un sucre se fait au détriment de l'augmentation de fluorescence mais se fait de manière bien plus rapide. Les mesures ont été faites avec 1mM de H_2O_2 à PH 5 et 100 µM de H_2O_2 à pH 7,4.

L'ajout d'un sucre permet une réaction encore plus rapide (Figure III-25) : par rapport à **III-2**, les constantes apparentes sont multipliées par deux pour le galactose et par cinq pour le fructose (Tableau III-2). Avec ce dernier, la réaction est complète après seulement huit minutes. La cinétique est environ vingt fois plus rapide par rapport à la sonde **P-TCF** ($k_{app} = 7,7 \times 10^{-3} s^{-1}$). Grâce au sucre, le bore est plus électrophile et plus facilement oxydé par H_2O_2 ce qui accélère la cinétique de la réaction.

III.3 : De l'utilité des sucres pour améliorer la cinétique

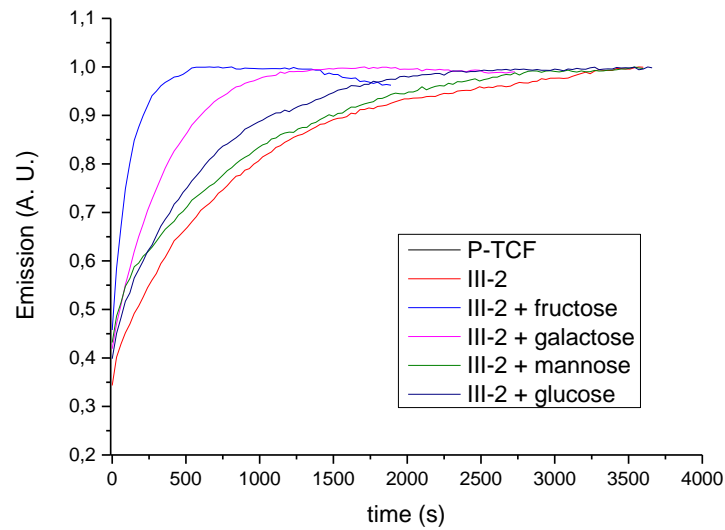


Figure III-25. Cinétique de réaction des différentes sondes (10 μM , tampon HEPES, pH 5) en présence de sucre (100 mM) lorsque indiqué. La concentration en peroxyde d'hydrogène est 1 mM sauf pour **P-TCF** (5 mM). ($\lambda_{\text{exc}} = 440 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 570 \text{ nm}$).

Cependant, la même expérience à pH physiologique amène des résultats contradictoires (voir Figure III-26) : la sonde **III-2** n'accélère pas la cinétique par rapport à **P-TCF** avec des temps de demi-réaction extrêmement similaires (60 et 70 secondes). La présence du fructose ne modifie pas non plus cette cinétique (contrairement au pH acide où elle est accélérée). Par contre les autres sucres entraînent un ralentissement de la réaction avec des constantes situées autour de $5,10^{-3} \text{ s}^{-1}$ et deux fois inférieures à **P-TCF** (voir Tableau III-2). Dans tous les cas, la cinétique est accélérée à pH physiologique par rapport au pH neutre mais cette accélération est bien moindre en présence de sucre.

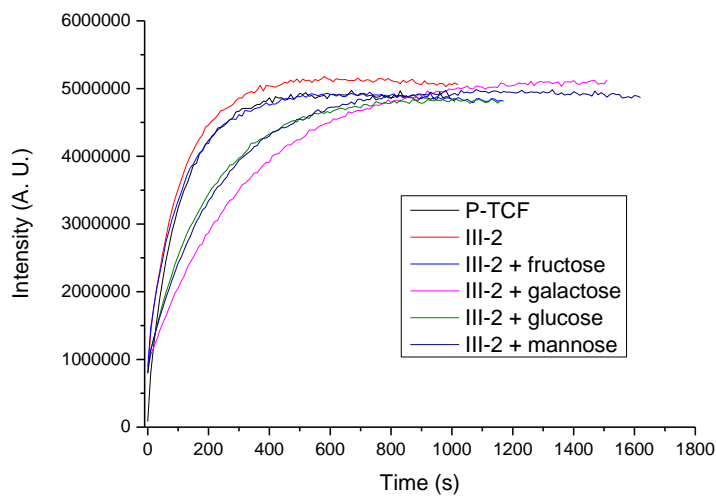


Figure III-26. Cinétique de réaction des différentes sondes (10 μM) à pH neutre (tampon HEPES, pH 7,4) en présence de sucre (100 mM) lorsque indiqué. La concentration en peroxyde d'hydrogène est 1 mM ($\lambda_{\text{exc}} = 570 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 605 \text{ nm}$).

Chapitre III : Application du principe OFF/ON à la détection du peroxyde d'hydrogène

L'absorption des composés présentée précédemment donne une première indication sur les cinétiques : en milieu acide, le glucose et le mannose sont les sucres qui font varier le plus l'absorption, ce sont aussi les sucres associés aux cinétiques les plus lentes. En milieu neutre, le fructose est le sucre qui modifie le moins l'absorption, c'est aussi celui qui ne modifie pas la cinétique.

Enfin, comme ces sondes sont vouées à servir de sondes pH en parallèle, nous avons voulu vérifier la fluctuation de cette mesure en utilisant **III-2** et avec la présence de sucre. Les résultats nous ont rassurés avec un ratio qui n'est quasiment pas modifié (voir Figure III-27) et est situé entre 0,45 et 0,5, ce qui correspond aux mesures réalisées au chapitre précédent.

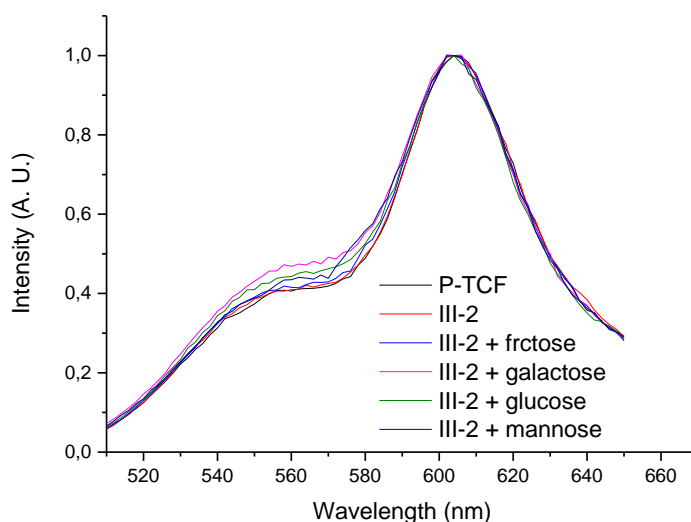


Figure III-27. Spectres d'émission normalisés au cours de la réaction des différentes sondes avec H_2O_2 dans un tampon HEPES à pH 7,4, $\lambda_{exc} = 500$ nm.

III.4 Conclusions

Dans ce chapitre, nous nous étions proposé de synthétiser des sondes non fluorescentes activables par la présence de peroxyde d'hydrogène. La sonde **P-TCF** synthétisée présente un groupement pinacolboronate introduit par couplage de Miyaura. Ce groupement est neutre électroniquement parlant et rompt ainsi le caractère dipolaire de la molécule, ce qui éteint la fluorescence. La réaction sélective avec le peroxyde d'hydrogène permet la réapparition de la fluorescence en reformant la sonde **pH-TCF** du chapitre 2.

La présence de ce groupement offre des propriétés très intéressantes : outre son caractère OFF/ON très marqué avec une multiplication du signal par 130 en milieu physiologique, la sonde **P-TCF** est très sélective vis-à-vis des autres espèces oxydantes présentes dans l'organisme. De plus, elle est relativement stable et peut détecter des concentrations relativement faibles de peroxyde

d'hydrogène : jusqu'à la centaine de nanomolaires. Ces caractéristiques en font des sondes très prometteuses pour mesurer des niveaux de stress oxydant. La réapparition de la sonde **pH-TCF** permet, en outre, de mesurer en parallèle le pH du milieu environnant. Ceci fait de notre sonde **P-TCF** une sonde bifonctionnelle permettant une imagerie de l'organisme uniquement aux endroits soumis au stress oxydant, tout en mesurant simultanément le pH.

L'utilisation de sucre était une tentative pour améliorer la cinétique. En milieu acide, celle-ci est effectuée avec une multiplication par cinq à dix de la constante mais se fait au détriment du caractère OFF/ON car la présence d'un complexe bore-sucre recrée une partie de l'architecture dipolaire et réactive une partie de la fluorescence. A pH neutre, cependant, la sonde **P-TCF** présente la meilleure cinétique lorsqu'on compare avec les sucres. Conjugué au fait que **P-TCF** est moins fluorescente que **III-2**, l'utilisation de sucre est bien moins intéressante à pH physiologique.

Ces différentes sondes ont été utilisées dans des cuves de fluorescence, conditions bien éloignées de tests cellulaires. Il reste donc à effectuer des mesures in-vitro pour vérifier la solidité des résultats préliminaires. Une perspective intéressante est la possibilité de localiser nos sondes à l'aide de groupements ciblant certains organites tels que les mitochondries. Ces dernières sont connues pour être le siège de la formation d'une grande partie du peroxyde d'hydrogène. Une sonde dérivée de **Mito-pH-TCF** serait, de ce point de vue, extrêmement intéressante

Chapitre IV A la recherche d'un émetteur à l'état solide optimisé dans le rouge

Au cours de la synthèse des composés présentés aux chapitres précédents, nous nous sommes aperçus que certains d'entre eux présentent, sous forme de poudre, une fluorescence à l'état solide. Très intéressés par ce phénomène, nous avons étudié ces propriétés et créé de nouveaux fluorophores basés sur le groupement **TCF**. En variant le nombre et la position de simple groupements méthoxys ou avec d'autres groupements électro-donneurs, il est possible de profondément modifier les propriétés d'émission. Pour mieux comprendre ces effets, une étude de la structure à l'état cristallin a aussi été menée pour mettre en évidence l'importance des interactions intermoléculaires.

IV.1 La fluorescence à l'état solide dans la littérature

La fluorescence à l'état solide est une propriété plus rare que la fluorescence en solution. Par exemple, lorsqu'on augmente la concentration d'une solution, l'émission est souvent atténuée voire complètement éteinte. Une des principales causes à ce phénomène est la formation d'agrégats, d'où le nom associé à ce phénomène : « Aggregation-caused quenching » (ACQ)^[117]. Un exemple est montré dans la Figure IV-1, issue d'une revue écrite par Chen^[118] : Des fluorophores tels que le Nile Red (gauche), le 4-(dicyanométhylène)-2-2-méthyl-6-[4-(diméthylaminostyryl)-4H-pyrane] (**DCM**, centre) et la tétraphényl-porphyrine (**TPP**, droite) présentent une émission intense en solution car leur structure composée de nombreux noyaux aromatiques plans ne permet pas de désexcitation par rotation ou vibration. Cependant, à l'état solide, les molécules forment des agrégats avec des interactions dipôle-dipôle intermoléculaires très fortes ou du π -stacking. Au contraire d'un milieu dilué où le principal processus de désexcitation est radiatif, ces interactions permettent une importante désexcitation non radiative qui diminue l'intensité émise.

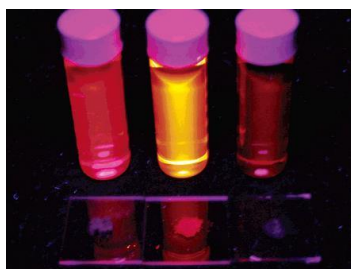


Figure IV-1. Photographie sous lampe UV du Nile Red (gauche), du **DCM** (centre), et **TPP** (droite) en solution et à l'état solide. Tiré de ^[118]

Les fluorophores émettant dans le rouge sont encore plus rares. L'explication tient à un point structural : pour décaler une absorption et une émission vers le rouge, il faut diminuer l'écart énergétique entre la HOMO et la LUMO. La meilleure approche est habituellement d'étendre la conjugaison à l'aide de polycycles entièrement conjugués. Ces composés totalement plans ont encore plus tendance à s'agréger et donc sont plus favorables à une désexcitation non radiative. Les dérivés de porphyrines ou de macrocycles, par exemple, sont non fluorescents à l'état solide. Une autre solution est de renforcer le caractère dipolaire de la molécule en greffant des extrémités acceptrices ou donneuses d'électron. Mais qui dit augmentation du caractère dipolaire dit augmentation des interactions dipôle-dipôle et donc augmentation des processus non radiatifs et baisse du rendement quantique de fluorescence Φ_f .

Malgré ces contraintes, les chimistes ont rivalisé d'inventivité pour synthétiser des chromophores fluorescents à l'état solide. Un rapide tour d'horizon permet de voir que des approches très diverses et différentes ont été tentées : les « quantum dots » sont ainsi un exemple totalement inorganique^[119] tandis que de nombreux complexes métalliques ont aussi permis des émissions intenses au-delà de 600 nm^[120]. Cependant, de nombreux fluorophores organiques existent aussi comme nous allons le voir dans les prochaines pages.

1.A. Comment améliorer l'émission à l'état solide ?

Comme expliqué précédemment, les interactions intermoléculaires sont les principaux obstacles à la fluorescence à l'état solide. Une première idée est donc de les supprimer ou au moins de les diminuer, car si le seul processus de désexcitation possible est radiatif, la fluorescence est rétablie. Or ces interactions diminuent avec la distance. Un éloignement des molécules les unes des autres pourrait donc être un moyen de rétablir la fluorescence. Cette approche a été utilisée avec de nombreux polymères chargés de fluorophores. Ceux-ci illustrent parfaitement le problème de la distance entre chaque fluorophore : l'intensité émise augmente avec la concentration en fluorophore jusqu'à une valeur maximale correspondant à la charge optimale en fluorophore. A plus haute concentration en fluorophore, l'intensité diminue à cause des interactions entre les fluorophores. En effet, la distance moyenne entre les fluorophores est alors inférieure à la distance nécessaire pour une désexcitation intermoléculaire.

1.A.i Eloignement et groupements encombrants

Une approche moléculaire (sans utilisation de polymère) pour éloigner les fluorophores les uns des autres peut être réalisée à l'aide de groupements encombrants greffés sur le cœur émissif. On peut citer ici l'utilisation de groupement *tert*-butyle sur des BODIPY^[121]. Synthétisée par Ozdemir *et al*,

la BODIPY présentée ci-dessous présente une fluorescence à l'état solide avec une émission à 610 nm tandis que son équivalent avec des hydrogènes n'est pas fluorescent dans les mêmes conditions. La validité de cette approche est aussi vérifiée avec la structure cristallographique : la distance entre les plans contenant deux motifs BODIPY passe de 3,51 Å à 14,3 Å. Cet élargissement permet de diminuer très fortement les désexcitations non radiatives intermoléculaires.

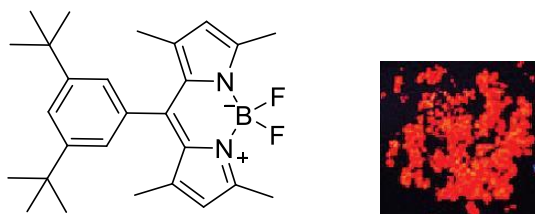


Figure IV-2. Structure d'une BODIPY émettant à l'état solide grâce à la substitution de groupements encombrants. Image tirée de^[121]

L'exemple de cette BODIPY montre combien la restriction des rotations intramoléculaires est bénéfique pour la fluorescence. La complexation avec un atome de bore permet ainsi de rigidifier des structures par la fermeture d'un cycle chélate. On peut ainsi citer les travaux de l'équipe de Guan : à l'aide de cycles phénantroimidazoles quinolines^[122], ils ont obtenu des complexes fluorescents à l'état solide qui émettent au-delà de 600 nm : 18 % à 622 nm pour **PQBD1** (voir Figure IV-3) sans utiliser de groupement encombrant.

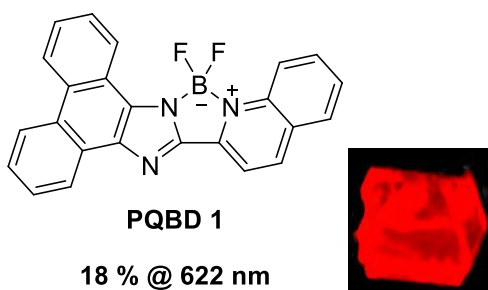


Figure IV-3. Structure de **PQBD1**, fluorophore porteur d'un complexe de bore émettant à l'état solide dans le rouge avec, à droite, une photo du cristal sous lampe UV^[122].

Il est même possible d'étendre la conjugaison pour se déplacer vers de plus grandes longueurs d'onde. : avec un cœur 2,5-di(benzo[d]thiazol-2-yl)benzene-1,4-diol, **BTB 1**^[123] contient deux atomes de bore et sept cycles fusionnés et conjugués. Pour prévenir un empilement relativement compact des molécules, les auteurs ont utilisé du diphenylborane à la place du difluoroborane. Ces groupements permettent d'éviter des interactions π - π comme le montre la structure cristallographique avec une distance entre deux molécules supérieure à 6 Å (Figure IV-4). L'émission de **BTB-1** est donc très intense ($\Phi_f = 41\%$) avec un maximum à 670 nm.

Chapitre IV : A la recherche d'un émetteur à l'état solide optimisé dans le rouge

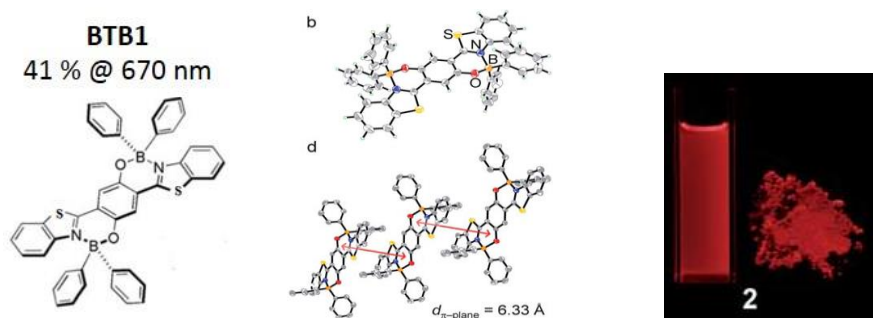


Figure IV-4. Gauche : Structure de complexe de dibore synthétisé par Li et al. Centre : structure cristallographique. Droite : photographie d'une solution dans le dichlorométhane et de la poudre sous lampe UV. Adapté de ^[123]

Le groupe de Frédéric Fages a aussi eu l'idée d'utiliser des atomes de bore pour complexer des chalcones tel qu'on peut le voir dans la Figure IV-5. Lorsque celles-ci sont substituées par des groupes donneurs, on obtient des fluorophores très efficaces. Le résultat est une intense émission à l'état solide dans le rouge lointain. En étendant la conjugaison avec des groupements naphthyles ou pyrènes, il est possible d'obtenir des émissions à 722 nm et 755 nm pour des rendements quantiques de fluorescence de respectivement 20 % et 16%.

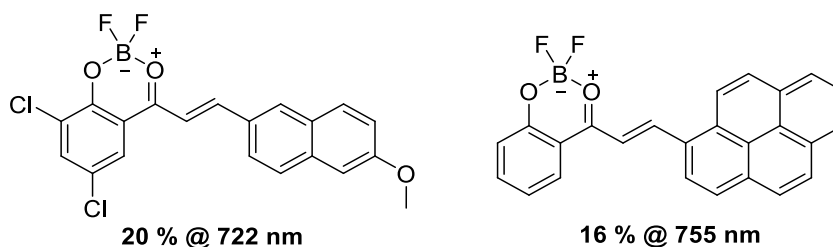


Figure IV-5. Exemples de chalcones présentant des propriétés d'émission à l'état solide dans le proche infra-rouge.

1.A.ii Phénomènes d'agrégation



Figure IV-6. L'Hexaphénylsilole (HPS) est un parfait exemple de molécule présentant une AIE comme on peut le voir à droite avec une apparition de la fluorescence en augmentant la proportion d'eau.

Plutôt que lutter contre l'agrégation des molécules en phase solide en les éloignant ou en les encombrant, l'équipe du Pr. Ben Zhong Tang a eu l'idée de profiter de ce phénomène avec des dérivés

siloles^[124,125] tels que le hexaphénylsilole (**HPS**, voir Figure IV-6). Ceux-ci sont non fluorescents en solution mais deviennent hautement émissifs une fois agrégés dans une suspension. L'apparition de la fluorescence semble due à la formation d'agrégats dans le milieu, ce qui a conduit cette équipe à nommer ce phénomène « Aggregation-induced emission » (AIE).

1.A.iii Explications Physiques

De par son encombrement, la molécule de **HPS** n'est pas plane. Les six groupements phényles peuvent effectuer des rotations intramoléculaires autour de la liaison avec le silole. Ces nombreuses rotations sont autant de moyens de désexcitation non-radiatifs qui diminuent la fluorescence en solution. Au contraire, sous forme d'agrégats, la rotation est bloquée à cause de contraintes physiques et l'encombrement stérique des groupements oblige la molécule à adopter une structure en hélice qui empêche toute interaction de type π - π . Les processus de désexcitation non-radiatifs sont limités, ouvrant la voie à une fluorescence intense comme le résume la Figure IV-7, tiré d'une revue écrite par la même équipe^[126].

Ce phénomène de restriction de rotation intramoléculaire (RIR en anglais) semble être un des principaux facteurs responsables de l'effet AIE car des expériences d'augmentation de viscosité, de diminution de température ou d'augmentation de pression permettent d'augmenter l'intensité de fluorescence^[127]. Or de telles expériences sont connues pour défavoriser la RIR sur les échantillons. La géométrie prend ainsi le pas sur les effets électroniques. Tang et son groupe ainsi que de nombreux autres laboratoires ont alors cherché à diversifier les longueurs d'onde d'émission sur de telles architectures, avec d'autres hétéroatomes, des structures polyphényléniques ou avec des groupements polaires pour se rapprocher de structures de type donneur-accepteur.

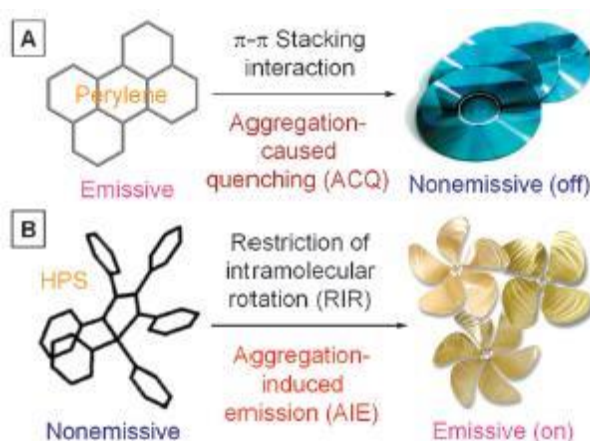


Figure IV-7. (A) Les Fluorophores plans ont tendance à s'agréger en piles à cause de fortes interaction π - π entre les noyaux aromatiques, ce qui tend à éteindre la fluorescence. (B) Les molécules non planes comme le **HPS** ont un comportement opposé : la restriction de rotation intramoléculaire (RIR) des groupements phényles à l'état solide permet d'allumer la fluorescence.

1.A.iv Du quenching vers l'AIE

Pour définir l'efficacité du processus d'AIE, il existe un facteur α qui permet de quantifier le changement d'intensité de fluorescence entre la solution et l'agrégation (ou l'état solide) et défini comme suit^[128] :

$$\alpha_{AIE} = \frac{\Phi_{F,agrégat}}{\Phi_{F,solution}}$$

où Φ correspond au rendement quantique de fluorescence des différents états : solide ou agrégat au numérateur et solution au dénominateur. Lorsque $\alpha < 1$, on parle alors de phénomène ACQ tandis que quand $\alpha > 1$, on est en présence d'AIE.

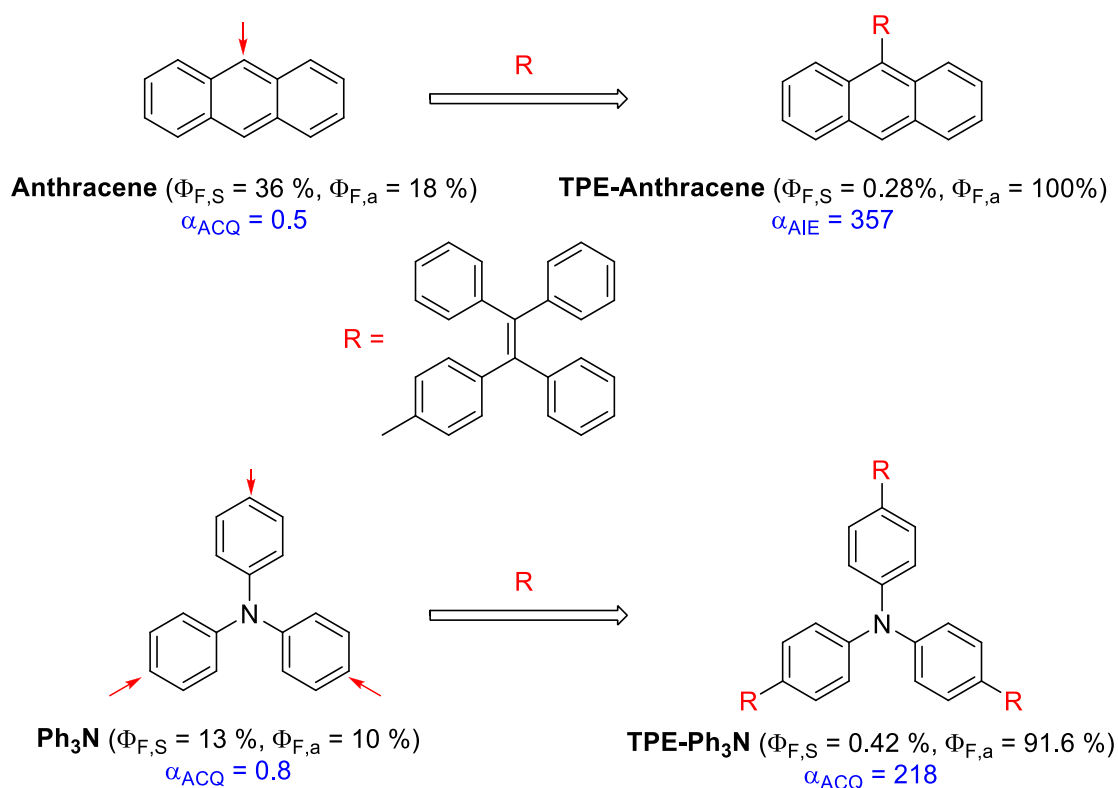


Figure IV-8. Une stratégie proposée pour résoudre les problèmes d'ACQ est la conjugaison avec un motif TPE pour permettre la fluorescence à l'état solide des fluorophores. Ceci a été testé avec l'antracène et la triphénylamine. tiré de ^[126]

Il est d'ailleurs possible de transformer certains fluorophores pour qu'ils ne soient plus soumis au phénomène d'ACQ. On se sert pour cela de molécule dite « AIE-active » comme le tétraphényléthène (TPE, voir Figure IV-8). Cette molécule présente le même type de géométrie que HPS avec quatre rotors sous forme de phényles autour d'un noyau éthylénique. Son principal intérêt est de pouvoir être greffé sur le fluorophore cible pour créer un comportement favorable à l'AIE grâce à sa structure en hélice. De plus, comme il est conjugué électroniquement au fluorophore, sa

fluorescence intrinsèque disparaît. La Figure IV-8 montre des exemples avec un anthracène ou une triphénylamine : l'agrégation est alors un phénomène qui permet une augmentation de la fluorescence avec des facteurs α très importants, au-delà de deux cent.

Cette compréhension des phénomènes AIE a permis de développer diverses applications pour des sondes de détection, en particulier en imagerie biologique. Ces exemples seront présentés dans le prochain chapitre.

1.B. Quelques exemples de fluorophores émettant dans le rouge

En utilisant les phénomènes d'AIE, les groupements encombrants ou les structures polaires, de nombreux fluorophores à l'état solide et émettant dans le rouge et le rouge lointain ont été synthétisés. Les pages suivantes présentent un petit tour d'horizon de telles molécules.

1.B.i Effet ESIPT

Une première famille connue pour ses propriétés d'émission à l'état solide est gouvernée par le phénomène appelé ESIPT (Excited State Intramolecular Proton Transfer). Il s'agit, comme le montre la Figure IV-9, d'un transfert de proton à l'état excité, ici entre un phénol et une imine pour donner une énone et une amine. Le changement de géométrie qui en résulte permet un abaissement en énergie de la forme énone excitée et amène ainsi un large déplacement de Stokes lorsque celle-ci se désexcite par fluorescence.

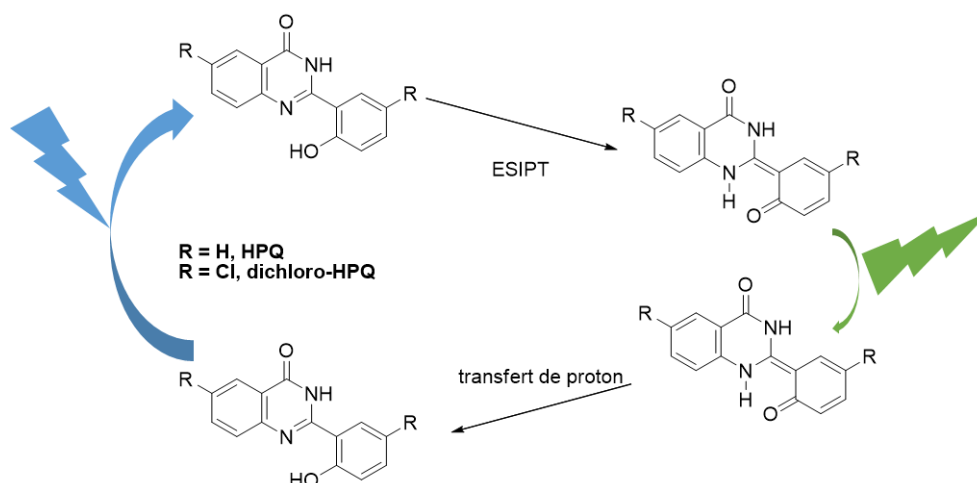


Figure IV-9. Principe de l'ESIPT appliqué à la structure de la HPQ ou de la dichloroHPQ.

Le mécanisme est ici montré avec des molécules appartenant à la famille appelée **HPQ** (pour 2-(2'-hydroxyphényl)-4(3H)-quinazolinone), qui ont été les premières synthétisées sur ce principe^[129]. Cependant leur émission est située dans le vert (520 nm) et il a fallu attendre de nombreuses années

Chapitre IV : A la recherche d'un émetteur à l'état solide optimisé dans le rouge

avant d'atteindre des longueurs d'onde situées au-delà de 600 nm. Les deux exemples présentés dans la Figure IV-10 sont les seuls à ce jour présentant une fluorescence non négligeable à de telles longueurs d'onde. Synthétisées par, respectivement, Lins *et al.*^[130] (gauche) et Sakai *et al.*^[131] (droite), elles présentent des maxima d'émission au-delà de 630 nm avec des intensités non négligeables (mais non mesurée pour la première, et $\Phi_f = 32\%$ pour la 2^{nde}).

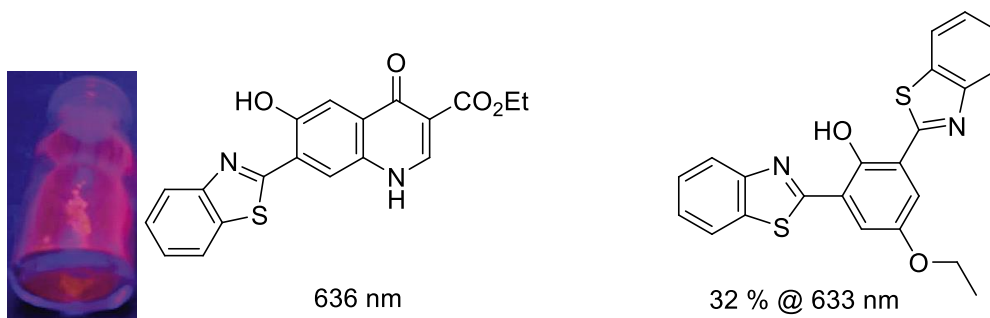


Figure IV-10. Structures des fluorophores ESIPT synthétisés par Lins *et al.*^[130] et Sakai *et al.*^[131] permettant une fluorescence à l'état solide dans le rouge.

1.B.ii Structure polaire

L'utilisation d'architectures dipolaires est extrêmement répandue, avec de nombreuses tentatives d'ingénierie moléculaire pour décaler les propriétés spectroscopiques vers le rouge. En général, plus le caractère dipolaire est fort, plus la fluorescence présente un décalage bathochrome comme l'ont montré Zeng *et al.*^[132] ou Ishow *et al.*^[133] (voir Figure IV-11) : d'une substitution par un simple hydrogène à un groupement malononitrile en passant par des groupements nitriles ou aldéhyde, on observe un décalage des longueurs d'onde d'émissions de bleu vers le rouge.

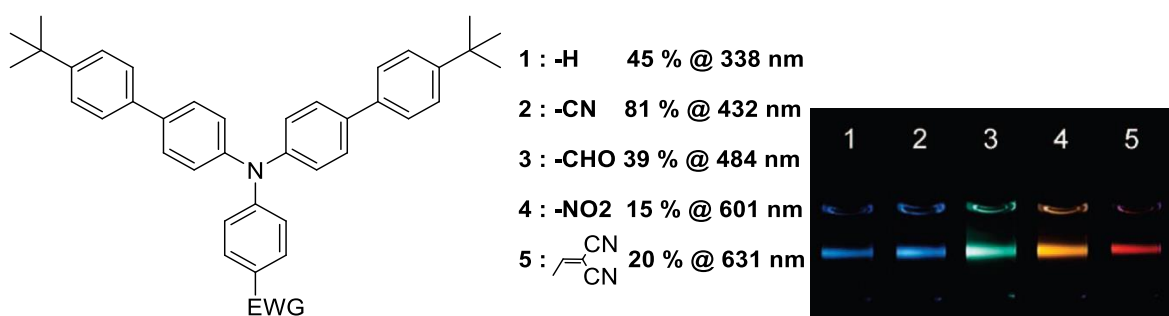


Figure IV-11. Exemple d'ingénierie moléculaire par Ishow *et al.* pour décaler les propriétés spectroscopiques vers le rouge. Adapté de ^[133].

Pour améliorer ce caractère dipolaire, un grand effort a été réalisé pour synthétiser de nouvelles têtes fortement électroacceptrices. Celles-ci peuvent ensuite être greffées et conjuguées à un groupement donneur : en plus des substituants dicyanoisophorones, diverses équipes se sont

intéressées aux groupements dicyanopyranes (**DCM1**)^[118], déjà apparus dans la Figure IV-1, aux groupements dicyanoquinolines (**ED**)^[134], cyanoacétophénone (**AnV7**)^[135] et indoles plus ou moins substitués par des malononitriles (**AnV8**, **AnV9**, **AnV10**)^[135]. Avec les exemples présentés Figure IV-12, il est possible d'augmenter les longueurs d'ondes d'émission avec des groupements de plus en plus électro-accepteurs (voir Tableau IV-1). A titre de comparaison, l'équivalent **NMe₂-TCF** (avec un groupement **TCF** comme tête acceptrice) n'est pas fluorescent sous forme solide.

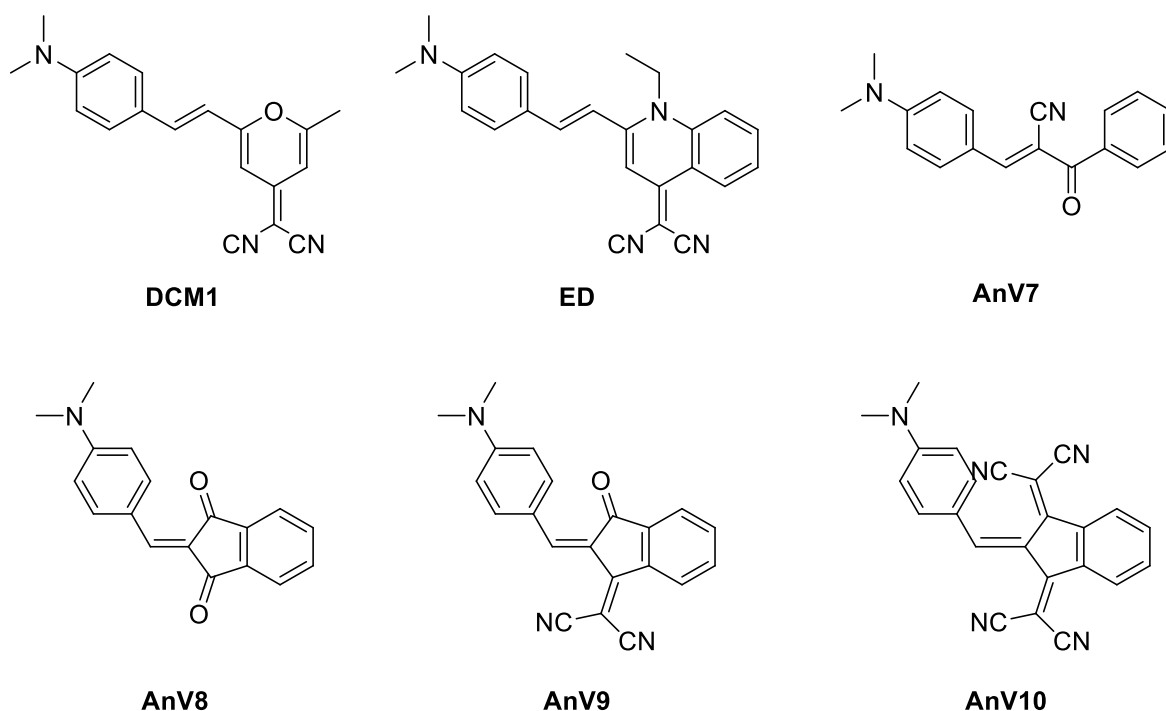


Figure IV-12. Quelques exemples de têtes électro-acceptrices permettant une fluorescence à l'état solide dans le rouge. Les propriétés spectroscopiques sont résumées dans le tableau suivant.

Produit	Absorbance (nm)	Emission (nm)	QY (%)
AnV7 ^[135]	465	601	36
ED ^[134]	n.c. ^a	605	5,2
DCM1 ^[118]	n.c. ^a	650	0,5 ^b
AnV8	502	670	9,3
AnV9	566	715	12,3
AnV10	632	715	6,2

Tableau IV-1. Propriétés spectroscopiques à l'état solide de diméthylanillines conjuguées à différentes têtes électroacceptrices. ^a non communiqué dans la référence. ^b mesuré sur film

Plutôt que de jouer sur ces groupements donneurs ou accepteurs, il est possible de modifier le pont π -conjugué. C'est la stratégie employée par Chiang *et al.*^[136] avec l'utilisation de spirofluorènes.

Chapitre IV : A la recherche d'un émetteur à l'état solide optimisé dans le rouge

L'exemple de **PhSPDCV** montre l'apport de ce groupement pour espacer les molécules et diminuer les interactions intermoléculaires avec un rendement quantique de 33 % à 644 nm (voir Figure IV-13).

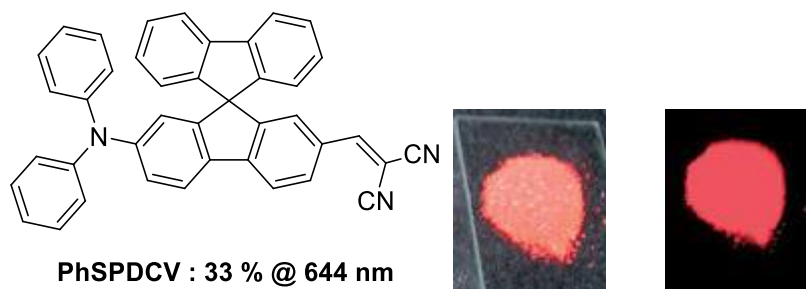


Figure IV-13. Exemple de pont fluorényle sur une architecture dipolaire. Photographie de la poudre de PhSPDCV sous lumière blanche (centre) et sous UV (droite). Image tiré de ^[136]

1.B.iii Structure quadrupolaire

Dans le but d'améliorer les rendements quantiques, la structure dipolaire est souvent transformée en structure quadrupolaire. Une architecture de type D-A-D ou inversement A-D-A permet de diminuer les interactions intermoléculaires car les dipôles vont interagir préférentiellement de manière intramoléculaire et donc diminuer les interactions intermoléculaires. Ainsi, la molécule **PhSPFN** (Figure IV-14), synthétisée par Lee *et al.*^[137] peut être vue comme un dimère de **PhSPDCV** présenté précédemment. Les propriétés sont très déplacées vers le rouge avec une émission à 686 nm et un rendement quantique de 34 %. En substituant les phényles par des fluors, on peut augmenter l'intensité au prix d'un décalage hypochrome d'une quarantaine de nanomètres (46 % à 646 nm).

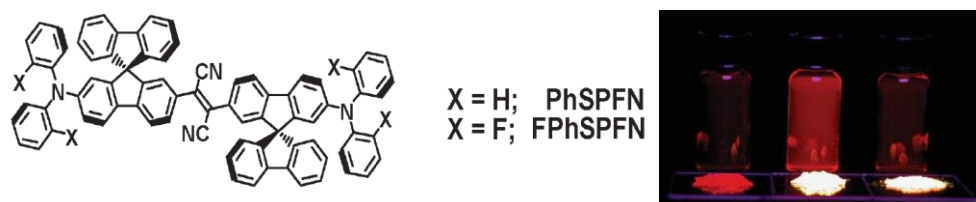


Figure IV-14. Structure des fluorophores **PhSPFN** ou **FPhSPFN**. A droite, image de fluorescence de **PhSPFN** (gauche), **FPhSPFN** (centre) et **PhSPDCV** (droite) en solution (CH_2Cl_2) et à l'état solide. Image tirée de ^[137]

Un autre groupement accepteur utilisé avec une symétrie D-A-D est le benzothiadiazole. Lorsqu'il est conjugué avec des groupements électro-donneurs tels que des méthoxys via un pont conjugué styrène, on obtient une fluorescence rouge. La molécule présentée Figure IV-15^[138] présente par exemple une émission à 629 nm avec un rendement de 44%.

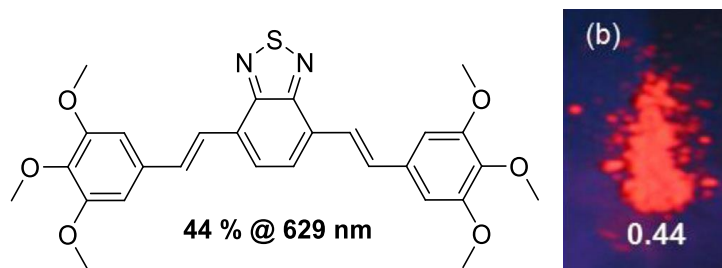


Figure IV-15. Structure d'un benzothiadiazole avec une architecture D-A-D et une émission à 644 nm. Droite : photographie sous UV de la poudre^[138]

Il existe moins d'exemples de symétrie A-D-A. Ce sont souvent des fluorophores avec des anilines centrales comme par exemple celles synthétisées par Shimizu *et al.* (Figure IV-16 et Figure IV-17). Elles sont substituées par des ponts vinyles porteurs de groupements attracteurs : groupements alkyles attracteurs^[139] (trifluorométhyles, esters, cétones) ou cyanophényléthényles^[140]. Ces diverses substitutions couvrent une large gamme du spectre visible, du bleu au rouge. De plus, les substituants des anilines centrales ne sont pas dans le plan de la conjugaison, ce qui éloigne les molécules les unes des autres. La diminution des interactions intermoléculaires permet alors une augmentation de l'intensité de fluorescence. Dans le rouge, il est ainsi possible d'atteindre 638 nm avec un rendement de 43 % pour la molécule **5** grâce à l'attraction exercée par les cétones ou, dans la seconde publication^[140], 702 nm ($\Phi_f = 33\%$) avec des groupements trifluorométhyles.

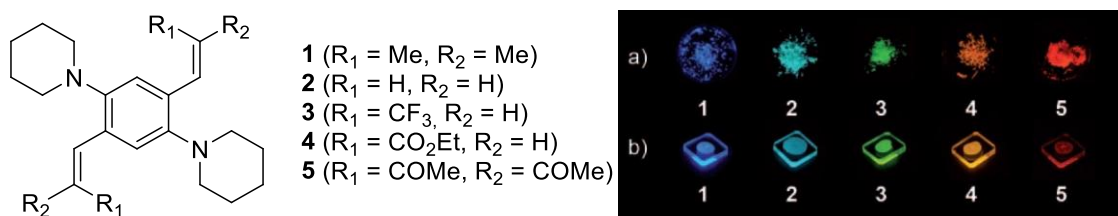


Figure IV-16. Exemples de fluorophores quadrupolaires synthétisés par Shimizu *et al.*^[139] basés sur un cœur dipiperidinobenzène.

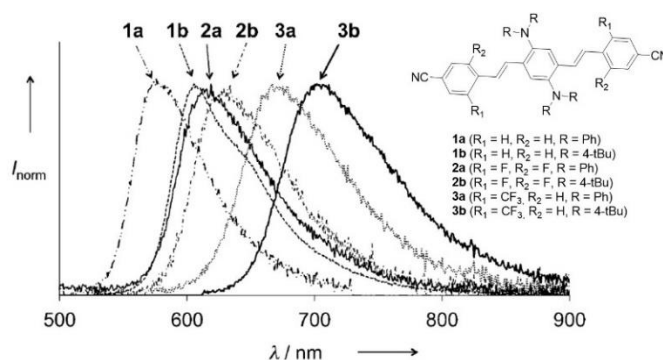


Figure IV-17. Spectres d'émissions à l'état solide des quadrupoles porteurs de groupements cyanophényléthénylbenzènes synthétisés par Shimizu *et al.*^[140]

1.B.iv Quelques exemples actifs vis-à-vis de la précipitation

Lorsque l'introduction d'hétéroatomes se fait sur des structures actives vis-à-vis de l'AIE, elle renforce le caractère émissif de la molécule et permet de décaler les longueurs d'onde d'émission vers le rouge. Le groupement triphénylamine, par exemple, est un motif très utile car il est riche en électron et renforce le caractère D- π -A d'une molécule. De plus, même s'il n'est pas lui-même actif vis-à-vis des phénomènes d'AIE, sa structure en hélice permet de tels effets lorsqu'il est greffé sur d'autres cycles aromatiques (voir **2DPAFO**, Figure IV-18). Liu *et al.*^[141] ont utilisé ce groupement sur une fluorénone (architecture D-A-D) qui émet à 610 nm à l'état solide ou en suspension, mais dont le rendement quantique n'est pas communiqué.

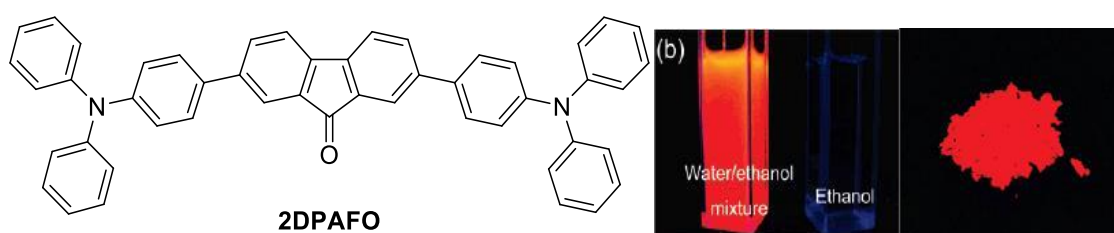


Figure IV-18. Exemple de fluorophore contenant un hétéroatome : 2DPAFO. Centre : fluorescence en suspension dans un mélange eau/éthanol et dans l'éthanol pure. Droite : fluorescence de la poudre sous lampe UV. Tiré de ^[141]

Un autre exemple que l'on peut présenter utilise le groupement benzobis(thiadiazole) (**BbisTA**) qui est connu pour sa forte capacité à attirer des électrons. En greffant dessus des motifs triphénylamines (qui en plus vont permettre la formation du dipôle D-A), il est possible de supprimer les interactions de type π - π et de retrouver un fluorophore émissif en milieu solide. Comme le groupement **BbisTA** est très électro-attracteur, on retrouve un très fort déplacement vers le rouge comme sur ce quadrupole^[142], présenté Figure IV-19 et synthétisée par Qian *et al.*, qui présente une émission à 1078 nm en suspension MeOH/THF avec un rendement quantique de 3%.

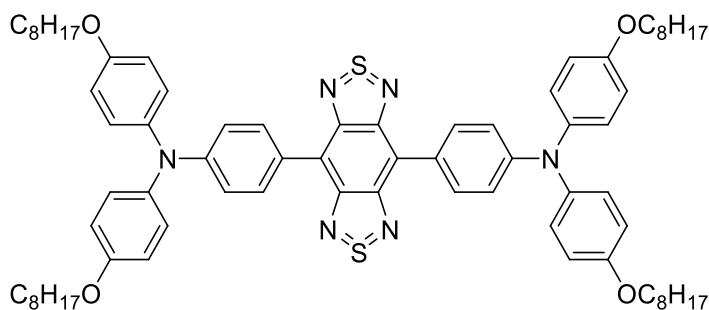


Figure IV-19. Exemple de fluorophore porteur d'un groupement BbisTA qui émet dans l'infra-rouge.

Enfin, le groupement nitrile est beaucoup utilisé pour ce type d'application parce qu'il possède à la fois une structure rigide et une forte polarité. En effet, à proximité d'un groupement phényle (comme par exemple pour la molécule présentée Figure IV-20, le clash stérique entre les protons aromatiques et le nitrile force la molécule à adopter une conformation twistée^[143]. Dans le cristal, cette conformation a le même effet qu'une structure en hélice, permettant de renforcer la fluorescence. De plus, les liaisons hydrogènes avec les groupements nitriles rigidifient encore plus les molécules, ce qui contribue à une émission plus intense. Comme précédemment, une augmentation du moment dipolaire permet de déplacer l'émission vers les grandes longueurs d'onde (Figure IV-21). Avec un cœur dicyanoéthényle, la fluorescence va du bleu au vert puis au rouge avec un groupement de plus en plus électrodonneur : brome puis méthoxy puis carbazole^[144,145].

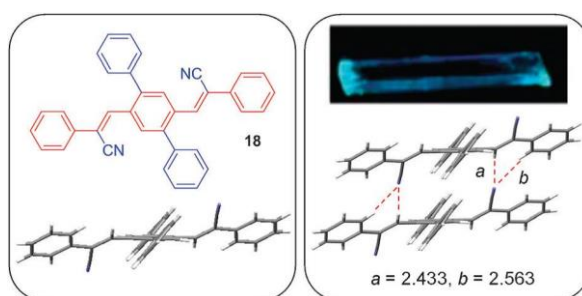


Figure IV-20. Le groupement nitrile entraîne un clash stérique qui twiste la molécule et des liaisons hydrogènes qui la rigidifient. En haut, photographie d'un cristal de cette molécule^[143].

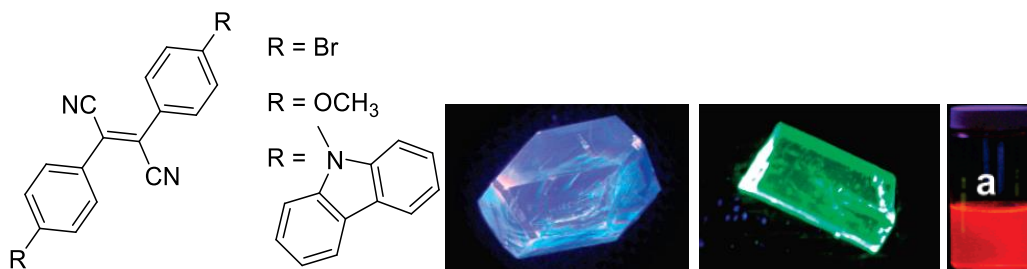


Figure IV-21. Structure de fluorophores dicyanoéthényles porteurs de groupements donneurs de plus en plus marqués avec droite : photographies de cristaux sous lampe UV. De gauche à droite : Brome et cristal bleu, méthoxy et cristal vert, carbazole et cristal rouge. Images tirées de^[144,145]

Avec ces différents exemples, les auteurs ont aussi mis en évidence d'autres mécanismes qui participent à la fluorescence. En effet, si les RIR sont responsables de l'augmentation de l'intensité, il est couramment observé que la solution et la poudre ne présentent pas la même couleur de fluorescence. Ceci peut être expliqué par les interactions intermoléculaires au sein de la phase condensée. Ces interactions vont alors fortement dépendre de l'agencement des molécules les unes par rapport aux autres. En résumé, et comme il sera expliqué dans la partie suivante, la polarité des

Chapitre IV : A la recherche d'un émetteur à l'état solide optimisé dans le rouge

groupements joue sur le moment dipolaire et peut décaler les propriétés spectroscopiques mais elle peut aussi intervenir par des interactions intermoléculaires qui vont modifier la géométrie de l'agencement et créer des agrégats aux propriétés différentes.

L'utilisation d'une architecture de type « push-pull » est une de celles qui ont donné les meilleurs résultats pour la fluorescence à l'état solide. Au sein même de notre laboratoire, Julien Massin avait déjà synthétisé des fluorophores basés sur des anilines conjuguées à des dicyanoisophorones^[146] (voir Figure IV-22). Bien qu'il n'ait pas été possible, à l'époque, de mesurer les rendements quantiques, les cristaux de ces molécules présentent une fluorescence à l'état solide extrêmement décalée vers le rouge avec des maxima d'émission au-delà de 715 nm et jusqu'à 790 nm.

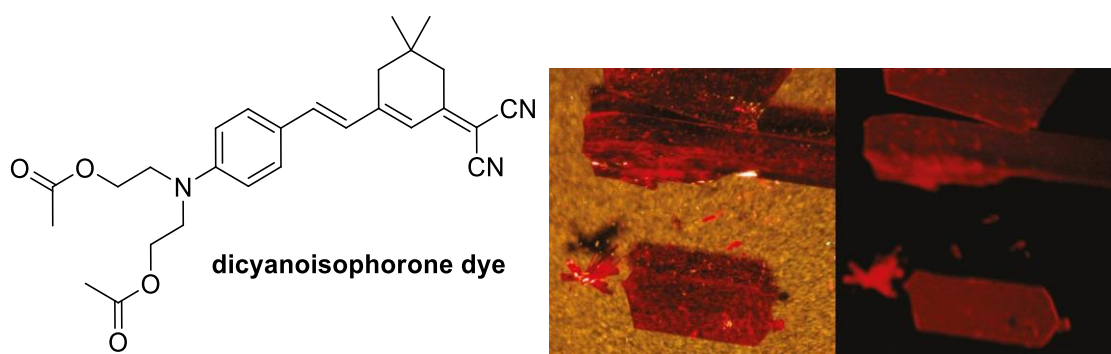


Figure IV-22. Exemple de composé dicyanoisophorone synthétisé au laboratoire par Julien Massin. A droite : photographie des cristaux sous lampe blanche et sous lampe UV.

A l'aide d'une ingénierie moléculaire sur les substituants de l'amine (diéthyle, chaînes alkyles portant des halogènes, des azido ou des carbones asymétriques) il est possible de faire varier les maxima d'émission sur quasiment une centaine de nanomètres sans faire varier le transfert de charge. Là encore, l'explication tient à l'agencement des molécules au sein du cristal et non aux facteurs électroniques. C'est pourquoi il est nécessaire de comprendre l'effet sur la fluorescence d'un changement dans l'agencement.

1.C. Les interactions au sein du cristal

1.C.i Agrégats J contre agrégats H

Tout a commencé il y a plus de soixante-dix ans quand G. Scheibe^[147] et E. Jelley^[148] ont observé le curieux comportement de la Pseudoisocyanine chlorure (PIC) dans l'eau. Par comparaison au spectre d'absorption dans l'éthanol, une nouvelle bande, très fine et très intense, apparaît et est décalée vers les plus faibles énergies ($\lambda_{\text{max}} = 571$ nm contre 525 nm, Figure IV-23). De plus, cette variation

s'accompagne d'une intense fluorescence avec un faible déplacement de Stokes ($\lambda_{em} = 575$ nm). Ce comportement a ensuite été attribué à la formation d'agrégats de PIC en milieu aqueux.

Une absorption étroite, intense et décalée vers le rouge est une des signatures des agrégats de type J^[149] (pour Jelly). Au contraire, des agrégats, dont l'absorption est décalée vers le bleu, sont appelés agrégats de type H (pour hypochrome). Ces derniers sont souvent accompagnés d'une diminution de la fluorescence, alors qu'elle est généralement plus intense pour les agrégats J. Ces caractéristiques spectroscopiques rendent la formation d'agrégats de type J bien plus désirable que celle d'agrégat H.

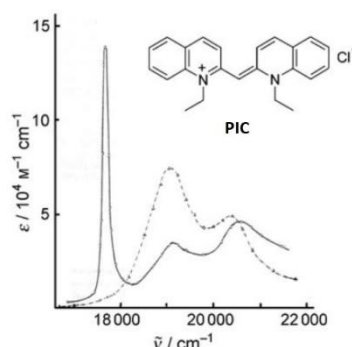


Figure IV-23. Spectres d'absorption d'agrégats de PIC dans l'eau (trait pleins) et en solution dans l'éthanol (tiret). Adapté de ^[149]

1.C.ii Explications structurelles

Ces différences peuvent être expliquées par la théorie du couplage excitonique de Kasha. Le couplage excitonique correspond à l'interaction entre différents dipôles à l'état excité présents à l'état excité. Il faut donc et considérer au minimum deux molécules pour pouvoir raisonner (voir Figure IV-24). Dans le cas de nos molécules, de simples dipôles, le moment dipolaire à l'état excité est parallèle au moment dipolaire fondamental est donc à l'alignement entre les molécules. Dans les agrégats H, elles sont côte-à-côte, l'angle de glissement θ entre les deux dipôles vaut $\theta = 90^\circ$. Pour l'absorption $S_0 \rightarrow S_1$, le niveau excité autorisé est le plus haut en énergie, donc l'absorption est décalée vers le bleu (les hautes énergies). Après désexcitation vibrationnelle, la transition depuis le niveau le plus bas est interdite par symétrie, donc l'agrégat est faiblement émissif. Dans l'autre cas extrême, les molécules dans un agrégat J sont en file indienne ($\theta = 0^\circ$) et les niveaux excités sont intervertis : l'absorption se fait avec une énergie plus faible (décalage bathochromique) et le niveau émissif est autorisé ce qui permet de forts rendements quantiques d'émission (voir Figure IV-24) mais entraîne de faibles déplacements de Stokes

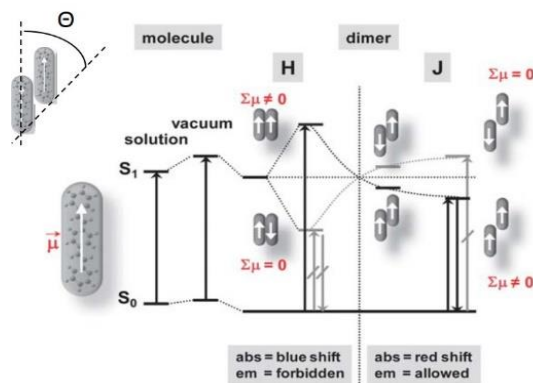


Figure IV-24. Illustration du couplage excitonique avec les niveaux énergétiques en solution et du dimère suivant l'angle que forment les deux dipôles. Les agrégats de type H et J représentent les deux cas extrêmes^[150].

Les cas limites étant posés, il faut savoir que l'angle entre deux dipôles correspond à l'angle entre les dipôles les plus proches. En particulier, l'exemple avec deux molécules en file indienne n'est pas possible, dans la réalité car une troisième molécule prend place sur le côté et recrée alors à un agrégat de type H avec un angle de 90° . Enfin, la théorie de Kasha prédit l'existence d'un angle dit « angle magique » d'une valeur de $54,7^\circ$ qui correspond à l'inversion des niveaux d'énergie. Un agrégat présentant des angles de glissement inférieurs à cette valeur est alors susceptible de présenter des propriétés correspondant aux agrégats J.

1.C.iii Comment influencer la formation de certains types d'agrégats

Malheureusement, il est très difficile de prédire la conformation des molécules au sein d'un cristal ou d'un agrégat. Les rares tentatives pour déterminer une relation entre la structure de la molécule et le type d'agrégat l'ont été sur des structures bien précises comme par exemple le distyrylbenzène^[150] ou le dicyanostilbène^[145]. Il en ressort cependant que les groupements très encombrants tels que les tert-butyles, diphénylamines, réduisent de façon très importante les interactions intermoléculaires, ce qui conduit à une fluorescence proche de la solution, généralement décalée vers le bleu. De plus, l'introduction de groupements de faible taille mais très polaires (nitriles, méthoxys) modifie le moment dipolaire total et entraîne souvent un arrangement qui se rapproche des agrégats J.

La Figure IV-25 présente un exemple avec une BODIPY substituée en méso^[151]. Le remplacement d'un groupement méthyle en trifluorométhyle modifie l'arrangement dans le cristal : On passe d'un agrégat H fluorescent en solution à un agrégat J qui émet une lumière rouge en suspension dans l'eau (Figure IV-25, centre).

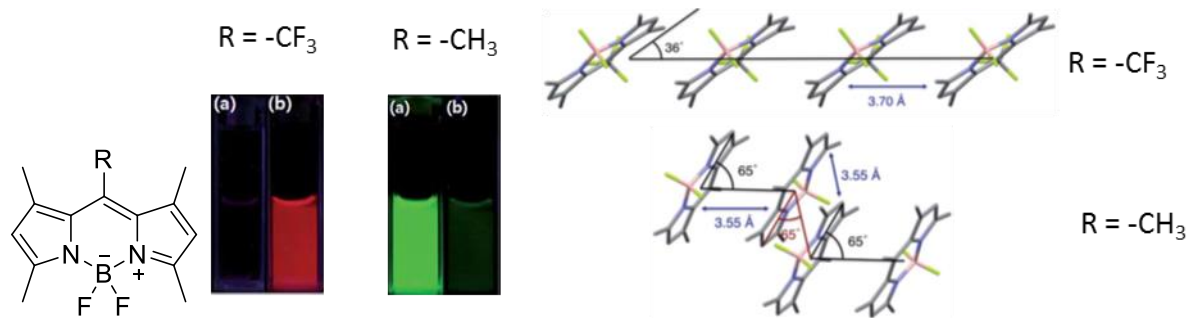


Figure IV-25. Suivant la substitution, la BODIPY précipite sous forme d'agrégat J (R = -CF₃) ou H (R = -CH₃). Photographie sous lampe UV de CF₃-BODIPY et CH₃-BODIPY dans l'éthanol (a) et l'eau (b). Droite : structure cristalline avec les mesures des angles de glissement. adapté de ^[151]

Les deux molécules adoptent un arrangement coplanaire, mais leur inclinaison diffère suivant le substituant : 36 ° pour CF₃-BODIPY tandis qu'elle est bien plus élevée, autour de 65°, pour CH₃-BODIPY. Ces arrangements sont en accord avec les données spectroscopiques avec un angle faible pour l'agrégat J et un angle supérieur à 54,7° pour l'agrégat H.

IV.2 Certaines des sondes pH sont fluorescentes à l'état solide

2.A. Propriétés des substitutions ortho

Comme expliqué dans l'introduction de ce chapitre, la poudre de plusieurs des molécules utilisées comme sondes pH est fluorescente sous la lampe UV. Curieusement, les molécules substituées en position ortho semblent être très brillantes, contrairement à la solution (voir Figure IV-26). Une première explication est que la désexcitation ne peut pas se faire par formation de spiropyrane comme c'est le cas en solution à cause de contraintes physiques.



Figure IV-26. Photographie de poudres des composés *o*-pH-TCF sous lampe UV ($\lambda_{exc} = 365 \text{ nm}$). De gauche à droite : *o*-pH-TCF, 3-Cl-*o*-pH-TCF et 5-Cl-*o*-pH-TCF.

Les résultats des mesures spectroscopiques sur le solide en poudre sont présentés dans le Tableau IV-2. Les trois fluorophores émettent une fluorescence orange avec des maxima autour de 600 nm. Les trois spectres d'excitation sont très larges mais ils diffèrent par leur forme : celui du

Chapitre IV : A la recherche d'un émetteur à l'état solide optimisé dans le rouge

composé le moins fluorescent, (**5-Cl-o-pH-TCF**, $\Phi_f = 2\%$) n'est constitué que d'une seule et large bande. Pour les deux autres, une bande d'excitation plus fine apparaît à des longueurs d'onde supérieures. Cette bande est plus marquée, plus fine et plus décalée vers le rouge pour le composé **3-Cl-o-pH-TCF** qui est aussi le fluorophore le plus intense. Ces caractéristiques semblent valider la formation d'agrégats de types différents : H pour le fluorophore le moins fluorescent tandis que les deux autres auraient un caractère d'agrégat J de plus en plus marqué avec l'augmentation de l'intensité émise.

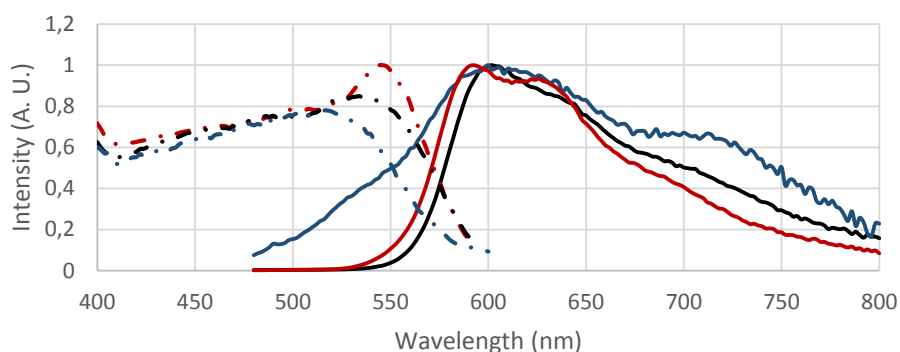


Figure IV-27. Spectres d'excitation (pointillés) et d'émission (traits pleins) des composés **o-pH-TCF** (noir), **3-Cl-o-pH-TCF** (rouge) et **5-Cl-o-pH-TCF** (bleu) sous forme de poudre.

	λ_{exc}^a (nm)	λ_{em}^a (nm)	$\Delta\lambda^b$ (nm)	Φ_f (%)
o-pH-TCF	534	602	68	5
5-Cl-o-pH-TCF	516	603	87	2
3-Cl-o-pH-TCF	545	592	47	6
II-2g	572	708	136	1
II-2h	632	682	50	8

Tableau IV-2. Caractéristiques spectroscopiques des composés orthohydroxys et de certains paraméthoxys à l'état solide (poudre cristalline). ^a maximum d'excitation et d'émission à l'état solide. ^b écart entre les maxima d'excitation et d'émission.

2.B. Substitutions para

Dans le même temps, certains des composés substitués en position para ont montré une fluorescence de couleur rouge sous la lampe UV. Il s'agit principalement des composés porteurs d'un second oxygène : **II-2g** et **II-2h** dont on peut voir la photographie sous lampe UV, Figure IV-28. A ces composés, s'ajoute **II-2j** mais comme sa fluorescence est faible, elle n'a pas été quantifiée. Pour les deux autres molécules, dont les spectres d'excitation et d'émission sont donnés Figure IV-29, il est de nouveau possible de faire une différence entre deux types d'agrégats : le moins fluorescent (**II-2g**) présente une excitation très large avec un maximum en deçà de 600 nm, pouvant être le signe d'un

agrégat H tandis que le remplacement d'un groupement hydroxyle par un méthoxy semble le transformer en agrégat J beaucoup plus fluorescent dont le spectre d'excitation présente une seconde bande, plus fine et décalée vers le rouge qui s'accompagne d'un plus faible décalage de Stokes. Ces composés présentent des longueurs d'onde d'émission très déplacées vers le rouge avec des maxima à 682 nm ($\Phi_f = 8\%$, **II-2h**) et 702 nm ($\Phi_f = 1\%$, **II-2g**). Le plus surprenant est la différence entre les deux pour une très faible variation structurelle.

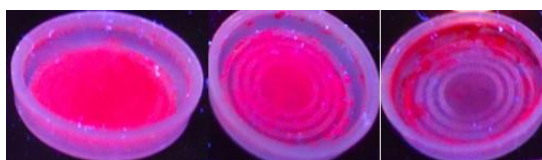


Figure IV-28. Photographie sous lampe UV ($\lambda_{exc} = 365\text{ nm}$) des composés **II-2g** (gauche), **II-2h** (centre), et **II-2j** (droite)

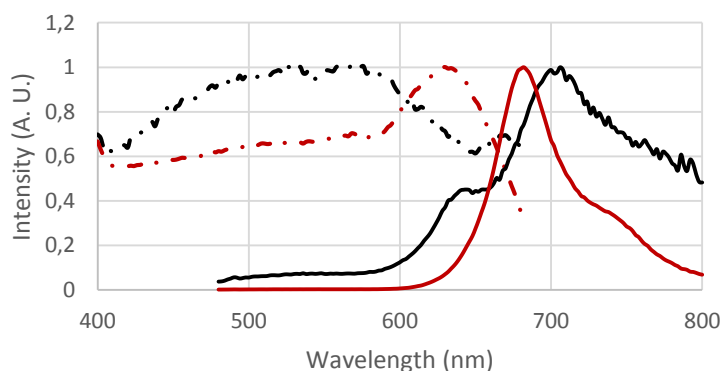


Figure IV-29. Spectres d'excitation (pointillés) et d'émission (traits pleins) des composés **II-2g** (noir) et **II-2h** (rouge).

IV.3 Travail sur les méthoxybenzaldéhydes

Les exemples précédents montrent combien un faible changement structurel modifie les propriétés de fluorescence du solide. De plus, le groupement méthoxy semble permettre une augmentation de l'intensité de fluorescence grâce à une modification de la structure de l'agrégat. Nous avons donc voulu étudier l'effet de ce groupement sur les propriétés à l'état solide en modifiant sa position ou son nombre sur le cycle aromatique.

Les différents composés présentés dans cette partie ne diffèrent donc que par le nombre (1 à 3) et la position (ortho, méta, para) des groupements méthoxys (voir Figure IV-30). Trois d'entre eux ne portent qu'un seul groupement : en ortho (**o-MeO-TCF**), en méta (**m-MeO-TCF**) et en para (**p-MeO-TCF**). Les six possibilités pour deux substituants ont aussi été étudiées : **2,3-diMeO-TCF**, **2,4-diMeO-**

TCF, **2,5-diMeO-TCF**, et **2,6-diMeO-TCF** pour les quatre possédant un groupement en position ortho auxquelles on ajoute **3,4-diMeO-TCF** et **3,5-diMeO-TCF** qui possèdent un groupement en position méta et un second, respectivement en para et en méta. Enfin, parmi les six autres possibilités avec trois substituants, seules quatre ont été prises en compte pour des raisons synthétiques : **2,3,4-triMeO-TCF**, **3,4,5-triMeO-TCF**, **2,4,6-triMeO-TCF** et enfin **2,4,5-triMeO-TCF**.

3.A. Synthèse d'une large famille

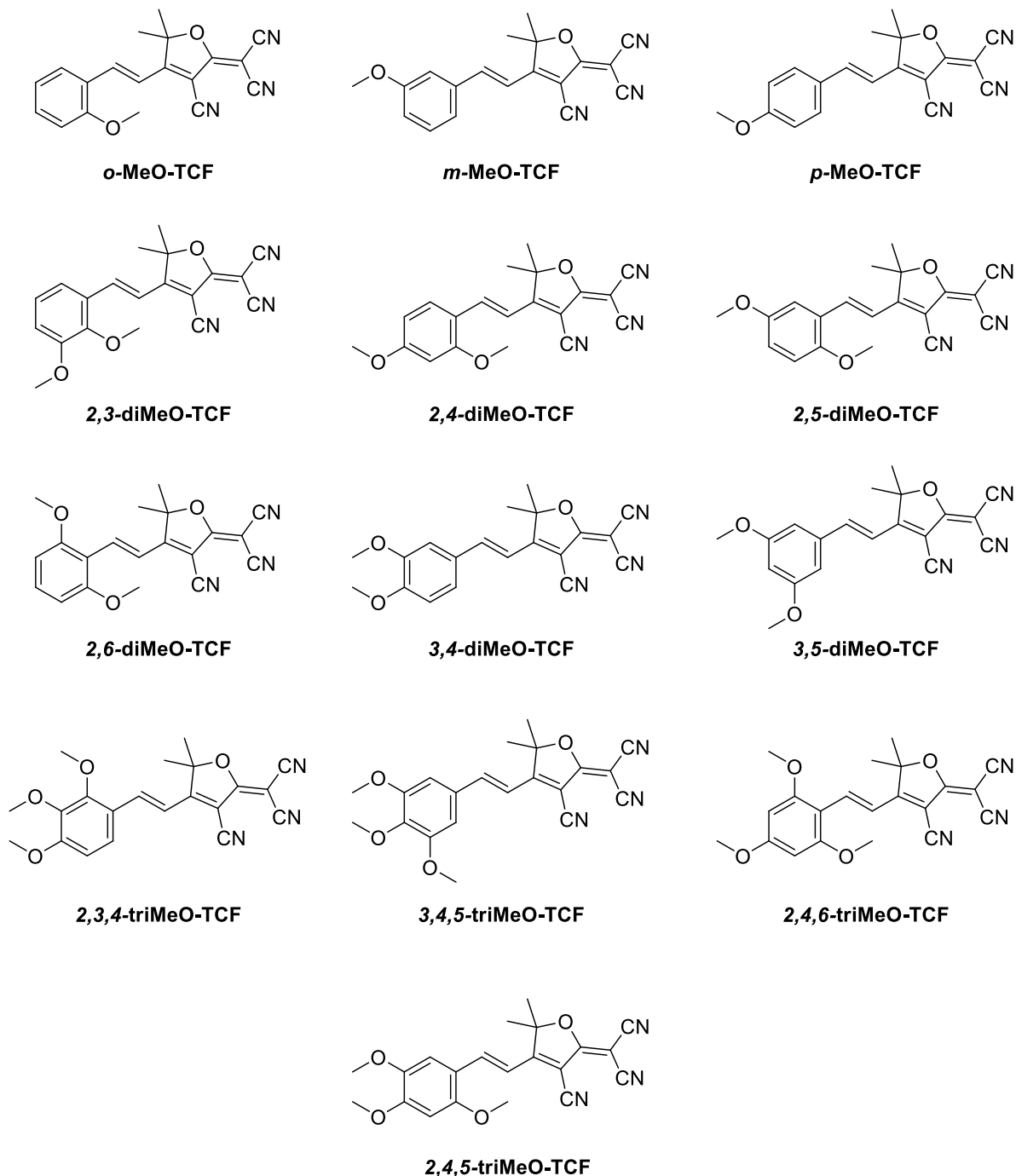


Figure IV-30. Différents méthoxy-TCF synthétisés et étudiés dans ce chapitre pour leur fluorescence à l'état solide.

Toutes les molécules de la Figure IV-30 peuvent être obtenues à partir du **TCF** et de l'aldéhyde correspondant par condensation de Knoevenagel comme pour les sondes pH. Seuls deux aldéhydes, le 2,3-diméthoxybenzaldéhyde et 3,5-diméthoxybenzaldéhyde, ne sont pas commerciaux et ont dû être synthétisés (voir Figure IV-31) : Le premier (**IV-1**) a été synthétisé par oxydation de l'alcool benzylique par le PCC dans le dichlorométhane avec un rendement très correct (82 %). Pour le second, la synthèse est plus longue : l'acide 3,5-diméthoxybenzoïque est méthylié par le sulfate de diméthyle pour donner l'ester **IV-2** totalement méthylié. Celui-ci est ensuite réduit en alcool benzylique (**IV-3**) et ré-oxydé sans purification préalable en aldéhyde par le PCC. L'aldéhyde **IV-4** peut ainsi être obtenu en larges quantités avec un rendement total avoisinant les 50 %.

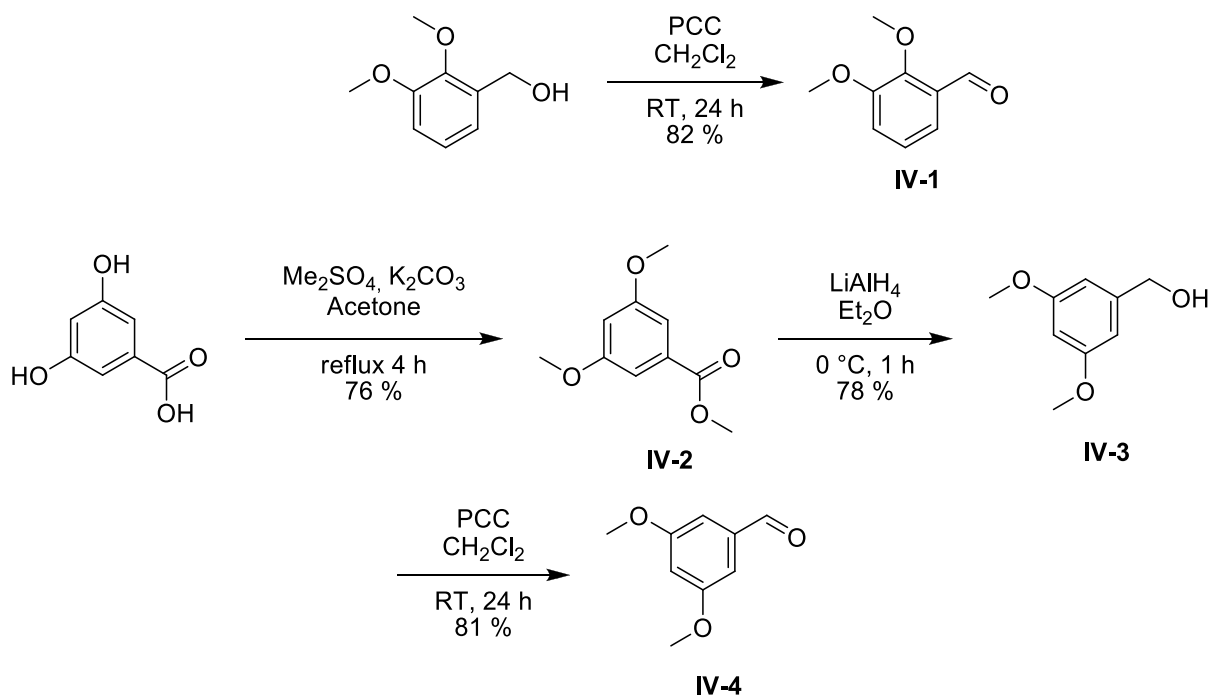


Figure IV-31. Synthèse des deux aldéhydes non commerciaux en respectivement une et deux étapes : 2,3-diméthoxybenzaldéhyde et 3,5-diméthoxybenzaldéhyde

Pour toutes les cibles, l'aldéhyde subit ensuite la même condensation de Knoevenagel avec le **TCF**. Il faut noter qu'après la précipitation des produits, ceux-ci ont été purifiés par chromatographie sur gel de silice pour éliminer une impureté de couleur bleue qui ne migre pas lors de l'élution. Cette impureté, même si elle n'apparaît pas sur les spectres RMN réalisés avant purification est suffisante pour éteindre massivement la fluorescence de nos composés. Les rendements de cette dernière étape sont généralement aussi bons (41 % à 92 %) que ceux relevés précédemment pour les sondes pH.

3.B. Propriétés spectroscopiques

Pour mieux comprendre les propriétés de fluorescence, nous avons étudié les composés en solution dans le THF, en suspension dans un mélange THF/H₂O, et à l'état solide.

3.B.i Solution

Les propriétés optiques en solution des différents fluorophores ont été mesurées en milieu dilué (10 µM) dans le THF, solvant de polarité intermédiaire, et sont données dans le Tableau IV-3. Les chromophores présentent une couleur allant du jaune au orange et même jusqu'au violet pour **2,4,5-triMeO-TCF**. Comme le montre la Figure IV-32, tous les spectres mettent en évidence une large bande d'absorption dans le visible caractéristique de transfert de charge induit (ICT) des molécules à architecture dipolaire. Les maxima d'absorption varient de 409 nm (**3,5-diMeO-TCF**) à 476 nm (**2,4,6-diMeO-TCF**) et même 498 nm pour le composé violet. Les coefficients d'absorption molaire de cette bande sont compris entre 20 000 M.cm⁻¹ et 30 000 M.cm⁻¹ à l'exception de **3,4,5-triMeO-TCF** (11 600 M.cm⁻¹) et de **p-MeO-TCF** dont l'absorption est plus intense (43 000 M.cm⁻¹).

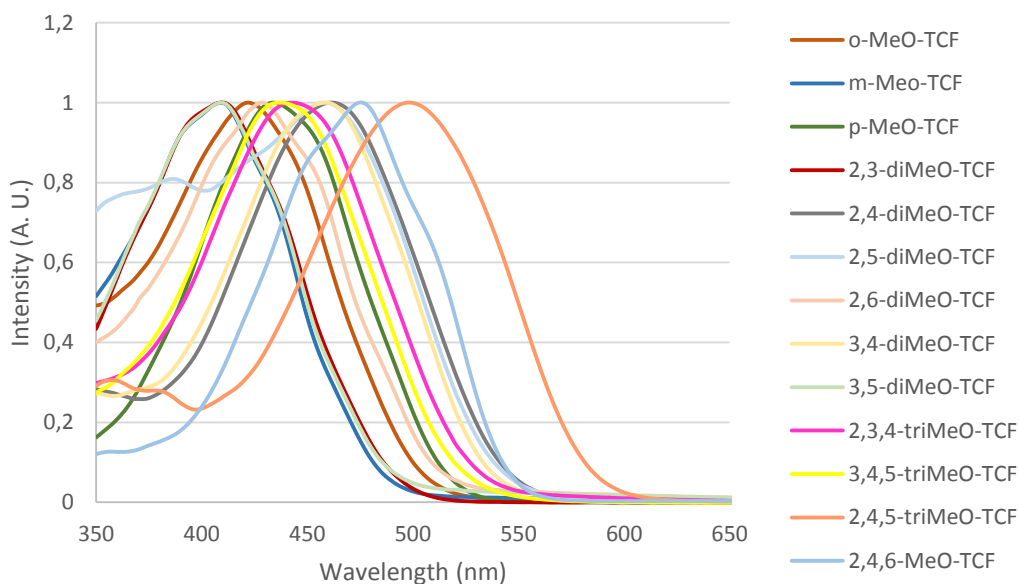


Figure IV-32. Spectres d'absorption normalisés dans le THF des composés méthoxy-TCF (10 µM).

Le nombre de groupement électro-donneurs semble être important, car les trois composés monométhoxys (**o,m,p-MeO**) ont un maximum en dessous de 435 nm tandis que les quatre portant trois méthoxys ont un maximum au-dessus de cette valeur (voir Tableau IV-3). Ceci est logique car une augmentation du nombre de groupements entraîne une augmentation du transfert de charge et lorsque celui-ci augmente, l'absorption est décalée vers le rouge. Comme attendu, la position méta

n'est pas favorable à un décalage bathochrome (410 nm pour ***m*-MeO-TCF**) à cause d'une conjugaison plus faible avec le groupement **TCF**. De plus, la position para amène un décalage plus important vers le rouge (433 nm pour ***p*-MeO-TCF**) que la position ortho (421 nm pour ***o*-MeO-TCF**) grâce à une conjugaison plus longue. Enfin le composé porteur de trois groupements conjugués (**2,4,6-triMeO-TCF**) présente une absorption encore plus déplacée vers le rouge : 476 nm.

De façon plus surprenante, il semble y avoir un effet remarquable lorsque deux groupements méthoxys sont en para l'un de l'autre : les deux fluorophores qui présentent ce type de substitution (**2,5-diMeO-TCF** et **2,4,5-triMeO-TCF**) présentent un décalage vers le rouge très important quand on les compare à leur équivalent en terme de positionnement ortho, méta ou para : par exemple, **2,5-diMeO-TCF** et **2,3-diMeO-TCF** sont tous les deux substitués en position ortho et méta mais le premier présente un décalage de 50 nm vers le rouge par rapport au second. Ceci est aussi présent entre **2,4,5-triMeO-TCF** et **2,3,4-triMeO-TCF** où on peut remarquer un décalage de 60 nm vers le rouge en faveur du premier.

	λ_{abs}^a (nm)	ϵ^a ($M^{-1}.cm^{-1}$)	λ_{em}^b (nm)	Φ_f^c
<i>o</i>-MeO-TCF	421	18 800	567	< 1 %
<i>m</i>-MeO-TCF	410	21 900	550	< 1 %
<i>p</i>-MeO-TCF	433	43 000	560	2 %
2,3-diMeO-TCF	411	31 000	578	< 1 %
2,4-diMeO-TCF	462	19 500	573	3 %
2,5-diMeO-TCF	458	14 900	625	2 %
2,6-diMeO-TCF	429	19 600	552	< 1 %
3,4-diMeO-TCF	459	28 900	594	6 %
3,5-diMeO-TCF	409	27 300	559	< 1 %
2,3,4-triMeO-TCF	442	18 200	572	2 %
3,4,5-triMeO-TCF	438	11 600	617	6 %
2,4,6-triMeO-TCF	476	22 900	570	2 %
2,4,5-triMeO-TCF	498	23 600	635	4 %

Tableau IV-3. *Propriétés optiques en solution dans le THF et dans l'éthylène glycol.* ^aabsorption dans le THF; ^b maxima d'émission dans l'éthylène glycol; ^c mesuré dans l'éthylène glycol avec l'érythrosin B dans le méthanol ($\Phi_f = 9\%$) comme référence.

Ces différents fluorophores sont peu voire pas du tout fluorescents dans le THF. Cependant, l'intensité augmente dans des solvants plus visqueux. Les maxima d'émission ainsi que le rendement quantique de fluorescence (Φ_f) sont présentés dans l'éthylène glycol dans le Tableau IV-3. Toutes les

Chapitre IV : A la recherche d'un émetteur à l'état solide optimisé dans le rouge

molécules présentent de très grands décalages de Stokes autour de 130 nm qui sont caractéristiques de ce type de chromophore « *push-pull* ». Dans l'éthylène glycol, les fluorophores émettent une fluorescence qui va du vert au rouge avec des maxima d'émission de 550 nm (*m*-MeO-TCF, 2,6-diMeO-TCF, 3,5-diMeO-TCF) jusqu'à 635 nm (2,4,5-triMeO-TCF). Les fluorophores les plus émissifs présentent un rendement quantique de fluorescence de 6 % dans l'éthylène glycol avec des émissions à 594 nm (3,4-diMeO-TCF) ou 617 nm (2,3,4-triMeO-TCF).

L'augmentation de la fluorescence avec la viscosité est due à la restriction de rotation intra-moléculaire comme l'ont montré Font-Sanchis *et al.*^[39] La désexcitation non-radiative n'est plus possible à cause de contraintes physiques. La seule désexcitation possible est alors la fluorescence, ce qui augmente le rendement quantique. Un bon exemple de cet effet peut être donné avec 3,4-diMeO-TCF : Φ_f est inférieur à 1 % dans le THF mais grimpe à 6 % dans l'éthylène glycol. Dans un solvant encore plus visqueux comme un mélange glycérol/méthanol : 90/10, l'intensité est bien plus importante ($\Phi_f = 25 %$, Figure IV-33). Il est possible de restreindre encore plus les rotations intra-moléculaires en gelant ce dernier mélange ($T_{fus} = 18 ^\circ C$). Même si Φ_f n'est pas mesuré, il apparaît clair sur la Figure IV-33 que le rendement de fluorescence est encore supérieur après un séjour de cinq minutes dans un réfrigérateur.



Figure IV-33. Photographie sous lampe UV ($\lambda_{exc} = 365 \text{ nm}$) de 3,4-diMeO-TCF (50 μM) dans différents solvants : de gauche à droite : THF, éthylène glycol, mélange MeOH/glycérol 10/90, le même mélange glacé (après 5 minutes dans un réfrigérateur).

3.B.ii Suspension et phénomène d'AIE



Figure IV-34. Photographie sous lampe UV ($\lambda_{exc} = 365 \text{ nm}$) du composé **3,4-diMeO-TCF** ($50 \mu\text{M}$) dans un mélange eau/THF à différents f_w .

Même s'ils sont peu fluorescents en solution, ces composés présentent une fluorescence intense lorsqu'ils précipitent (AIE) dans un mélange H₂O/THF ou dans un solvant aqueux. Des mélanges H₂O/THF sont ainsi préparés avec différentes fractions volumiques (f_w) en eau de 0 à 95 %. Le point clé est de conserver la concentration en fluorophore constante ($50 \mu\text{M}$), quelle que soit la quantité d'eau. Les Figure IV-34 et Figure IV-35 montrent la fluorescence enregistrée pour les différents f_w .

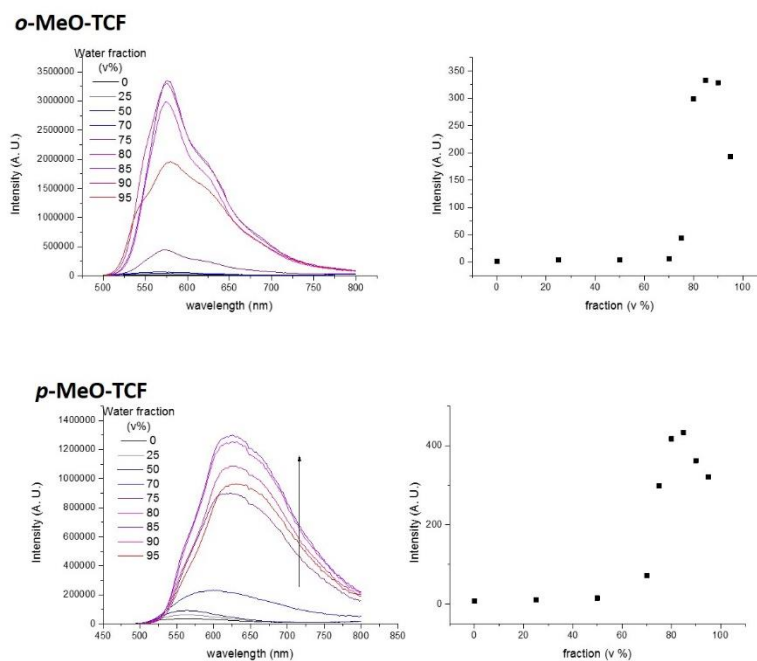
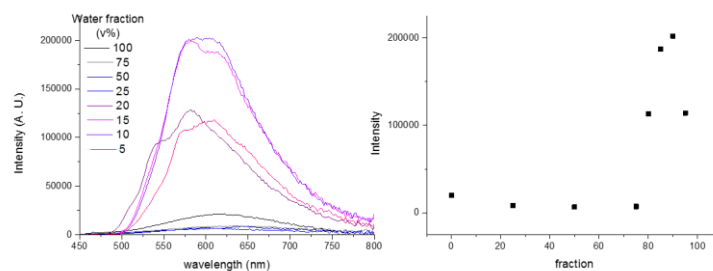


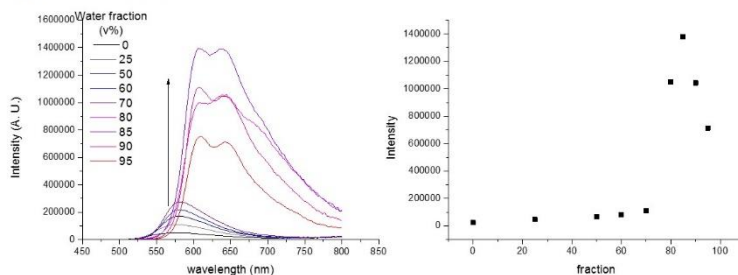
Figure IV-35. Gauche : Spectres d'émission des fluorophores **o-MeO-TCF** et **p-MeO-TCF** ($50 \mu\text{M}$) dans un mélange THF/eau à différents f_w . Droite : évolution de l'intensité maximale en fonction de f_w .

Chapitre IV : A la recherche d'un émetteur à l'état solide optimisé dans le rouge

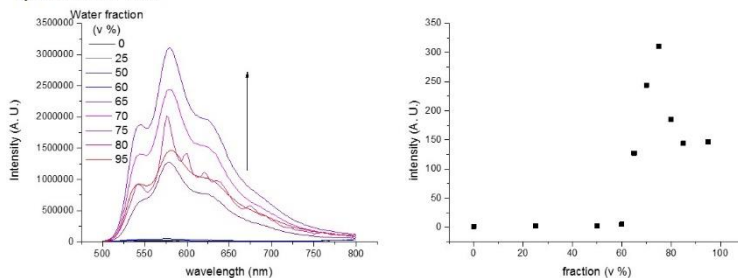
2,3-diMeO-TCF



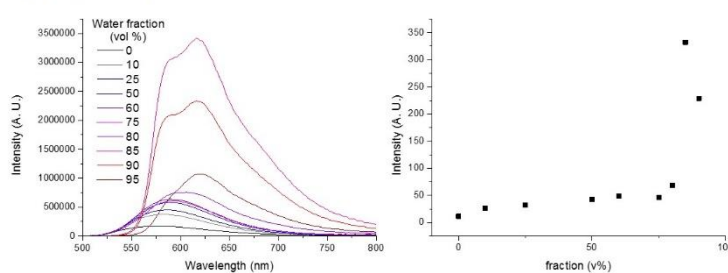
2,4-diMeO-TCF



2,6-diMeO-TCF



3,4-diMeO-TCF



2,3,4-triMeO-TCF

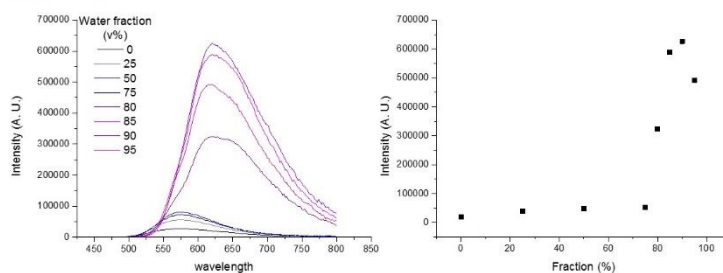


Figure IV-36. Gauche : Spectres d'émission des fluorophores **diMeO-TCF** et **2,3,4-triMeO-TCF** (50 μ M) dans un mélange THF/eau à différents fw. Droite : évolution de l'intensité maximum en fonction de fw..

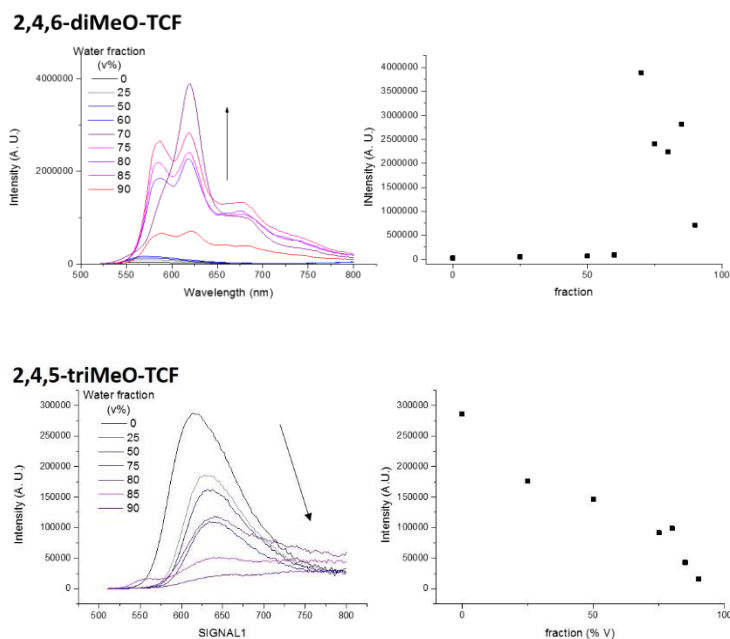


Figure IV-37. Gauche : Spectres d'émission des fluorophores **2,4,6-triMeO-TCF** et **2,4,5-triMeO-TCF** ($50 \mu\text{M}$) dans un mélange THF/eau à différents f_w . Droite : évolution de l'intensité maximum en fonction de f_w . Seul **2,4,5-triMeO-TCF** présente un coefficient $\alpha < 1$.

Tant que le fluorophore est soluble dans le milieu, la fluorescence est faible. Par exemple, pour **m-MeO-TCF**, la fluorescence est négligeable tant que $f_w < 65 \%$. En réalité, la fluorescence augmente lentement mais reste négligeable. Le maximum est décalé vers le rouge lorsque f_w augmente, sûrement à cause d'une augmentation de la polarité du mélange. A des faibles pourcentages d'eau ($f_w < 65 \%$), le système solubilise le composé et la fluorescence enregistrée est la fluorescence en solution. Passé le cap des 65 %, la fluorescence augmente de façon très importante pour atteindre un maximum à $f_w = 85 \%$. L'intensité est alors multipliée par 200 et le maximum d'émission est décalé vers le rouge (9 nm). A ces pourcentages plus élevés, **m-MeO-TCF** précipite de façon ordonnée et forme une suspension. Cet arrangement relativement compact entraîne un environnement très polaire responsable d'un décalage vers le rouge des propriétés spectroscopiques.

Les différents fluorophores présentent presque tous le même comportement dans ces conditions (voir Figure IV-35 et Figure IV-37). Par exemple, l'intensité d'émission de **p-MeO-TCF** est multipliée par 61 quand f_w passe de 0 à 85 % avec un décalage bathochrome de 67 nm. Les mêmes gammes d'amélioration (30 à 250) et de décalage bathochrome ont été observées pour les autres fluorophores comme le montre le Tableau IV-4. Parmi les molécules testées, la seule faisant exception est **2,4,5-triMeO-TCF** dont la suspension n'est pas fluorescente (Figure IV-37, dernier composé).

	λ_{exc}^a (nm)	λ_{em}^a (nm)	$\Delta\lambda_{exc}/\Delta\lambda_{em}^b$ (nm)	Φ_f^c	facteur α_{AIE}^d
<i>o</i>-MeO-TCF	476	576	55/9	25 %	200
<i>p</i>-MeO-TCF	456	627	73/67	10 %	61
2,3-diMeO-TCF	464	603	53/25	3 %	31
2,4-diMeO-TCF	498	606	36/33	9 %	58
2,6-diMeO-TCF	520	580	91/28	6 %	240
3,4-diMeO-TCF	558	616	99/22	13 %	30
2,3,4-triMeO-TCF	540	620	98/48	7 %	35
2,4,6-triMeO-TCF	570	620	94/50	7 %	147

Tableau IV-4. Emission et rendement quantique de fluorescence des différents fluorophores dans un mélange eau/THF. ^a mesuré dans un mélange THF/eau, ^b différence entre l'absorption dans le THF et l'excitation dans un mélange THF/eau / différence entre l'émission dans l'éthylène glycol et dans un mélange THF/eau, ^c mesuré à l'aide d'une sphère d'intégration, ^d augmentation entre l'émission à $f_w = 0$ % et l'émission maximum.

Pour tous les composés, l'intensité de fluorescence décroît après avoir atteint le maximum pour un f_w autour de 80 à 90 %. Ce phénomène est régulièrement observé dans les expériences d'AIE mais les raisons exactes sont encore discutées^[152]. Les explications proposées sont les suivantes : après l'agrégation, seules les molécules à la surface de la nano-particule sont émissives et contribuent à la fluorescence. En augmentant f_w , la taille de la nanoparticule augmente et le nombre de fluorophores à l'intérieur augmente. Il y a alors une décroissance du nombre de fluorophores émissifs et une diminution de la fluorescence. Une autre explication tient à la cinétique de précipitation. Les molécules peuvent s'agréger en deux types de suspension : de type cristallin ou de façon totalement amorphe. La première augmente la fluorescence tandis que la seconde conduit à une extinction de celle-ci. A haut pourcentage en eau, la cinétique de la précipitation est accélérée et les molécules n'ont pas le temps de s'arranger de façon cristalline. On passe de nanoparticules très émissives, car cristallines, à des nanoparticules peu émissives car amorphes. Pour nos composés, la forme du spectre d'émission est différente à fort f_w , ce qui semble accréditer la seconde hypothèse.

Les spectres d'excitation de ces fluorophores sont considérablement différents des spectres d'absorption en solution et sont typiques de spectres d'excitation à l'état solide. Ils consistent en de très larges bandes avec un maximum décalé vers le rouge de 30 à 100 nm par rapport à l'absorption dans le THF (Tableau IV-5). Les données correspondantes ainsi que les rendements quantiques de fluorescence, mesurés avec une sphère d'intégration, sont présentés dans le Tableau IV-4. Pour les composés qui ne sont porteurs que de groupements en ortho, l'émission est orange avec des maxima autour de 580 nm (576 nm pour ***o*-MeO-TCF** et 580 nm pour **2,6-diMeO-TCF**). Ce sont aussi les

composés qui présentent un faible décalage bathochromique par rapport à la solution. Toutes les autres molécules présentent une émission rouge avec des maxima au-delà de 600 nm et jusqu'à 627 nm pour ***p*-MeO-TCF**.

Les rendements quantiques de fluorescence vont de 3 % pour **2,3-diMeO-TCF** à 25 % pour ***o*-MeO-TCF**. Pour les longueurs d'ondes considérées, il s'agit de rendements tout à fait corrects avec par exemple : 13 % à 616 nm pour **3,4-diMeO-TCF** et 10 % à 627 nm pour ***p*-MeO-TCF**. Enfin, ***o*-MeO-TCF** est très fluorescent avec 25 % à 576 nm. Ces longueurs d'onde sont très intéressantes pour une application biologique car on se rapproche de la fenêtre de transparence biologique. De plus, les différents fluorophores possèdent de très large déplacement de Stokes (autour de 60 nm pour **2,6-diMeO-TCF** et **3,4-diMeO-TCF** et jusqu'à 117 nm pour ***p*-MeO-TCF**).

3.B.iii Poudre

Comme pour les poudres des composés dérivés de ***p*H-TCF**, les poudres des composés présentent une intense fluorescence jaune, orange et rouge (à l'exception de **3,5-diMeO-TCF** et **3,4,5-triMeO-TCF**) sous lampe UV comme le montre la Figure IV-38. Nous avons alors mesuré l'émission de celles-ci. Les résultats sont présentés dans le Tableau IV-5. Les maxima d'émission vont de 580 nm (**2,3-diMeO-TCF**) à 732 nm (**2,4,5-triMeO-TCF**) avec beaucoup de fluorophores émettant dans le rouge (Figure IV-39) : 612 nm (***m*-MeO-TCF**), 620 nm (***o*-MeO-TCF**), 624 nm (**2,6-diMeO-TCF**), 634 nm (**3,4-diMeO-TCF**), 645 nm (**2,3,4-triMeO-TCF**), 666 nm (***p*-MeO-TCF**), 679 nm (**2,4,6-triMeO-TCF**) et enfin 704 nm (**2,5-diMeO-TCF**). La plupart présentent une émission large et structurée avec des épaulements aux grandes longueurs d'onde. Comme les spectres d'excitation ne varient pas, il s'agit de la même espèce émissive. Les épaulements sont alors dus à la structure vibrationnelle de l'état S_0 ou au couplage excitonique entre les molécules.

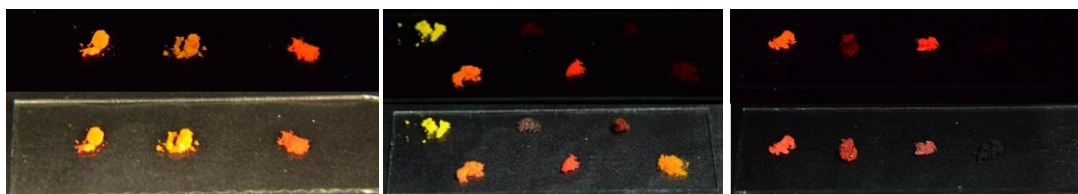


Figure IV-38. Photos sous lampe UV ($\lambda_{exc} = 365$ nm, haut) et sous lumière blanche (bas) des composés monométhoxys (gauche), diméthoxys (centre) et triméthoxys (droite).

Comme attendu, les fluorophores présentent une émission solide décalée vers le rouge par rapport à la solution (voir Tableau IV-5) et à la suspension. Ceci peut s'expliquer par un arrangement différent entre la suspension et la poudre avec un agrégat plus proche du type J pour le second. En effet, une restriction des rotations par augmentation de la viscosité de l'environnement peut expliquer

Chapitre IV : A la recherche d'un émetteur à l'état solide optimisé dans le rouge

l'augmentation de l'intensité mais pas un décalage vers le rouge des longueurs d'onde. Du côté des rendements quantiques, l'émission à l'état solide est généralement plus intense à l'exception du composé **2,4-diMeO-TCF** pour lequel le rendement quantique en suspension est légèrement supérieur (9 % contre 7 %).

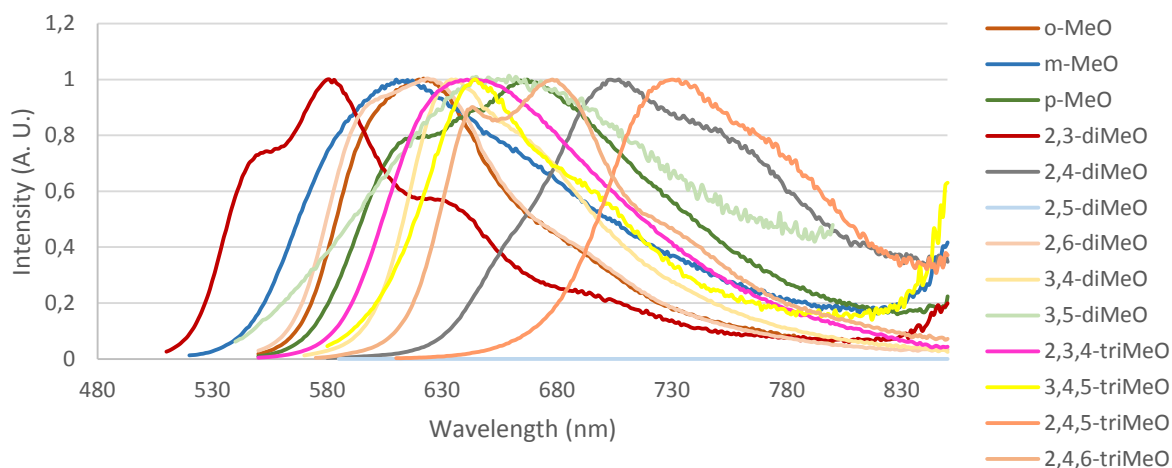


Figure IV-39. Spectres normalisés d'émission des fluorophores méthoxy-TCF.

	λ_{exc}^a (nm)	λ_{em}^a (nm)	$\Delta\lambda^c$ (nm)	Φ_f^d (%)
o-MeO-TCF	558	620	62	28
m-MeO-TCF	498	612	114	4
p-MeO-TCF	560	615 (s) ^b , 666	106	15
2,3-diMeO-TCF	514	550 (s) ^b , 580, 625 (s) ^b	66	13
2,4-diMeO-TCF	630	704	74	7
2,5-diMeO-TCF	604	658	54	3
2,6-diMeO-TCF	558	596 (s) ^b , 624	66	21
3,4-diMeO-TCF	586	634	48	20
3,5-diMeO-TCF	598	646	48	1
2,3,4-triMeO-TCF	568	645	77	26
3,4,5-triMeO-TCF	582	644	62	1
2,4,6-triMeO-TCF	610	644(s) ^b , 679	69	22
2,4,5-triMeO-TCF	646	732	86	5

Tableau IV-5. Propriétés photophysiques à l'état solide des différents fluorophores méthoxy-TCF. ^amaximum d'excitation et d'émission à l'état solide. ^bépaulement, ^c différence de longueurs d'onde entre l'absorption et l'émission, ^dmesuré à l'aide d'une sphère d'intégration.

Par comparaison avec les sondes pH, on peut s'apercevoir que le remplacement d'un hydroxy par un méthoxy permet de considérablement augmenter l'intensité émise. Par exemple, la comparaison entre **II-2g**, **II-2h** et **3,4-diMeO-TCF** montre une augmentation de 1 % à 8 % puis 20 % au fur et à mesure des méthylations. EN revanche, pour ces composés, cette évolution est accompagnée d'un décalage hypsochrome de 708 nm (**II-2g**) à 682 nm (**II-2h**) et 634 nm pour le diméthoxy.

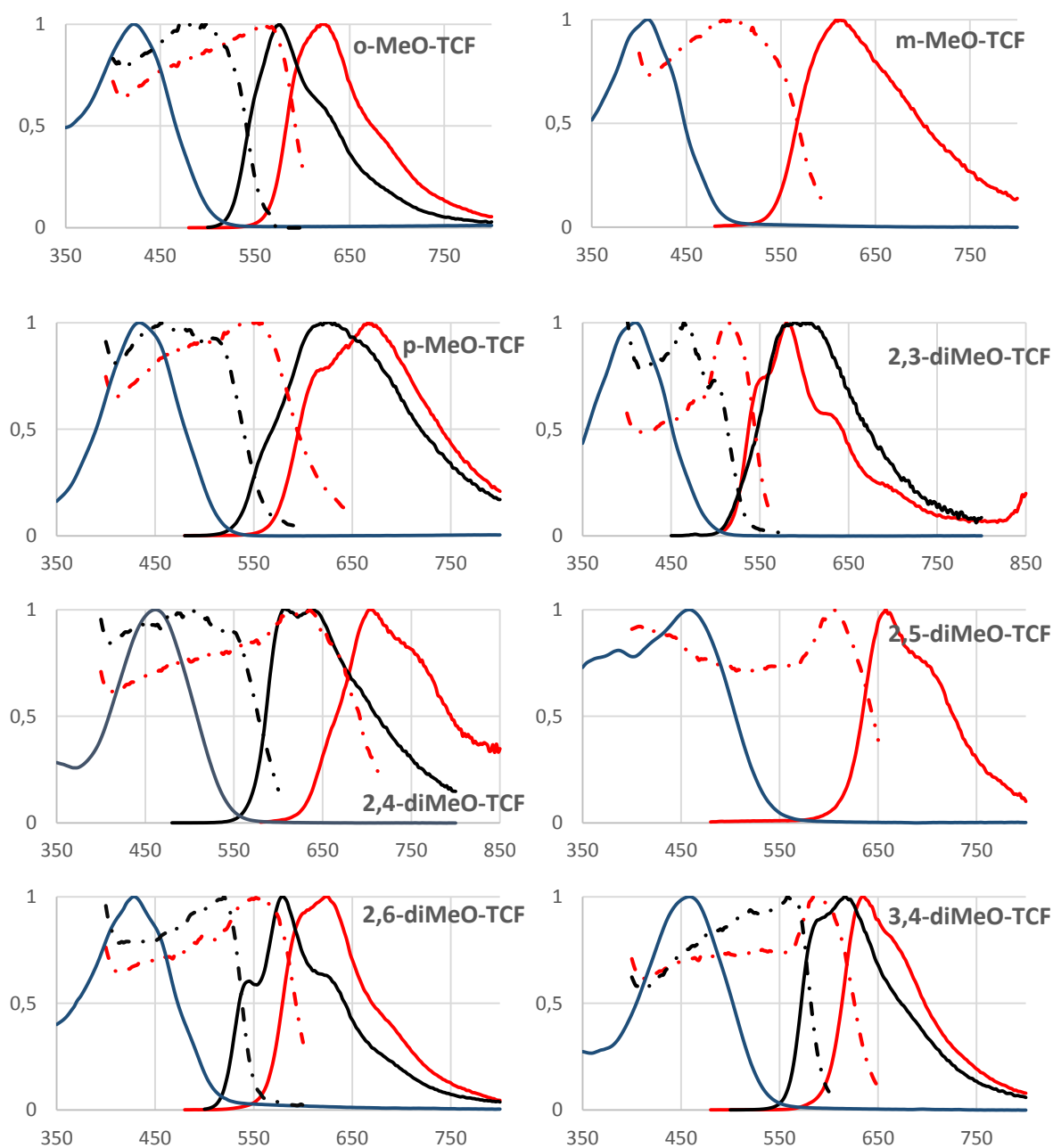


Figure IV-40. Spectres d'absorption dans le THF (bleu), d'excitation en suspension et à l'état solide (en pointillés respectivement noir et rouge) et spectres d'émission ($\lambda_{exc} = 460$ nm) en suspension (noir) et à l'état solide (rouge).

Chapitre IV : A la recherche d'un émetteur à l'état solide optimisé dans le rouge

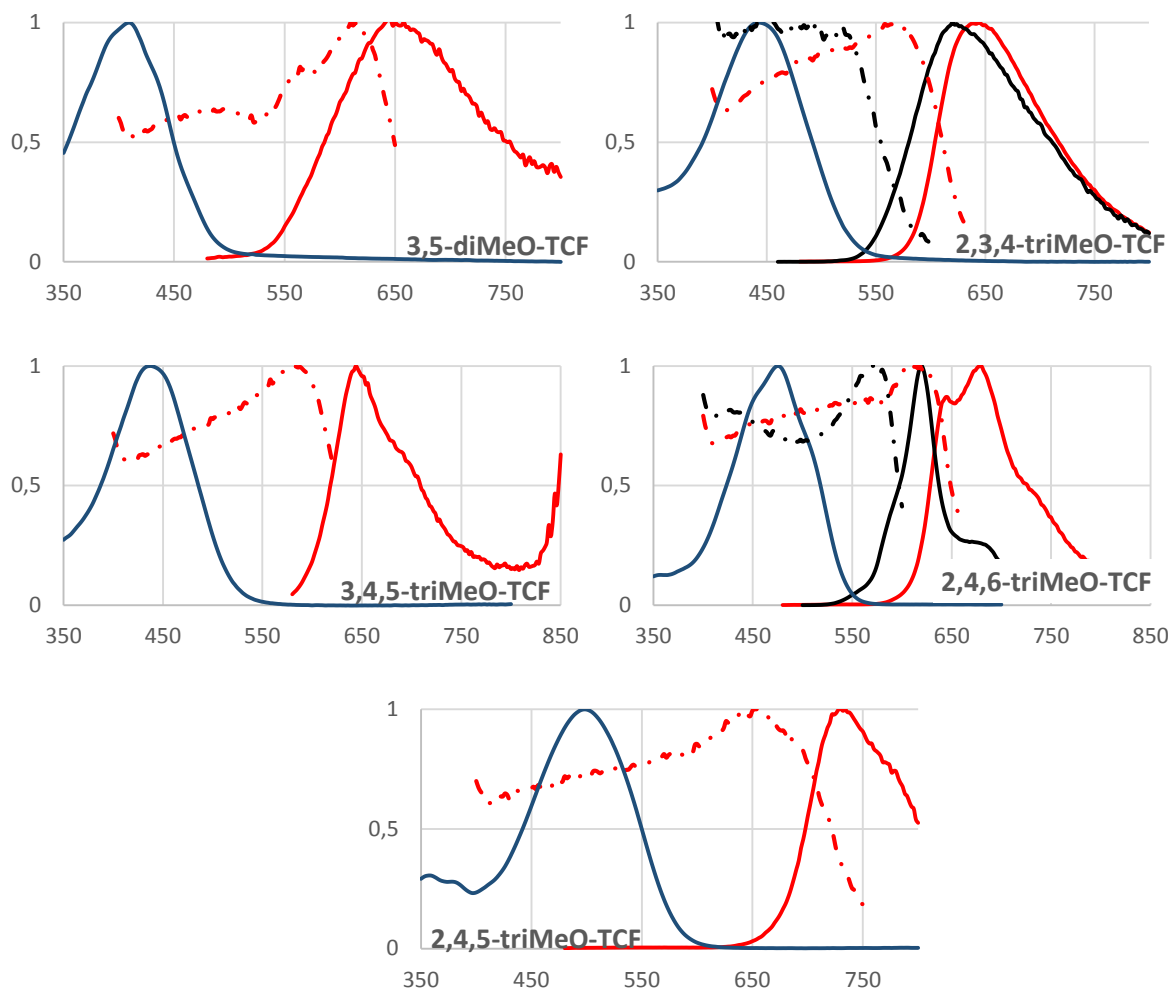


Figure IV-41. Figure IV-42. Spectres d'absorption dans le THF (bleu), d'excitation en suspension et à l'état solide (en pointillés respectivement noir et rouge) et spectres d'émission ($\lambda_{exc} = 460$ nm) en suspension (noir) et à l'état solide (rouge).

Les cinq fluorophores avec les émissions les plus intenses présentent des rendements quantiques au-dessus de 20 % pour des maxima d'émission qui vont de 620 nm (28 % pour ***o*-MeO-TCF** et 21 % **2,6-diMeO-TCF**) à 635 nm (20 % pour **3,4-diMeO-TCF**) et 645 nm pour (**2,3,4-triMeO-TCF**). Il est même possible d'atteindre des longueurs d'onde plus grandes avec un fluorophore porteur de trois groupements conjugués comme c'est le cas avec **2,4,6-triMeO-TCF** : 679 nm et 22 % de rendement quantique. Jusqu'à maintenant très peu de fluorophores organiques ont atteint ces valeurs à des longueurs d'ondes au-delà de 600 nm et comme expliqué dans l'introduction, ils sont basés sur des cycles conjugués bien plus larges. De plus, plusieurs fluorophores méthoxys présentent une fluorescence non négligeable dans le rouge lointain avec des maxima au-delà de 700 nm : 7 % à 704 nm pour **2,4-diMeO-TCF** et 5 % à 732 nm pour **2,4,5-triMeO-TCF**.

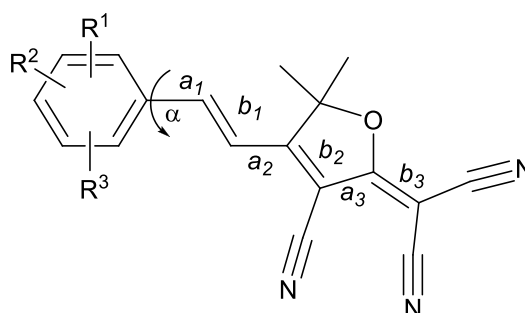
Dans la littérature, il est très rare que des molécules aussi petites présentent une émission intense à de telles longueurs d'onde. Cette fluorescence est due au groupement **TCF** très fortement

électroattracteur qui accorde à la molécule un très fort caractère de dipôle « push-pull ». Comme les spectres d'excitation sont extrêmement larges, il est possible d'utiliser une lumière excitatrice décalée d'une cinquantaine de nanomètres vers le bleu en conservant une intensité importante.

3.C. Structures cristallines

Pour comprendre plus en détails les propriétés spectroscopiques, nous avons étudié les structures cristallographiques de nos composés. En effet, une simple corrélation entre les substituants, que ce soit le nombre ou la position, et la fluorescence à l'état solide n'a pas permis de dégager de ligne directrice sur les propriétés spectroscopiques. L'étude de la maille cristalline pourrait mettre en évidence la formation d'agrégats H ou J, et ainsi expliquer certains des résultats obtenus. Les cristaux ont été obtenus par diffusion lente de vapeur d'éther diisopropylique dans une solution concentrée de notre composé dans le chloroforme. Des cristaux analysables par diffraction par rayons X ont été obtenus pour six des composés : un monométhoxy (*p*-MeO-TCF), quatre diméthoxy (**2,3-diMeO-TCF**, **2,4-diMeO-TCF**, **2,6-diMeO-TCF** et **3,5-diMeO-TCF**) et un triméthoxy (**2,3,4-triMeO-TCF**)

3.C.i Détails généraux



	a_1	b_1	a_2	b_2	a_3	b_3	α
<i>p</i>-MeO-TCF	1,463(3)	1,344(3)	1,435(3)	1,366(3)	1,445(3)	1,368(3)	0
2,3-diMeO-TCF	1,456(3)	1,351(2)	1,431(2)	1,364(2)	1,443(3)	1,368(3)	8,7
2,4-diMeO-TCF	1,433(4)	1,355(4)	1,421(4)	1,367(3)	1,430(3)	1,367(4)	1,8
2,6-diMeO-TCF	1,448(4)	1,353(4)	1,425(4)	1,369(4)	1,434(4)	1,363(4)	12,6
3,5-diMeO-TCF	1,469(2)	1,342(2)	1,433(2)	1,361(2)	1,448(2)	1,365(2)	0
2,3,4-triMeO-TCF	1,441(3)	1,356(3)	1,430(3)	1,366(3)	1,435(3)	1,373(3)	2,5

Tableau IV-6. Principaux paramètres intramoléculaires au sein du cristal. Ci-dessus, leur signification sur la molécule

Lorsqu'on considère une seule molécule dans la maille, la première observation possible est la très grande planéité des molécules. Seules les formes *trans* avec une double liaison E sont présentes, et ceci est confirmé en solution par analyses RMN (constante de couplage de 16,4 Hz). Le système

conjugué est quasiment plan avec une très faible torsion de la partie donneuse de la molécule (voir Tableau IV-6) : l'angle dièdre entre le plan du phényle et le reste de la molécule est au maximum de 12,6° pour **2,6-diMeO-TCF** (dû à l'encombrement des deux méthoxys). Le système conjugué présente une parfaite alternance de liaisons simples et doubles

3.C.ii Agrégats J

L'analyse des structures cristallographiques semble confirmer la présence d'agrégats J dans la maille cristalline. En accord avec les propriétés spectroscopiques, des agrégats de type J sont observés pour les cinq composés fluorescents. Les alignements de dipôles sont décalés les uns par rapport aux autres suivant un motif en escalier pour **p-MeO-TCF**, **2,3-diMeO-TCF** et **2,6-diMeO-TCF** et suivant un motif en chevron pour les deux autres. Le décalage des molécules les unes par rapport aux autres permet d'aérer la maille cristalline.

Ainsi, la maille de **p-MeO-TCF** présente une structure lamellaire avec des interactions privilégiées dans le plan des feuilletts. Chaque plan est constitué par des alignements infinis de dipôles parallèles les uns aux autres. Le plan moléculaire est contenu dans le plan des feuilletts et chaque ligne de molécule est décalée avec un angle de glissement de 42,7° (voir Figure IV-43), ce qui permet la création du motif en escalier typique des agrégats J. Il existe de nombreuses interactions à courte distance entre deux alignements différents avec par exemple une interaction entre l'oxygène du groupement méthoxy et les hydrogènes des méthyles du **TCF** ($d = 2,660 \text{ \AA}$) ou encore entre le nitrile central et les hydrogènes aromatiques ($d = 2,563 \text{ \AA}$). Deux feuilletts différents sont séparés par 3,5 Å et disposés de façon antiparallèle.

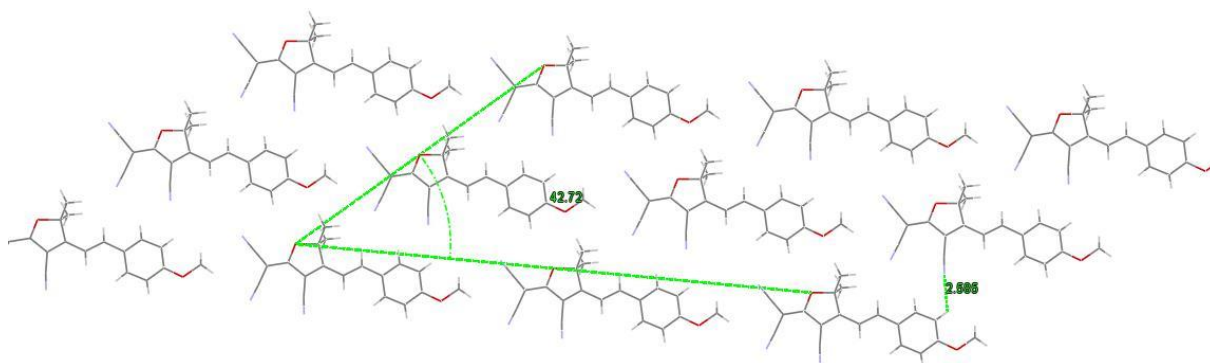


Figure IV-43. Vue de la structure cristallographique de **p-MeO-TCF** suivant l'axe *b* du packing. Les alignements sont séparés de 3 Å avec un angle de glissement de 42°.

Pour la molécule **2,4-diMeO-TCF**, le cristal est aussi composé de feuilletts antiparallèles séparés de 3,5 Å alignés suivant l'axe *c*. Cependant les molécules contenues dans chaque plan sont inclinées de 3° (Figure IV-44), ce qui aère là aussi la maille. Les alignements de molécules au sein d'un plan sont

décalés d'un angle de $42,1^\circ$. Chaque alignement est retourné par rapport à ses deux voisins, ce qui amène les mêmes côtés de la molécule à se faire face. De nouveau, les différents nitriles permettent de nombreuses liaisons hydrogènes avec les hydrogènes aromatiques ($d = 2,644 \text{ \AA}$, voir Figure IV-45).

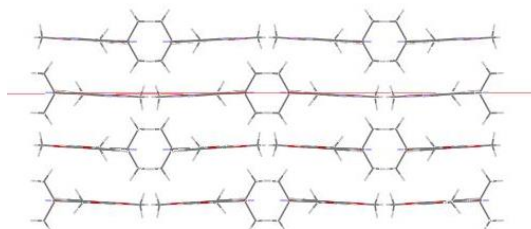


Figure IV-44. Vue suivant l'axe b de l'arrangement cristallographique de **2,4-diMeO-TCF** qui montre l'inclinaison des molécules (3°) par rapport au plan médian représenté en rouge.

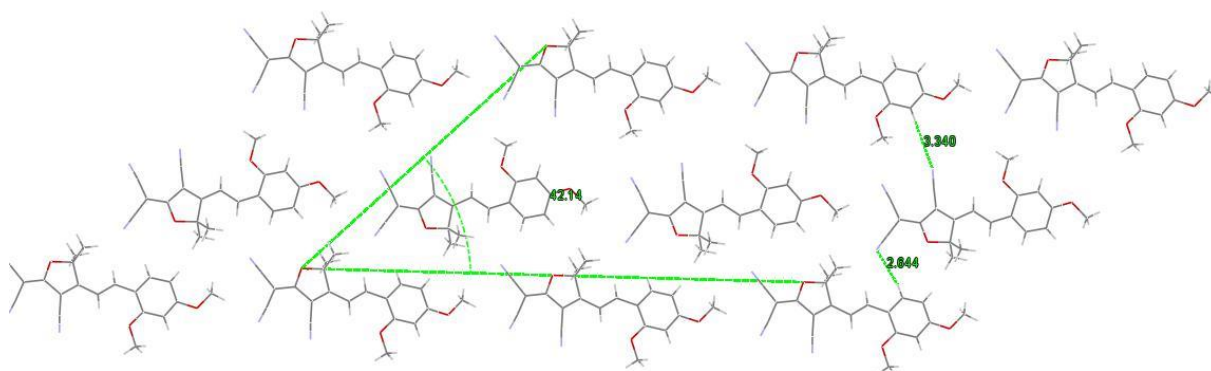


Figure IV-45. Vue suivant l'axe c de l'arrangement cristallographique de **2,4-diMeO-TCF** avec un angle de glissement de 42° et des alignements disposés de façon symétrique.

La molécule **2,6-diMeO-TCF** est aussi arrangée suivant des empilements de feuillets. Cependant, les molécules sont disposées perpendiculairement au plan qui les contient (voir Figure IV-46, gauche). Au sein d'un feuillet, deux alignements sont antiparallèles et distants de $3,3 \text{ \AA}$. Enfin, pour créer le motif en escalier, les alignements sont à nouveau décalés, avec un angle de $43,3^\circ$ (Figure IV-46, droite).

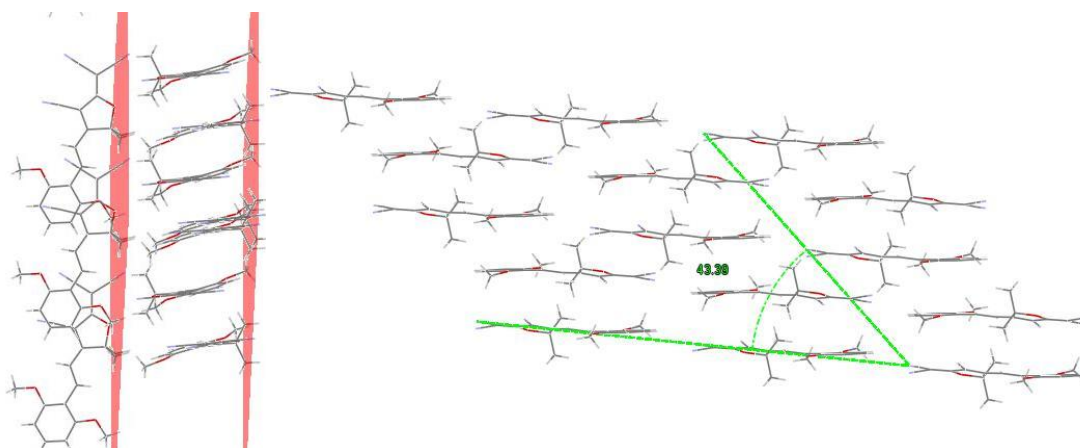


Figure IV-46 Vues suivant l'axe b (gauche) et a (droite) montrant l'inclinaison des molécules par rapport au plan du feuillet et l'angle de glissement au sein d'un feuillet.

De manière surprenante, deux feuillets sont twistés de $83,1^\circ$ (Figure IV-46), ce qui crée des interactions et des liaisons hydrogène entre les nitriles et les méthyles du **TCF** ($d = 2,7 \text{ \AA}$). La disposition orthogonale des feuillets entre eux forme un motif qui se rapproche de chevrons lorsqu'on regarde suivant l'axe c.

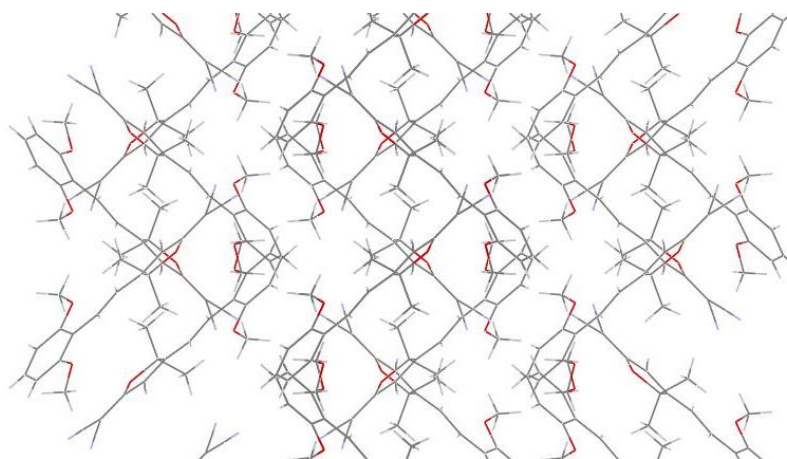


Figure IV-47 Vue suivant l'axe c de **2,6-diMeO-TCF** permettant de révéler le twist entre chaque feuillet qui donne naissance à un motif en chevron.

Les molécules **2,3-diMeO-TCF** et **2,3,4-triMeO-TCF** présentent, de leur côté, des alignements infinis mais brisés de dipôles. Comme on peut le voir sur la Figure IV-48, la structure cristalline de **2,3-diMeO-TCF** présente un alignement en chevrons.

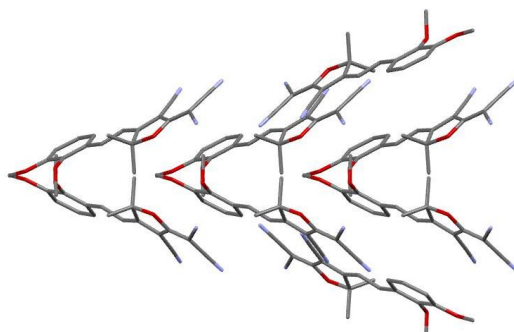


Figure IV-48. Structure en chevron de la maille cristalline de **2,3-diMeO-TCF**.

Pour **2,3,4-triMeO-TCF**, l'unité répétée est composée de deux alignements antiparallèles qui se font face avec des liaisons hydrogènes ($d = 2,812 \text{ \AA}$) entre les nitriles et les hydrogènes des méthoxys (voir Figure IV-49). Ces alignements sont translattés suivant une seule direction : l'axe b avec des liaisons hydrogènes entre les nitriles et les hydrogènes aromatiques ($d = 2,712 \text{ \AA}$ et $d = 2,562 \text{ \AA}$). Ces molécules sont inclinées de $34,1^\circ$ par rapport au plan vertical. Suivant l'axe a , ces alignements subissent une rotation de 68° qui crée le motif en chevron visible suivant l'axe c (Figure IV-49).

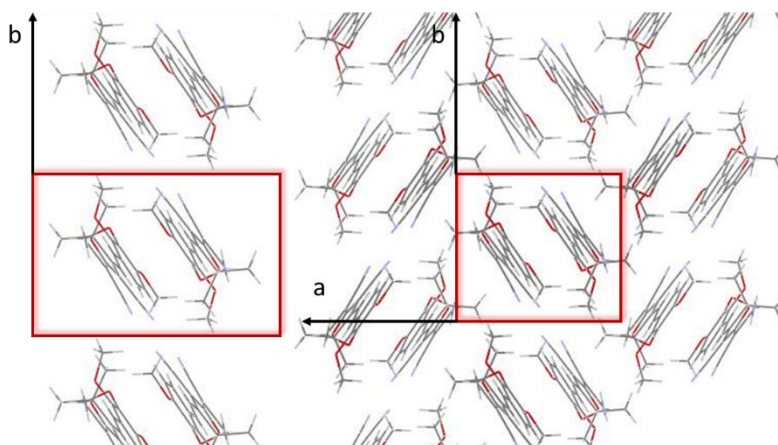


Figure IV-49. Structure cristalline de **2,3,4-triMeO-TCF**. Vue suivant l'axe c du motif répété (entouré en rouge, gauche) : deux lignes ininterrompues de dipôles antiparallèles. Celui-ci est translatté suivant l'axe b . Suivant l'axe a , ces motifs sont répétés avec une rotation de 68° (droite).

3.C.iii Agrégats H pour les molécules non fluorescentes

La molécule **3,5-diMeO-TCF**, qui n'est pas fluorescent, présente au contraire une structure en agrégat H. Les molécules sont disposées en feuillets avec le plan moléculaire contenu dans le feuillet. Il y a un empilement de dipôles disposés tête-bêche qui se font face à une distance de $3,475 \text{ \AA}$. Cet empilement crée des piles de systèmes conjugués suivant l'axe b . Chaque pile est connectée avec quatre autres piles adjacentes tournées de 90° à travers des liaisons hydrogènes entre le nitrile central et les hydrogènes aromatiques situés en para, entre les groupements méthoxys.

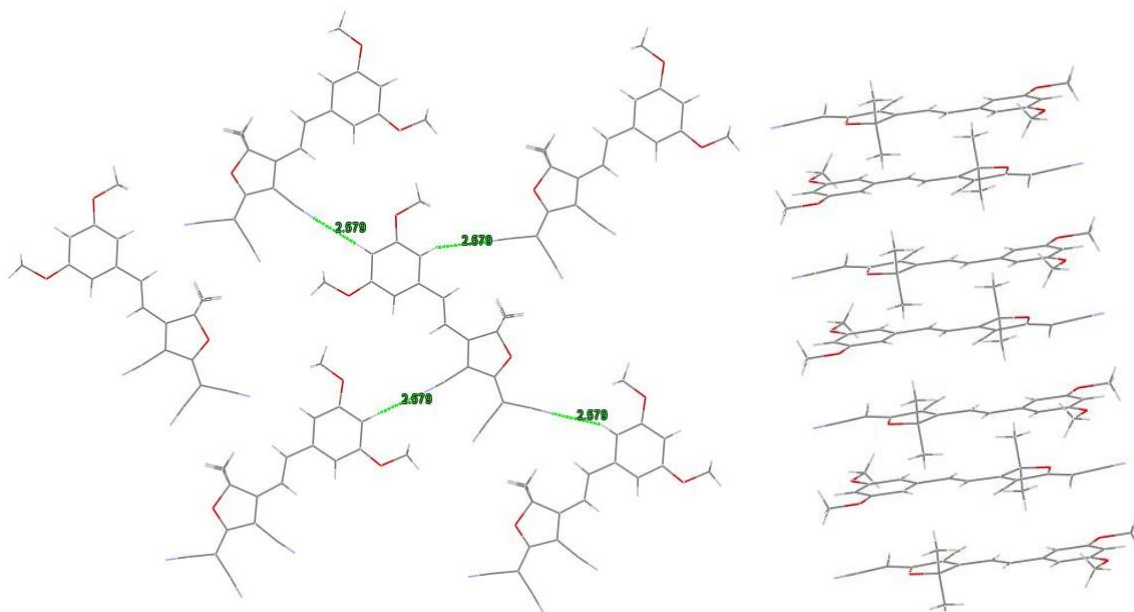


Figure IV-50. Gauche : vue suivant l'axe *b* (perpendiculaire au plan des molécules) mettant en évidence les interactions entre chaque pile. Droite : vue suivant l'axe *a* permettant de voir l'empilement tête-bêche au sein d'une pile.

IV.4 Variations du transfert de charge

La section précédente a montré que malgré une faible variation structurale, les propriétés spectroscopiques sont considérablement modifiées. Pour les améliorer, il est cependant nécessaire de diversifier la structure pour être capable de connaître l'effet d'autres groupements. Nous avons ainsi décidé de moduler les propriétés spectroscopiques en faisant varier la densité électronique sur le cycle aromatique à l'aide d'atomes d'halogènes, en utilisant un nouveau groupement électro-donneur, le carbazole ou en modifiant la conjugaison avec l'utilisation de naphthyle.

4.A. 3 familles différentes

La synthèse des cibles décrites dans les paragraphes suivant se termine avec la traditionnelle condensation de Knoevenagel. La méthode habituelle aux micro-ondes est suivie d'une purification à l'aide d'une chromatographie sur colonne. Comme elle est commune à toutes les molécules, les schémas de synthèse présentés dans les parties suivantes, n'indiqueront que les modalités pour obtenir l'aldéhyde.

4.A.i Halogène

Avec la famille halogénée, nous avons voulu étudier le remplacement d'un ou plusieurs hydrogènes par des atomes d'halogène. Les atomes lourds tels que l'iode ou le brome sont connus

pour favoriser les croisements inter-systèmes et atteindre l'état triplet qui se désexcite souvent par phénomène non-radiatif en participant à la formation de l'oxygène singulet. De plus, en solution, les atomes de fluor permettent un décalage vers le rouge des propriétés spectroscopiques et une augmentation de l'intensité comme on peut le voir avec les rhodamines ou les fluorescéines. Nous avons donc privilégié les composés porteurs d'atomes de fluor ou de chlore comme le présente la Figure IV-51. Pour des raisons de facilité d'accès, nous avons sélectionné six cibles. Avec les deux composés chlorés, on fait varier la position du méthoxy, celle du chlore étant fixée en position 3. Pour les composés fluorés, on effectue le contraire : le méthoxy est fixé en para et on fait varier le nombre et la position des fluors. Le composé **4-F-m-MeO-TCF** est particulier avec un méthoxy en position méta.

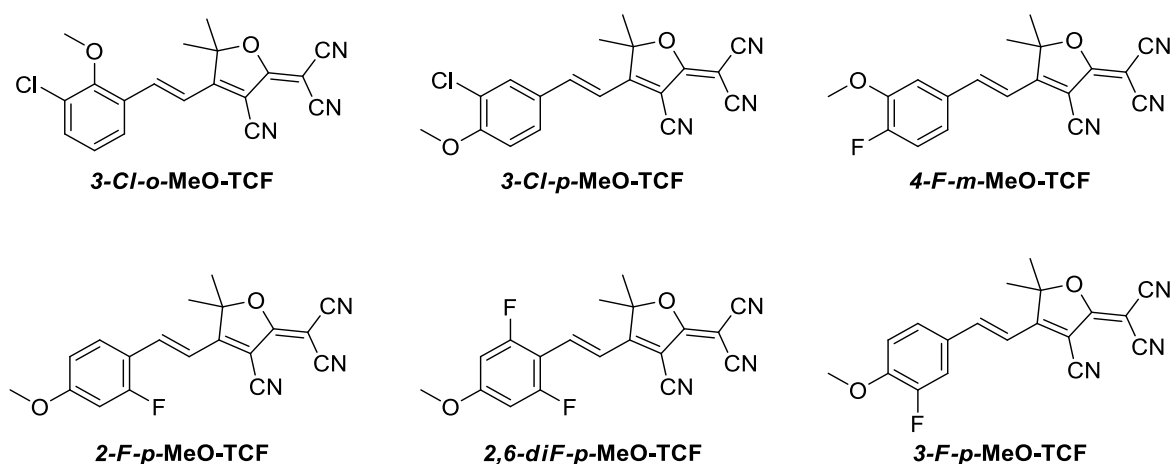


Figure IV-51. Fluorophores TCF faisant partie de la famille halogénée.

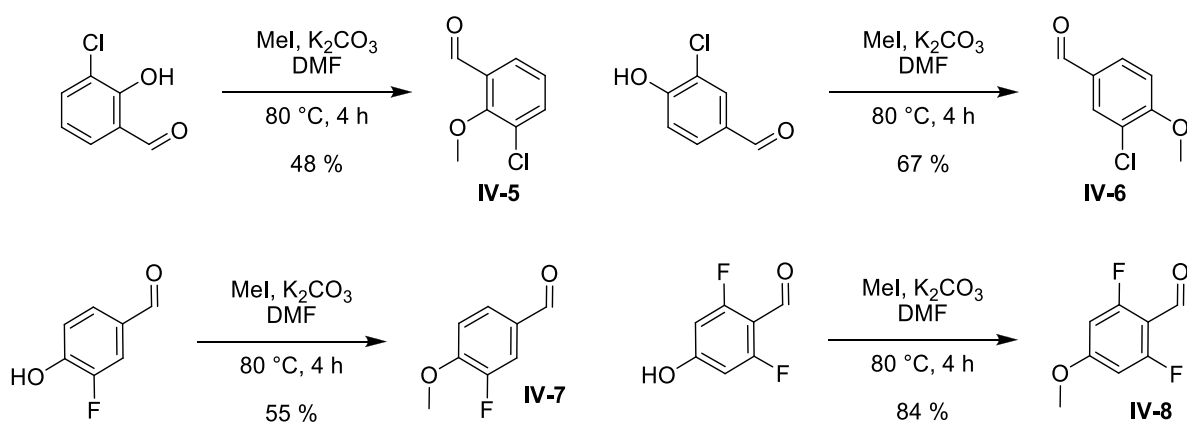


Figure IV-52. Méthylation d'hydroxybenzaldéhydes pour obtenir les intermédiaires méthoxybenzaldéhyde nécessaires à la synthèse des fluorophores halogénés.

Les aldéhydes correspondants aux composés **2-F-p-MeO-TCF**, **4-F-m-MeO-TCF** sont commerciaux. Pour les quatre autres, les dérivés hydroxybenzaldéhydes sont commerciaux. Une

méthylation de ceux-ci par l'iodométhane en présence de K_2CO_3 permet d'obtenir les aldéhydes (**IV-5** et **IV-6**, **IV-7** et **IV-8**) comme le montre la Figure IV-52.

4.A.ii Naphthyle

Parmi la famille naphthyle, nous n'avons sélectionné que trois représentants comme le montre la Figure IV-53. Nous avons voulu étudier l'importance du nombre de groupements méthoxys (un ou deux), mais surtout celle de l'orientation du noyau naphthyle en comparant **6-MeO-Naphthyl-2-TCF** et **4-MeO-Naphthyl-1-TCF**. L'aldéhyde correspondant au troisième fluorophore est commercial, tandis que les deux autres ont dû être synthétisés. Pour la première des deux molécules, une méthylation du groupement hydroxyle dans les mêmes conditions que précédemment permet d'obtenir le produit **IV-9** à partir de l'hydroxybenzaldéhyde commercial (voir Figure IV-54).

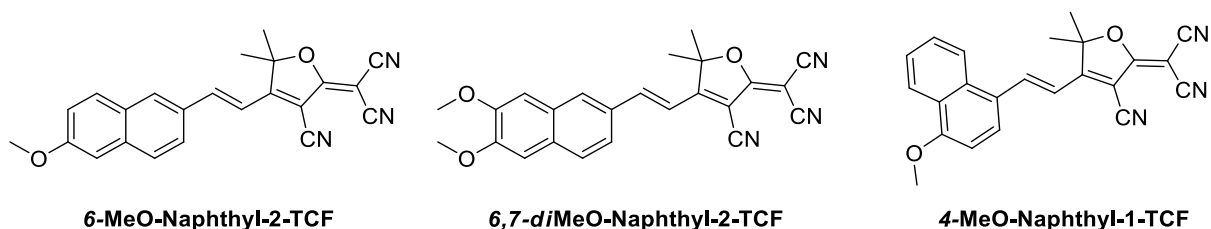


Figure IV-53. Molécules fluorescentes à l'état solide appartenant à la famille naphthyle.

Pour le dernier fluorophore de la famille, la synthèse, présentée Figure IV-54, est plus longue et inspirée de la synthèse de Naito *et al.*^[153]. Le 2,3-dihydroxynaphthalène est méthylié en présence de diméthyl sulfate et d'une base. Le produit **IV-10** précipite avec un rendement de 87 % et est utilisé sans purification dans l'étape suivante. Une acylation de Friedel et Craft avec l'anhydride acétique permet d'introduire la fonction carbonyle avec la régiochimie adéquate (**IV-11**). La cétone subit ensuite une coupure oxydante par l'ion BrO^- . Le brut réactionnel est versé dans l'eau et le produit **IV-12** précipite à pH acide. Ce dernier est réduit en alcool puis réoxydé en aldéhyde à l'aide de $LiAlH_4$ puis de PCC. Ces étapes ont des rendements élevés voire quantitatifs et permettent d'obtenir le composé **IV-14** à l'échelle du gramme et avec un rendement total de 61 %.

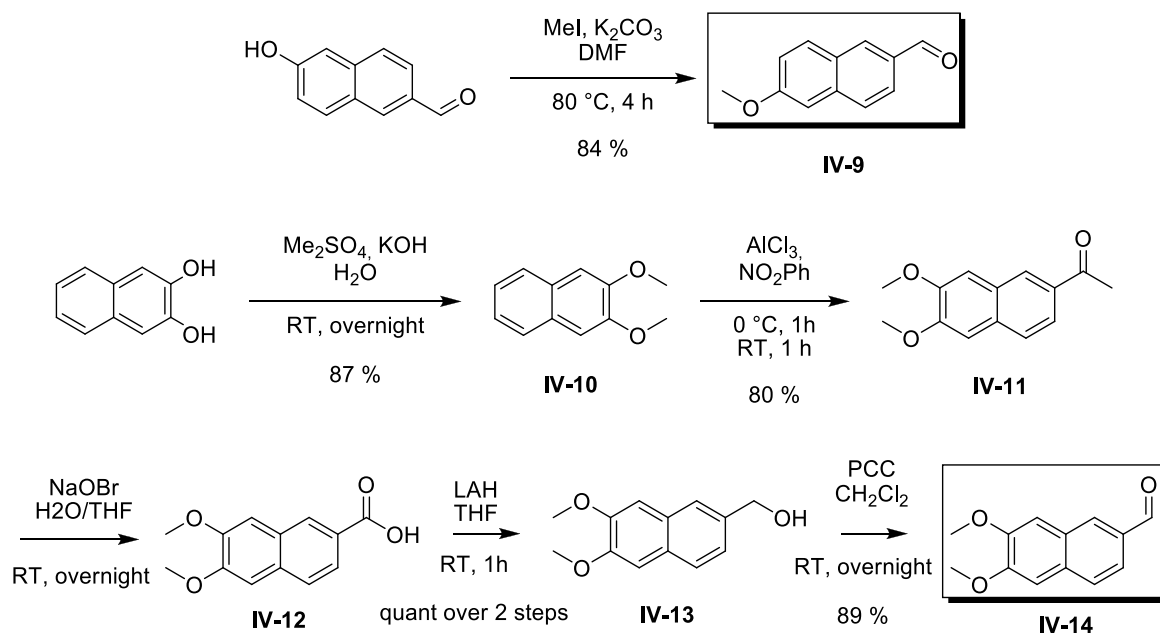


Figure IV-54. Synthèse des intermédiaires IV-9 et IV-14. Le premier est obtenu par méthylation de l'hydroxybenzaldéhyde. Le second grâce à une synthèse en cinq étapes. et un rendement global de 61 %.

4.A.iii Carbazole

La dernière famille, la famille carbazole compte elle aussi trois membres, décrits dans la Figure IV-55. Contrairement aux autres, **Cbz-TCF** ne compte pas de groupement méthoxy supplémentaire. **Cbz-3-MeO-TCF** porte celui-ci sur le cycle phényle tandis que **MeO-Cbz-TCF** le porte sur le carbazole.

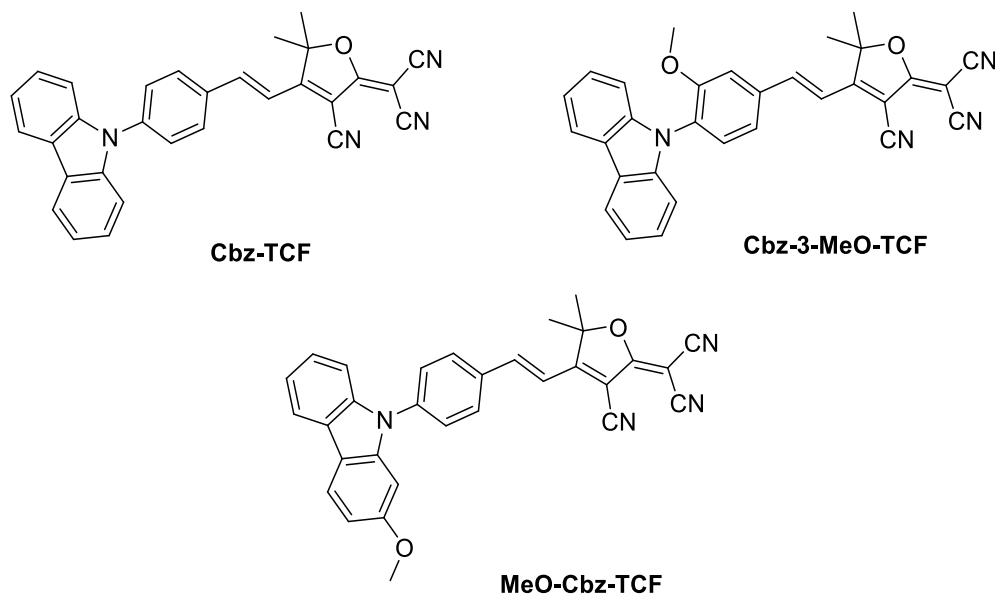


Figure IV-55. Fluorophores à l'état solide de la famille Carbazole.

Chapitre IV : A la recherche d'un émetteur à l'état solide optimisé dans le rouge

La synthèse des aldéhydes correspondants aux deux premières cibles s'est faite par un couplage entre le 4-fluorobenzaldéhyde, porteur si nécessaire d'un groupement méthoxy, et le carbazole (voir Figure IV-56). Les aldéhydes (**IV-15** et **IV-16**) sont obtenus après 36 heures à 110 °C en présence d'une base avec des rendements de respectivement 42 % et 34 %. Il n'a pas été possible d'obtenir l'aldéhyde **IV-18** par la même méthode. La stratégie alors adoptée est celle présentée par Kamino *et al.*^[154] : après une méthylation de l'hydroxycarbazole, le composé **IV-17** est N-arylé en conditions d'Ullmann avec l'iodobenzaldéhyde. Ce couplage est catalysé par la L-proline et permet d'obtenir l'aldéhyde désiré (**IV-18**) avec un très bon rendement (83 %).

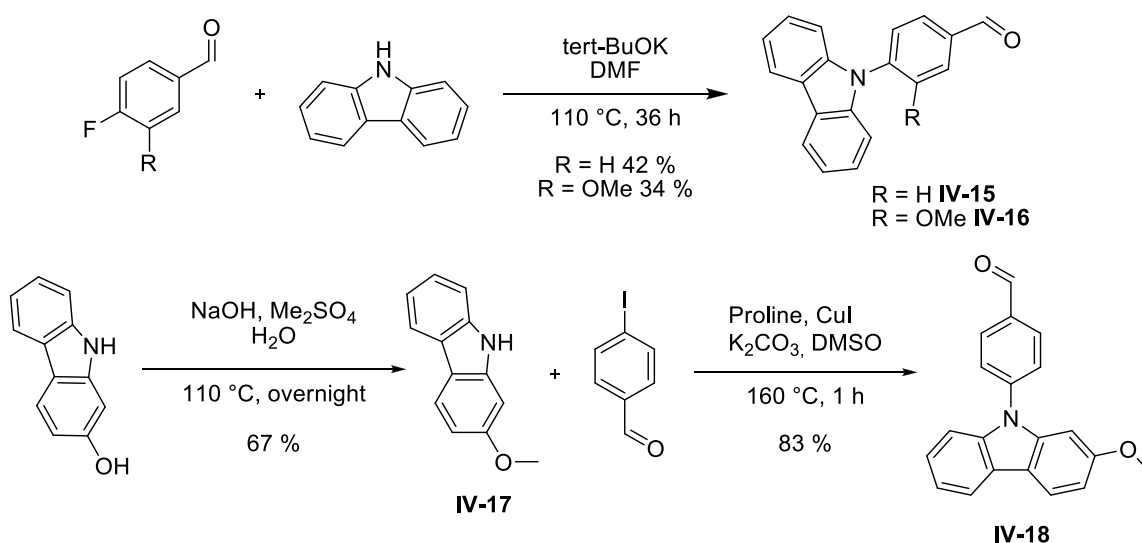


Figure IV-56. Synthèse des aldéhydes nécessaires à la famille carbazole.

4.B. Fluorescence

Comme on peut le voir sur la Figure IV-57, ces trois familles présentent des propriétés de fluorescence très différentes. Sous une lampe UV, on peut ainsi voir une fluorescence jaune, orange ou rouge suivant les composés. De plus, certaines molécules ont une fluorescence tellement décalée vers le rouge et le rouge lointain (au-delà de 700 nm) que celle-ci est à peine visible à l'œil nu.

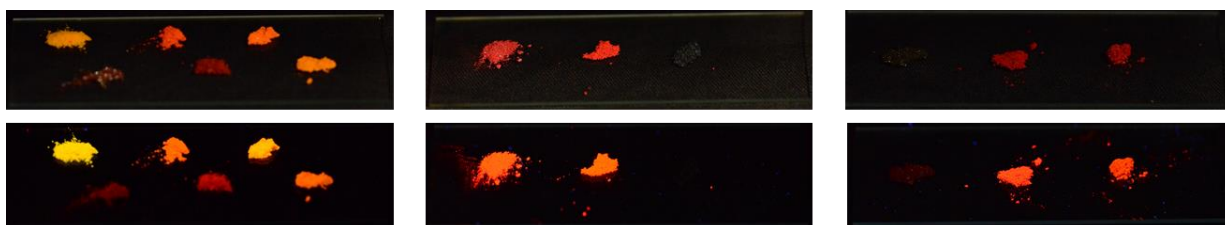


Figure IV-57. Photographies sous lumière blanche (haut) et sous UV ($\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$, bas) des trois familles de composés fluorescents à l'état solide. De gauche à droite : famille halogénée, famille naphthyle, famille carbazole.

4.B.i Propriétés à l'état solide

Les propriétés spectroscopiques des différents composés sont résumées dans le Tableau IV-7. La présence d'un atome d'halogène entraîne généralement un décalage hypsochrome. En comparant avec les composés hydrogénés correspondants, on peut par exemple voir un décalage de dix à vingt nanomètres vers le bleu en présence du fluor (Tableau IV-8) et de cinquante à soixante nanomètres pour les composés chlorés (Tableau IV-9). Cependant, c'est dans cette famille que les rendements quantiques sont les plus importants avec par exemple 41 % pour **4-F-m-MeO-TCF** (600 nm) et 36 % pour **3-Cl-o-MeO-TCF** (586 nm).

	λ_{exc}^a (nm)	λ_{em}^a (nm)	$\Delta\lambda^c$ (nm)	Φ_f^d (%)
3-Cl-o-MeO-TCF	520	586	66	36
3-Cl-p-MeO-TCF	550	606	56	15
2-F-p-MeO-TCF	570	705	35	4
4-F-m-MeO-TCF	546	600	54	41
2,6-diF-p-MeO-TCF	522	645	123	15
3-F-p-MeO-TCF	546	639	93	6
6-MeO-Naphthyl-2-TCF	592	628, 656 (s) ^b	70	21
6,7-diMeO-Naphthyl-2-TCF	580	626, 658 (s) ^b	48	21
4-MeO-Naphthyl-1-TCF	640	754	114	1
Cbz-TCF	662	740	78	11
Cbz-3-MeO-TCF	598	662	64	18
MeO-Cbz-TCF	566	638	72	9

Tableau IV-7. Propriétés de fluorescence à l'état solide des trois familles synthétisées. ^amaximum d'excitation et d'émission à l'état solide. ^bégalement, ^c différence entre les longueurs d'onde d'excitation et d'émission, ^dmesuré à l'aide d'une sphère d'intégration.

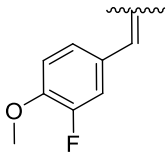
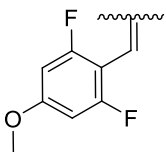
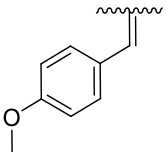
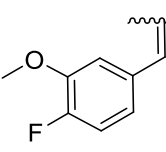
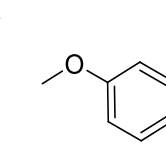
					
λ_{em} (nm)	639	645	666	600	612
Φ_f	6 %	15 %	14 %	41 %	4 %

Tableau IV-8. Comparaison des propriétés d'émission à l'état solide des composés fluorés avec leurs équivalents hydrogénés.

Chapitre IV : A la recherche d'un émetteur à l'état solide optimisé dans le rouge

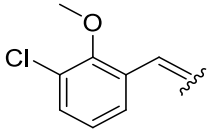
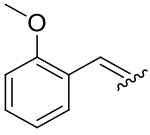
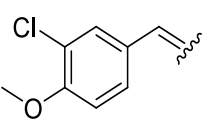
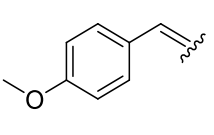
				
λ_{em} (nm)	586	620	606	666
Φ_f	36 %	28 %	15 %	14 %

Tableau IV-9. Comparaison des propriétés d'émission à l'état solide des composés chlorés avec leurs correspondants hydrogénés.

Pour les composés chlorés, une explication sur ce décalage hypochrome peut être apportée par l'agencement au sein du cristal. Par exemple, pour **3-Cl-o-MeO-TCF**, on retrouve une structure en feuillets distants de 3,5 Å et chaque feuillet est antiparallèle par rapport à ses voisins avec un décalage d'environ 2 Å. Au sein de chaque feuillet, on retrouve des chaînes ininterrompues de dipôles (voir Figure IV-58) avec une interaction entre un nitrile et le chlore (3,1 Å). Deux chaînes sont reliées par des liaisons hydrogènes entre le nitrile du groupement dicyano et les protons aromatiques (2,56 Å). L'angle de glissement entre les dipôles est relativement important : 64,9° (voir Figure IV-58), ce qui, d'après les prédictions de Kasha correspond plutôt à une structure en agrégat H et pourrait expliquer le déplacement des longueurs d'onde vers le bleu.

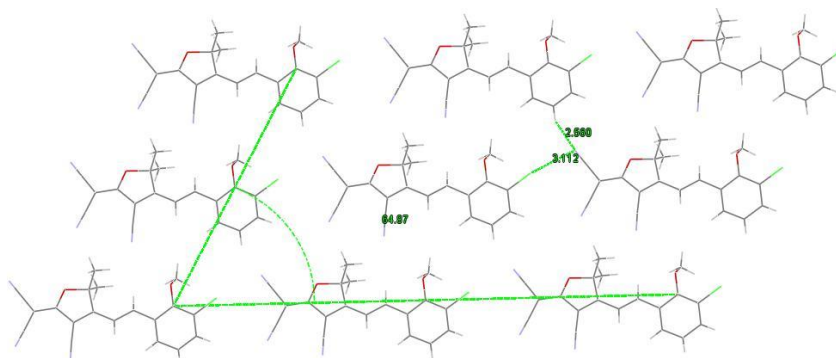


Figure IV-58. Structure cristallographique de **3-Cl-o-MeO-TCF** vue suivant l'axe *b* perpendiculaire aux feuillets. L'angle de glissement correspond à une structure en agrégat H.

Les composés naphthyles doivent être séparés en deux catégories suivant la géométrie du noyau aromatique : d'un côté, **6,7-diMeO-Naphthyl-2-TCF** et **6-MeO-Naphthyl-2-TCF** avec le groupement **TCF** en position 2 et de l'autre, **4-MeO-Naphthyl-1-TCF** avec une architecture perpendiculaire à l'axe MeO-TCF. Pour le premier, le remplacement du phényle par un naphthyle ne modifie pas beaucoup les propriétés de fluorescence : les maxima d'émission sont très faiblement déplacés vers le bleu et les rendements quantiques sont relativement proches (Tableau IV-10). Pour

pousser le mimétisme, on retrouve la même structure dans le spectre d'émission avec un épaulement autour de 630 nm (Figure IV-59).

Lorsqu'il n'y a qu'un seul méthoxy (**6-MeO-Naphthyl-2-TCF** qu'on peut comparer avec **p-MeO-TCF**) il y a une inversion entre les intensités des deux bandes principales située vers 620 nm et 666 nm (voir Figure IV-59). Ceci donne un maximum d'émission à 628 nm pour un cœur naphthyle et 666 nm avec un simple phényle. Cependant, le rendement quantique est supérieur (21 % contre 15 %) pour **6-MeO-Naphthyl-2-TCF**.

λ_{em} (nm)	618 (s), 666	628, 656 (s)	634, 650 (s)	626, 664 (s)
Φ_f	15 %	21 %	20 %	21 %

Tableau IV-10. Comparaison des propriétés de fluorescence entre les groupes phényles et naphthyles..

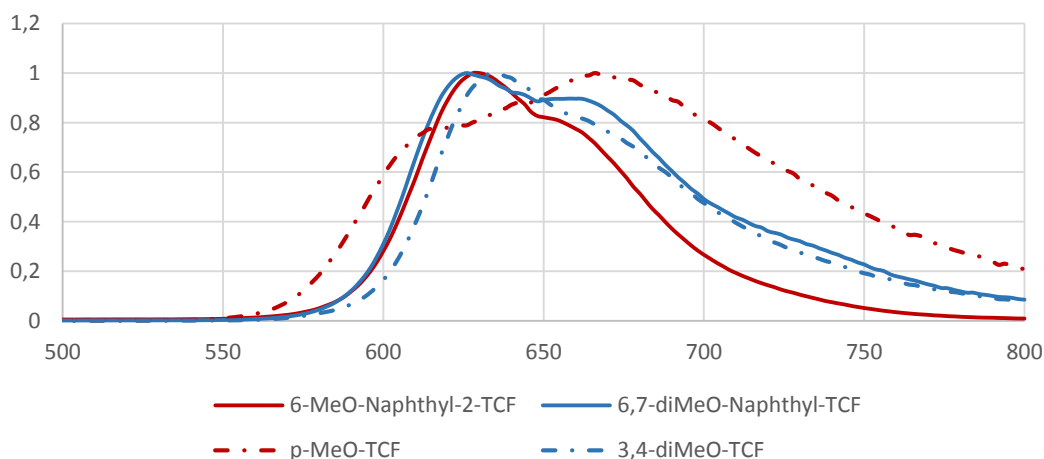


Figure IV-59. Spectres d'émission sur poudre des composés comparés dans le tableau précédent. $\lambda_{exc} = 460$ nm

Lorsque la substitution du naphthyle se fait en position 4, les propriétés sont considérablement changées. Le chapitre sur les sondes pH avait déjà mis en évidence un décalage vers le rouge de l'absorption et de la fluorescence de cette architecture. On peut aussi le voir sur les composés méthoxylés : la poudre rouge devient quasiment noire avec un maximum d'émission à 754 nm. Cependant, cela se fait au détriment de l'intensité de fluorescence car le rendement quantique est seulement de 1 %.

4.B.ii Le cas particulier de Cbz-TCF

Pour les composés substitués par un carbazole, l'introduction d'un atome d'azote permet de décaler la fluorescence vers le rouge. Cependant, contrairement aux composés **NPh₂-TCF** et **NMe₂-TCF** qui ne sont pas fluorescents, la substitution par un carbazole conserve une intensité de fluorescence non négligeable (voir Figure IV-60). Le composé **Cbz-3-MeO-TCF** par exemple présente un rendement quantique de 18 % pour un maximum d'émission à 658 nm. La fonctionnalisation du carbazole par un méthoxy décale vers le bleu la fluorescence (638 nm) avec un rendement plus faible (9 %).

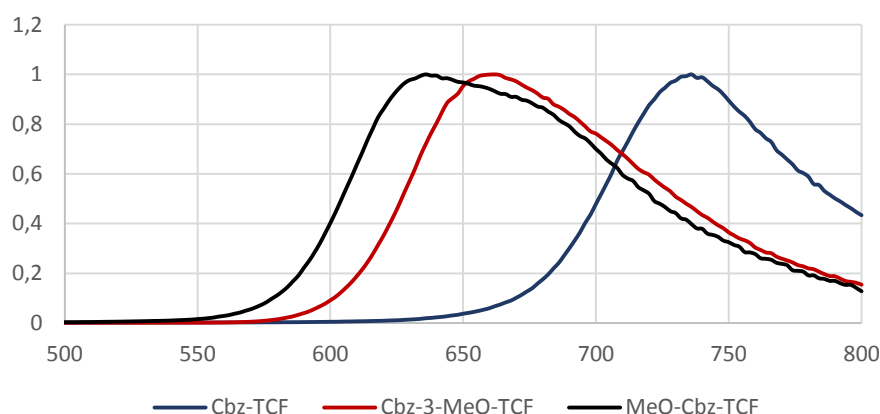


Figure IV-60. Spectres d'émission à l'état solide des composés porteurs d'un groupement Carbazole. $\lambda_{exc} = 460 \text{ nm}$

Le carbazole non substitué est un composé encore plus intéressant pour ses propriétés à l'état solide. A l'état solide, la poudre n'apparaît quasiment pas fluorescente à l'œil nu, car elle a un maximum d'émission à 740 nm, longueur d'onde pour laquelle l'œil n'est que très peu sensible. Malgré ce décalage bathochrome, le fluorophore conserve une émission intense avec un rendement quantique supérieur à 10 %. L'explication peut être trouvée dans la structure cristalline. Chacun des cycles (**TCF**, phényle et carbazole) est plan mais pas dans celui de ses voisins (voir Figure IV-61). Les angles dièdres sont respectivement de 39,1° entre le carbazole et le phényle et de 11,64° entre le **TCF** et le phényle (voir Figure IV-61, gauche). La molécule a ainsi une structure twistée en hélice. De plus, les molécules s'arrangent en feuillets avec des liaisons hydrogènes entre le nitrile central et les protons aromatiques du phényle central (2,716 Å et 2,640 Å). Les deux dipôles les plus proches sont décalés avec un angle de glissement de 47,3°, ce qui correspond à un agrégat J (voir Figure IV-61, droite).

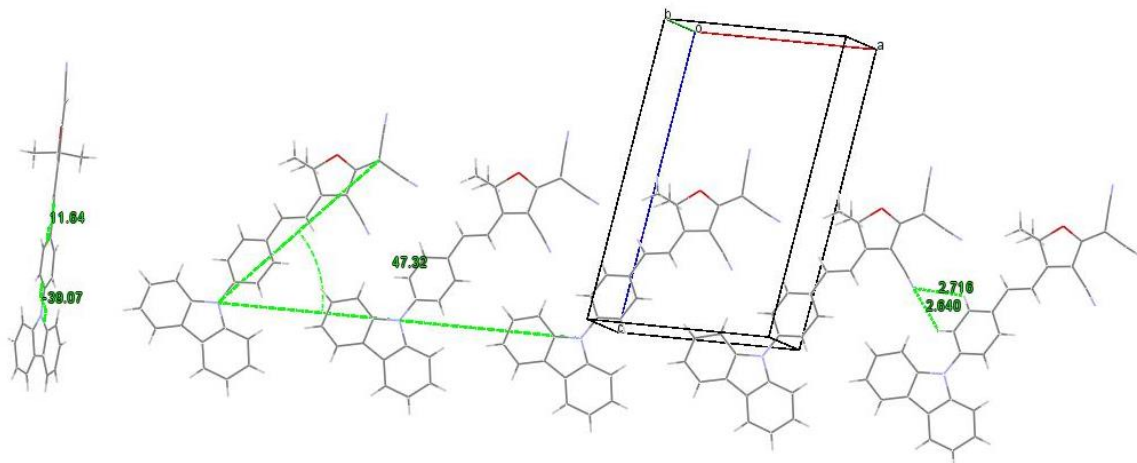


Figure IV-61. Gauche : vue depuis le plan du **TCF** d'une molécule de **Cbz-TCF** dans la maille cristalline. Droite : vue suivant *c* d'un feuillet avec les liaisons hydrogènes entre les nitriles et les protons aromatiques et l'angle de glissement de 47°.

Les feuillets sont disposés de façon antiparallèle mais relativement éloignée (3,7 Å) à cause de la structure twistée (voir Figure IV-62). Celle-ci empêche aussi toute interaction π - π , ce qui contribue à la diminution des désexcitations non radiatives.

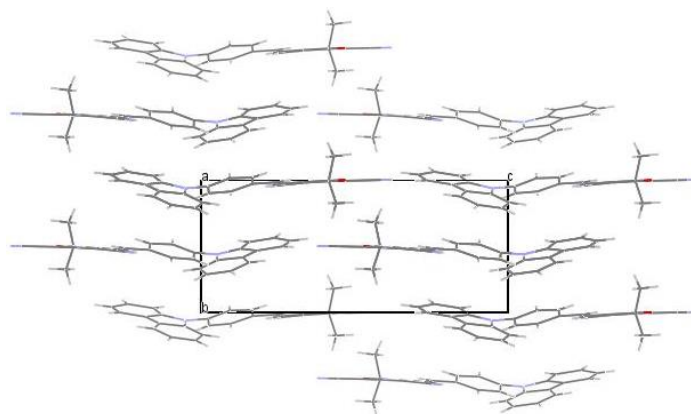


Figure IV-62. La structure twistée éloigne les différents plans et empêche les liaisons π - π . Spectres d'excitation (pointillés) et d'émission (traits pleins) des composés *o*-pH-**TCF** (noir), 3-Cl-*o*-pH-**TCF** (rouge) et 5-Cl-*o*-pH-**TCF** (bleu).

En plus de permettre une grande intensité à l'état solide, la structure twistée est favorable au phénomène d'AIE. Nous avons pu le vérifier avec le même type d'expérience que précédemment : alors que la solution dans le THF est extrêmement peu fluorescente, le composé commence à précipiter pour $f_w = 70\%$. Cette précipitation est accompagnée d'une émission extrêmement intense avec un maximum à 678 nm. Le rendement quantique maximum est atteint à 85 % d'eau et vaut 20%. Le facteur alpha associé est très important avec $\alpha_{AIE} = 375$.

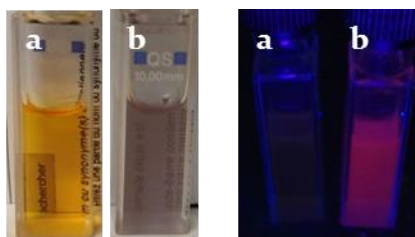


Figure IV-63. Photographies sous lumière blanche (gauche) et sous lampe UV (droite) d'une solution de Cbz-TCF (50 μM) dans une solution de THF (a) et dans un mélange THF/H₂O 15/85 (b)

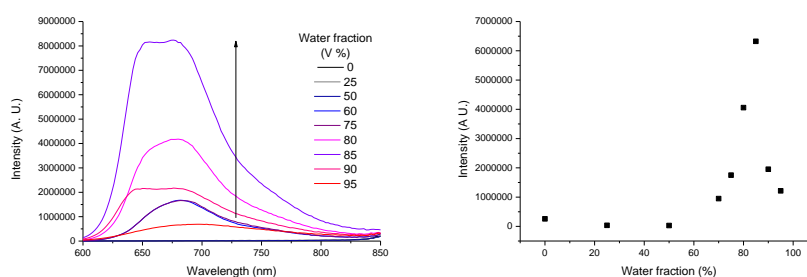


Figure IV-64. Spectres d'émission de Cbz-TCF (50 μM) dans un mélange THF/eau à différents f_w . (λ_{exc} = Droite : évolution de l'intensité maximum en fonction de f_w . Cbz-TCF présente un coefficient α supérieur à 375..

IV.5 Conclusions

Le travail effectué au cours de ce chapitre nous a permis d'étudier vingt-quatre fluorophores émissifs à l'état solide et de réaliser une ingénierie moléculaire pour réussir à décaler les longueurs d'ondes d'émission vers la fenêtre de transparence biologique. Jusqu'à présent aucune tentative de cette sorte n'avait été menée sur des dipôles porteurs d'un groupement TCF à cause du comportement des composés azotés qui ne sont pas fluorescents à l'état solide.

Les composés méthoxylés sont cependant de très bons exemples de molécules actives vis-à-vis de la précipitation : leur fluorescence est faible en solution mais augmente avec la viscosité. De plus, ils sont fluorescents à l'état solide, que ce soit sous forme de poudre ou en suspension dans un milieu aqueux. Le facteur α_{AIE} associé peut atteindre des valeurs au-delà de 100 pour ***o*-MeO-TCF**, ***2,6*-diMeO-TCF** et ***2,4,6*-triMeO-TCF**. La variation du nombre et de la position des groupements méthoxys a permis d'obtenir une gamme de fluorophores couvrant une large palette de longueurs d'onde situées entre 580 et 730 nm avec des rendements quantiques supérieurs à 20 % pour les plus intenses : 620 nm pour ***o*-MeO-TCF** (28 %), 624 nm pour ***2,6*-diMeO-TCF** (21 %), 634 nm pour ***3,4*-diMeO-TCF** (20 %) et 679 nm pour ***2,4,6*-triMeO-TCF** (22 %). Les structures cristallographiques ont confirmé l'agencement en agrégat *J* au sein de la phase condensée.

En diversifiant la structure à l'aide d'atomes d'halogènes comme les fluors ou les chlores, il est possible d'augmenter les rendements quantiques jusqu'à des valeurs de 36 % (**3-Cl-o-MeO-TCF**) et 41 % (**4-F-m-MeO-TCF**) au prix d'un décalage hypsochrome des longueurs d'onde d'émission (respectivement 586 nm et 600 nm). Au contraire, l'utilisation d'un groupement carbazole entraîne des déplacements bathochromes jusqu'à un maximum de 740 nm (10 % en rendement quantique) pour **Cbz-TCF**. Cette molécule est aussi particulièrement active vis-à-vis de la précipitation puisqu'il est possible d'obtenir des nanoparticules présentant un maximum à 678 nm et un rendement quantique de 20 %.

Une dizaine de fluorophores présentant des rendements quantiques supérieurs à 20 % et émettant dans le rouge à partir de 580 nm ont été synthétisés. Afin d'exploiter pleinement le potentiel de ces molécules, des études d'optique non linéaire sont en cours au sein du laboratoire en collaboration avec Patrice Baldeck pour mesurer l'absorption à deux photons au sein du solide. De plus, en vue d'applications en imagerie biologique, ces molécules ont été incorporées au sein de nanoparticules de pluronic 127, et les résultats préliminaires montrent une conservation des propriétés. Elles seront prochainement testées en collaboration avec l'équipe de B. Van der Sanden à Grenoble pour des études d'angiographie. Nous avons, de notre côté, voulu utiliser ces sondes pour une détection d'activité enzymatique qui est évoquée dans le chapitre suivant.

Chapitre V Activité enzymatique et fluorescence

Avec la compréhension des phénomènes d'AIE et le développement de nouveaux fluorophores, de nombreuses équipes se sont intéressées à la fluorescence à l'état solide pour des applications en imagerie *in-vitro* : détection de sucres, de protéines ou d'activité enzymatique.

Pour valoriser les différents fluorophores synthétisés au chapitre précédent, nous avons voulu tirer profit du phénomène AIE pour créer des sondes fluorogéniques de type « OFF/ON ». Ce type de sonde, initialement éteinte (mode « OFF ») est allumée par l'action de la molécule d'intérêt. Dans notre cas, l'utilisation de l'AIE pour détecter l'activité enzymatique est basée sur la libération et la précipitation du fluorophore (Figure V-1). La sonde comporte au moins deux éléments, le substrat d'enzyme et le fluorophore proprement dit. Cette sonde est soluble en milieu aqueux et le fluorophore est censé être non fluorescent. L'enzyme ciblée va ensuite cliver le lien avec le substrat, ce qui libère le fluorophore. Si la sonde est bien construite, celui-ci précipite dès qu'il atteint la concentration critique et cette précipitation s'accompagne de l'apparition de la fluorescence. Ce n'est que récemment que des sondes pour l'activité enzymatique ont été construites sur ce principe. Elles peuvent se résumer à deux grandes familles, selon le type du fluorophore libéré.

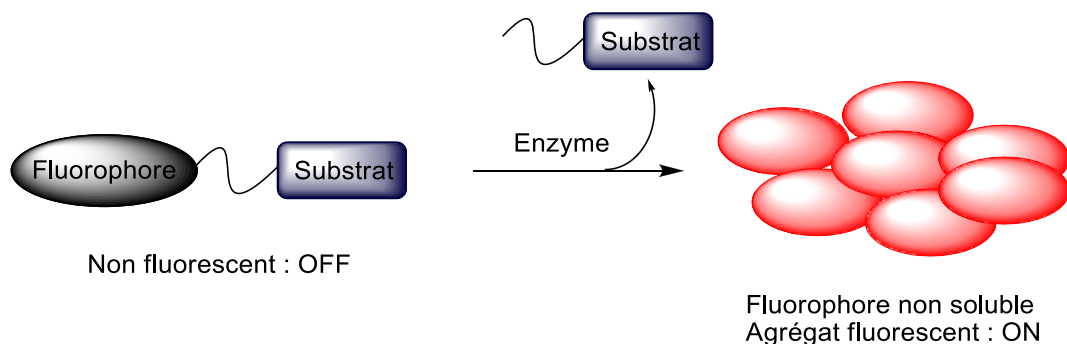


Figure V-1. Stratégie de sonde fluorogénique utilisant la précipitation du fluorophore : l'enzyme clive la liaison entre le substrat et le fluorophore. Ce dernier précipite et forme un agrégat fluorescent.

V.1 Fluorescence à l'état solide et imagerie biologique

1.A. Les avantages de la fluorescence à l'état solide

Une approche régulièrement utilisée pour l'imagerie biologique est de greffer un fluorophore directement sur l'enzyme d'intérêt. Mais cette approche, outre qu'elle peut modifier l'activité de l'enzyme si le site de liaison est mal placé, permet seulement de suivre la position de l'enzyme et non

son activité. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés aux sondes qui libèrent un fluorophore après activité enzymatique.

1.A.i Non diffusion du fluorophore

En général, les sondes enzymatiques sont basées sur des fluorophores solubles en milieu aqueux (fluorescéine, coumarine, cyanine, etc). Le principal défaut de ces sondes concerne la diffusion de l'espèce émissive. En effet, ces molécules n'ont pas forcément d'affinité particulière avec le cytoplasme et sont rapidement excrétées hors de la cellule. La fluorescence n'est alors plus localisée là où agit l'enzyme mais peut se répandre et teinter tout le milieu de culture (voir Figure V-3, E). Le rapport signal sur bruit est alors réduit car un fluorophore qui sort de la cellule ne fait plus partie du signal que l'on recherche mais du bruit de fond.

Un second inconvénient apparaît alors quand on veut conserver un faible bruit de fond et que le milieu de culture est alors changé. Même si cela permet de diminuer le bruit de fond, c'est surtout le signal qui est atténué. En effet, on changeant le milieu environnant, on crée un déséquilibre entre les concentrations intra et extra cellulaires, ce qui entraîne à nouveau une diffusion du fluorophore. Après seulement deux ou trois lavages, l'intensité de fluorescence mesurée est extrêmement faible. Un exemple est donné dans la Figure V-2, où l'on voit la perte de fluorescence d'un milieu contenant des fluorophores solubles (L-méthylumbélférone) comparé à un milieu où le fluorophore ne diffuse pas^[156].

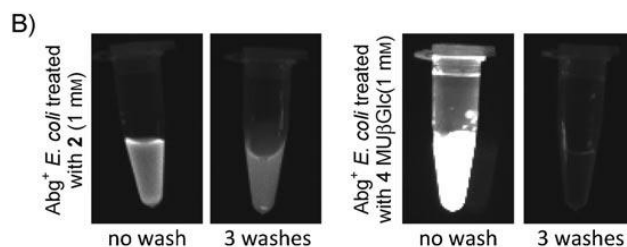


Figure V-2. Cellules exprimant la β -glucosidase *Abg* traitées avec une sonde se liant à l'enzyme (gauche) ou avec une sonde soluble (droite) avant et après lavage. Adapté de ^[156]

Différentes solutions ont été proposées pour diminuer la diffusion des fluorophores. La première^[156], utilisée dans la Figure V-2, consiste en la libération d'un fluorophore hautement réactif (habituellement une quinone méthyle) qui réagit avec l'enzyme et forme une liaison covalente avec celle-ci. Cependant, cette approche aboutit généralement à un empoisonnement du site actif car le fluorophore n'a pas le temps de le quitter avant de réagir. Les espèces anioniques sont aussi connues pour présenter une moindre diffusion, avec un passage très difficile de la membrane cellulaire. Le

signal est donc moins diffus mais il y a quand même un bruit de fond gênant la compréhension des phénomènes au sein de la cellule.

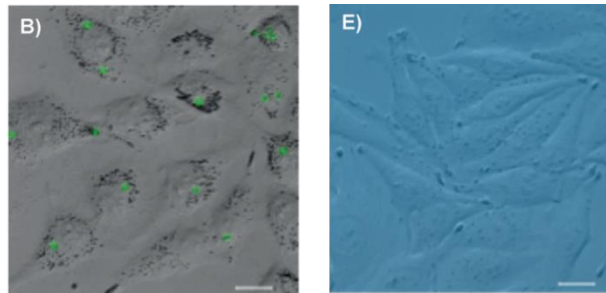


Figure V-3. Images obtenues au microscope de cellules incubées en présence d'une enzyme libérant un fluorophore insoluble (B) et un fluorophore soluble (E) après 2 heures d'incubation. Adapté de [155]

Enfin, et c'est la solution que nous avons choisi, il est possible d'utiliser des fluorophores qui, une fois libérés, vont précipiter au sein de la cellule. En utilisant un fluorophore qui précipite, on peut voir dans la Figure V-3 que la fluorescence est extrêmement localisée avec un seul spot par molécule et les problèmes précédents ne se posent plus.

1.A.ii Longueur d'onde

Un autre avantage de la fluorescence à l'état solide par rapport à la solution vient de la différence des propriétés spectroscopiques entre une solution et un agrégat : les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont généralement déplacées vers le rouge au cours de la précipitation comme on a pu le voir au cours du chapitre précédent : **3,4-diMeO-TCF** présente ainsi un décalage de 22 nm vers le rouge entre la solution et la suspension. Ce phénomène permet de se rapprocher de la fenêtre de transparence biologique et de tous les avantages qu'elle comporte.

De plus, à l'état solide, le spectre d'excitation est relativement large, il est donc possible de choisir sa longueur d'onde d'excitation en conservant une intensité d'émission relativement importante. En cas de présence d'autres composés, on dispose ainsi d'une large gamme de longueurs d'onde pour essayer d'être sélectif du fluorophore.

1.A.iii Stabilité et toxicité

Enfin, un dernier avantage des fluorophores à l'état solide est leur grande stabilité vis-à-vis du photo-blanchiment. Un exemple est fourni dans la Figure V-4 : la stabilité du fluorophore à l'état solide **ELF** (qui sera décrit dans le paragraphe 1.C.i) est comparée avec celle de la fluorescéine : avec une intensité Laser suffisante pour photo-blanchir 80 % de la fluorescéine, l'intensité de fluorescence du fluorophore ELF demeure quasiment inchangée.

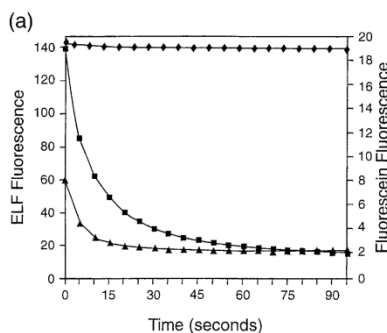


Figure V-4. Comparaison de la photostabilité de l'ELF et de la fluorescéine. Les diamants représentent ELF, les carrés représentent la fluorescéine.

Outre l'augmentation des temps d'observation, une sonde plus stable ne va pas se décomposer et ne va pas libérer des espèces hautement réactives pouvant endommager la cellule. Le précipité lui-même est neutre chimiquement, il ne peut pas réagir avec les différentes protéines présentes dans la cellule, ce qui entraîne une faible toxicité pour la cellule. C'est le grand avantage de cette approche par rapport aux fluorophores qui réagissent et se fixent sur l'enzyme cible.

1.B. L'AIE au service de l'imagerie biologique

Les premières applications biologiques du phénomène AIE ont été sur la détection d'espèces moléculaires ou d'enzymes mais non leur activité. Le principe est de jouer sur l'assistance à la précipitation pour obtenir un allumage de la fluorescence.

1.B.i Formation de complexes supramoléculaires

Il est possible de synthétiser une sonde spécifique d'une cible en greffant des substituants qui ont une forte affinité pour celle-ci sur un cœur actifs vis-à-vis de l'AIE comme par exemple le Tétraphényléthylène (TPE).

Un exemple a été apporté par Liu *et al.*^[157] : à l'aide d'acides boroniques, il est possible de détecter sélectivement le glucose en milieu basique. Comme on peut le voir sur la Figure V-5, la molécule **TPE-(B(OH)₂)₂** n'est soluble en milieu aqueux qu'à un pH supérieur à 9 car le bore capte un ion hydroxyle et les deux charges présentes rendent la sonde soluble (voir Figure V-5). A faible concentration en glucose, il y a une formation d'un adduit avec un seul glucose qui ne change pas les propriétés de solubilité et de fluorescence (en bleu sur la figure). En augmentant la concentration en glucose, il est cependant possible de former des oligomères (en rouge). Ces oligomères sont responsables de restrictions de rotations moléculaires, et amènent ainsi une augmentation de la fluorescence. Comme le glucose est le seul sucre à proposer deux unités diols en configuration cis,

c'est le seul qui forme ce type d'oligomères. Ainsi, seul le glucose permet une augmentation de la fluorescence (Voir Figure V-5).

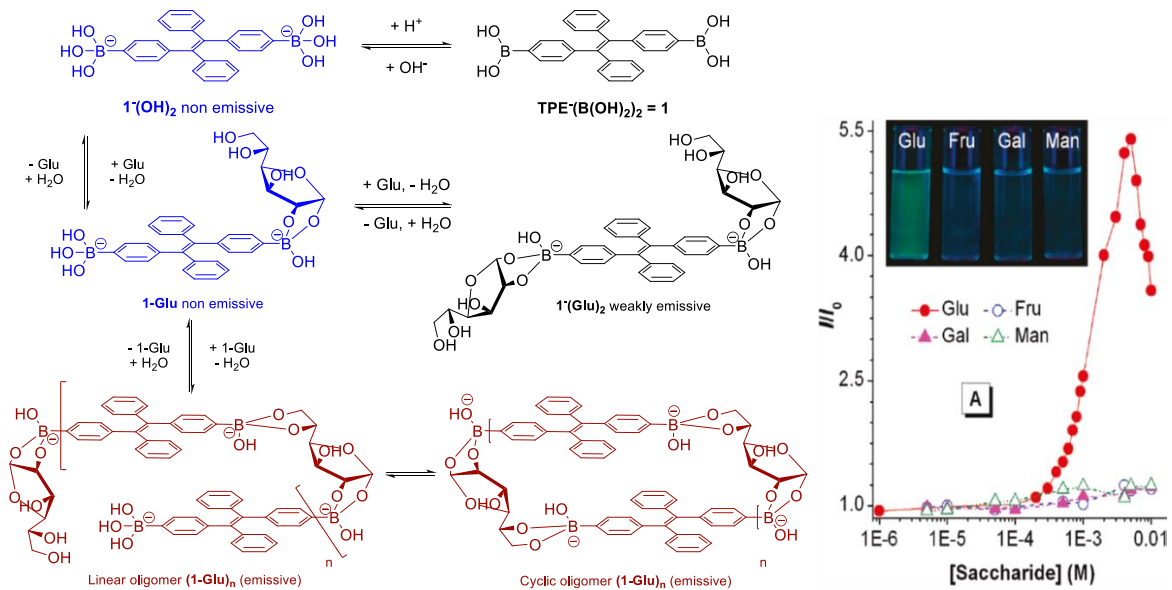


Figure V-5. Gauche : Principe de détection de glucose par formation d'oligomères avec la sonde $TPE(B(OH)_2)_2$. Droite : Variation de l'intensité de fluorescence de la sonde ($50 \mu M$) à 485 nm en fonction de la concentration en sucre dans un tampon à $\text{pH } 10$ contenant 2% en DMSO. En insert : photographies s en présence de divers sucres. Adapté de [157]

Pour continuer sur les sucres, ces derniers sont connus pour avoir une grande affinité avec certaines glycoprotéines telles la lectine. Le greffage de saccharides sur un oxyde de phosphole comme l'ont fait Sanji *et al.* [158] permet ainsi de créer une sonde qui s'allume en présence de l'enzyme par complexation sur la périphérie de celle-ci (voir Figure V-6). La fluorescence apparaît en une vingtaine de seconde accompagnée d'une augmentation de la turbidité indiquant la précipitation de l'ensemble.

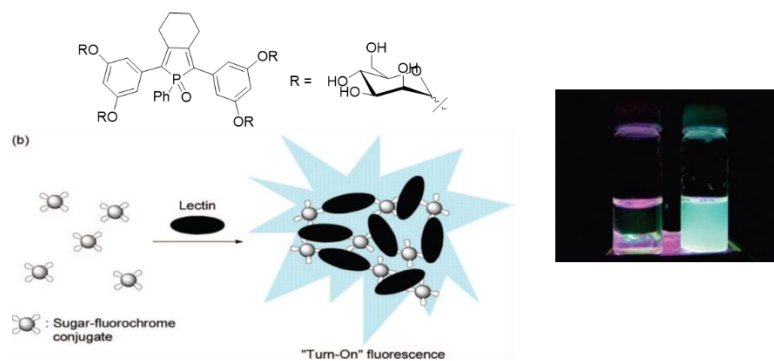


Figure V-6. Exemple de sonde qui précipite en présence de lectine par complexation. La structure phosphole a été développée par Sanji *et al.* [158] Droite : photographie d'une solution de la sonde en tampon à $\text{pH } 7,6$ en absence (gauche) et présence (droite) de lectine.

Les fluorophores AIE sont sensibles à la rigidité de leur environnement. Un changement de conformation peut alors entraîner des modifications de fluorescence. La sonde **BSPOTPE** (Figure V-7)

a ainsi été utilisée pour détecter la présence d'albumine^[159], mais aussi le processus de repliement de la protéine^[160]. La sonde présente principalement des interactions hydrophobes avec l'albumine et va donc se loger dans la cavité hydrophobe. En présence de chlorure de guanidinium (**GndHCl**), la protéine est dénaturée et s'ouvre. Cette évolution est réalisée en trois étapes, correspondant à trois transitions dans la fluorescence comme le montre la Figure V-7. Une séparation des trois domaines de la protéine provoque la fuite de la sonde en solution et entraîne une baisse de la fluorescence. Un intermédiaire stable est ensuite constitué et correspond à une augmentation de la fluorescence. Celle-ci peut être expliquée par les restrictions de rotations au sein d'hélices dans une structure secondaire de la protéine. Enfin, en augmentant encore la concentration en guanidine, il y a une dénaturation totale de la protéine qui provoque une extinction totale de la fluorescence car la sonde est relâchée dans le milieu.

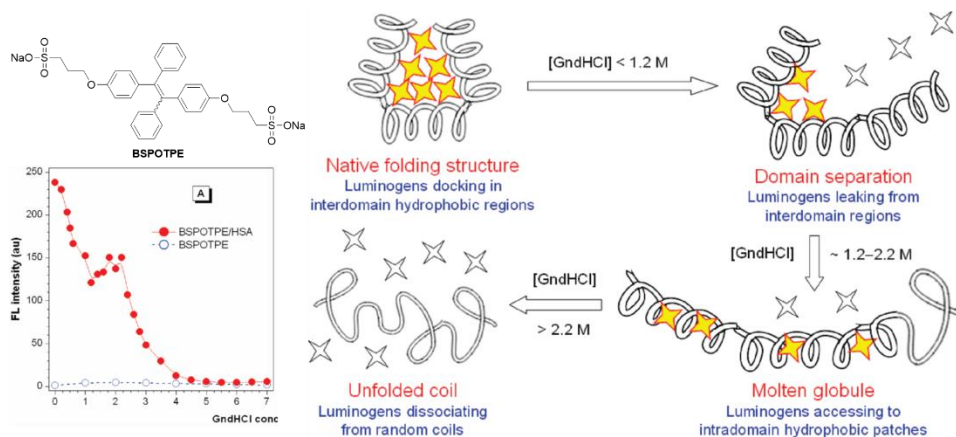


Figure V-7. Structure de la sonde BSPOTPE capable de détecter la présence d'albumine en haut à gauche. En dessous : évolution de la fluorescence de BSPOTPE à 470 nm en fonction de la concentration en GndHCl en présence ou en absence d'albumine (HSA). Droite : mécanisme proposé de dénaturation de la protéine avec la sonde en étoile et la protéine en ruban. Adapté de ^[160]

1.B.ii Réaction avec des espèces chimiques

Il est aussi possible d'utiliser la formation de liaisons chimiques pour créer la fluorescence à l'état solide. Par exemple, la sonde **TPE-MI** (Figure V-8) est non fluorescente, que ce soit en solution ou à l'état solide car la conjugaison électronique avec le carbonyle et la double liaison du maléimide inverse les niveaux des orbitales n et π ^[161] : l'orbitale HOMO est l'orbitale n , la LUMO est l'orbitale π^* . La transition $\pi^* \rightarrow n$ est interdite et la fluorescence est éteinte. Au contraire, après réaction avec un thiol, la double liaison est rompue et les niveaux n et π sont inversés, restaurant la fluorescence. Ce procédé a été utilisé par Liu *et al.*^[162] pour une détection de thiol que ce soit à l'aide de plaques CCM enduites de la sonde ou de manière intracellulaire avec des nanoparticules de **TPE-MI**.

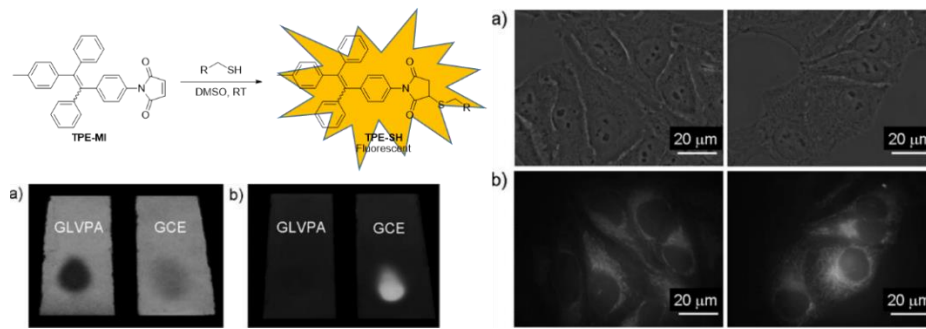


Figure V-8. Structure de la sonde **TPE-MI** non fluorescente avant activation par un thiol. En dessous, plaques CCM recouvertes de la sonde et plongées dans des solutions de protéines dans le DMSO sans (GLVPA) et avec (GCE) unités thiols sous lumière blanche (gauche) et sous UV (droite). Droite : images par transmission (a) et par fluorescence (b) de cellules cultivées avec des nanoparticules de TPE-MI.

1.C. La fluorescence à l'état solide pour l'activité enzymatique

1.C.i Activité enzymatique et ESIPT.

Les fluorophores ESIPT sont très appréciés pour créer des sondes OFF/ON pour la détection enzymatique. En effet, en rompant la liaison hydrogène, i.e. en substituant le phénol par un substrat, il est possible d'éteindre complètement la fluorescence et d'avoir une vraie sonde « turn-on ». Les molécules phares de cette famille sont la 2-(2'-hydroxyphényl)-4(3H)-quinazolinone (**HPQ**, voir Figure IV-9) et son équivalent avec deux atomes de chlore en position 6 et 5' (Figure V-9). La seconde présente d'ailleurs une solubilité encore plus faible dans l'eau, autour de la centaine de nanomolaires et a été utilisée pour diverses applications à visée biologique (molécules **ELF**). Par exemple, en greffant un phosphate, la société Molecular Probes a créé, en 1992, la première sonde pour phosphatase basée sur ce principe^[129]. Baptisée ELF[®]-97, elle permet une détection très sensible de ces enzymes^[163]. D'autres substrats ont été proposés dans les années 2000 (estérases^[164], glucuronidases^[165], β -lactamase^[166]), mais ne sont plus disponibles car le fluorophore est un trop bon groupe partant et la sonde se clive spontanément avec une séparation du substrat et du fluorophore (faux positif).

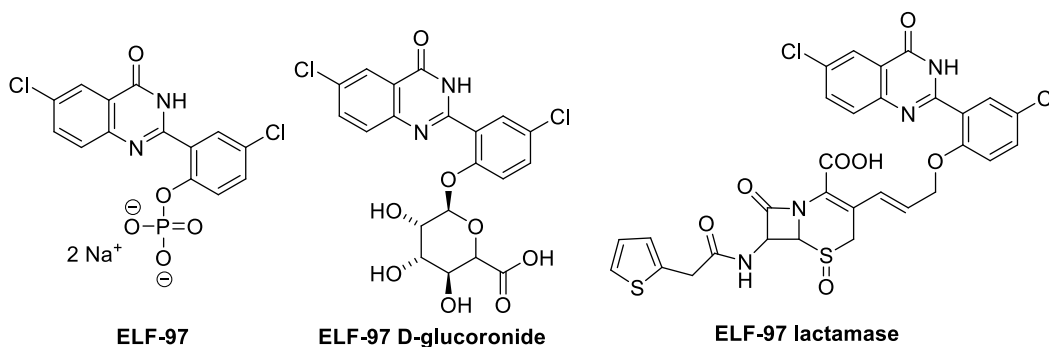


Figure V-9. Exemple de sondes basées sur la libération de dichloro-HPQ et ciblant diverses enzymes.

Chapitre V : Activité enzymatique et fluorescence

Pour résoudre ce problème de stabilité, plusieurs groupes ont utilisé des bras auto-immolables^[167]. Ceux-ci ont l'avantage d'être parfaitement stables en milieu physiologique et permettent en plus de cibler des peptidases grâce à la présence d'azotes sur l'espaceur comme le montre la Figure V-10, tirée d'une recherche de Prost *et al.*^[155]

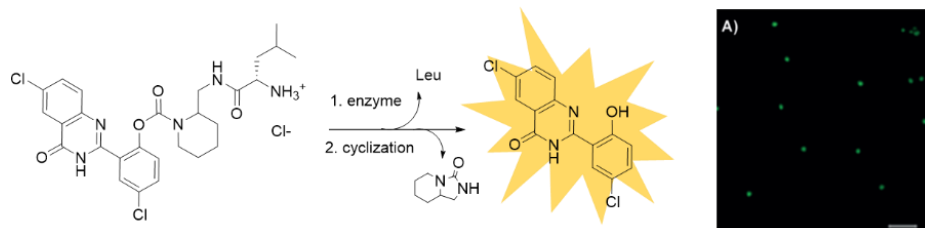


Figure V-10. Exemple de sonde avec bras effondrable permettant de libérer la dichloro-HPQ en présence de l'enzyme ciblée. Droite : image de cellules marquées par cette enzyme. Adapté de ^[155]

1.C.ii Activité enzymatique et AIE

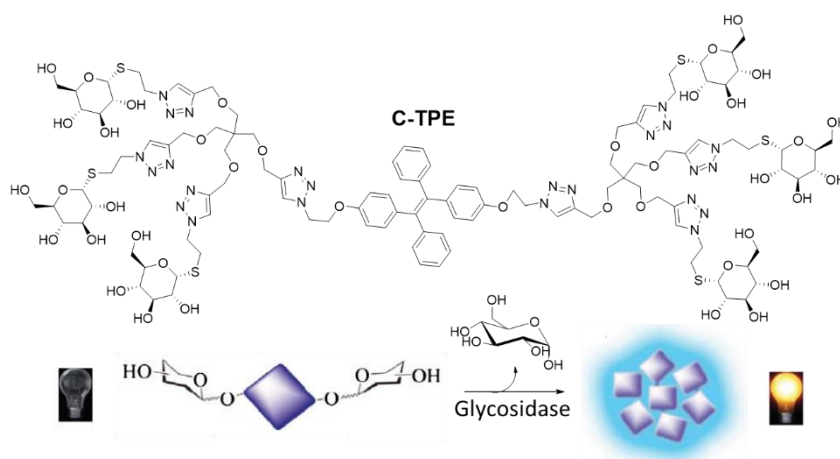


Figure V-11. Structure de la sonde **C-TPE**. Cette sonde OFF-ON est capable de détecter l'activité de la β -glucosidase. Adapté de ^[168]

La libération d'un fluorophore actif en AIE peut aussi être une approche intéressante à condition qu'un tel fluorophore précipite après rupture de la liaison avec le substrat. Les très rares exemples de ce type de sonde sont basés sur le groupement **TPE** (tétraphényléthylène). Ce groupe est très peu soluble en milieu aqueux, la solubilité est alors assurée par le substrat de l'enzyme. C'est pourquoi seuls des substrats porteurs de charges (phosphates, carboxylates) ou de groupements alcools (sucres) ont été utilisés avec cette approche. Le premier exemple, chronologiquement parlant, est ainsi celui d'une sonde pour la β -glucosidase^[168] **C-TPE** dont la structure est donnée Figure V-11. La perte des unités glucoses par hydrolyse conduit alors à une suspension fluorescente (agrégats de **TPE**). La présence de six glucoses permet une meilleure solubilité et une diminution des faux positifs (pas de

précipitation en perdant un seul glucose) mais surtout une meilleure reconnaissance par les enzymes par effet cluster^[169]. Une approche comparable a aussi été utilisée par Shi *et al.*^[170] pour la caspase 3 qui reconnaît une séquence d'acides aminés chargés négativement. Lorsqu'ils sont clivés et séparés d'une molécule de **TPE**, la fluorescence est allumée (voir Figure V-12).

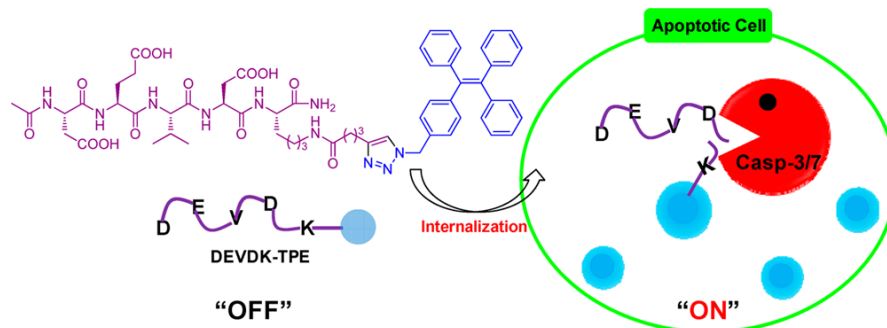


Figure V-12. Stratégie utilisée par Shi *et al.* pour détecter l'activité de la Caspase 3. Tiré de ^[170]

La solubilité peut aussi être assurée par des groupements phosphates. Deux équipes ont ainsi proposé en parallèle des sondes pour l'activité de la phosphatase basées sur des cœurs **TPE**. Gu *et al.*^[171] ont synthétisé le composé présenté dans les Figure V-13. L'enzyme clive la liaison phosphate pour permettre la formation d'agrégats fluorescents. La première permet une augmentation par 58 de la fluorescence après 15 minutes d'incubation avec 0,1 U/mL d'enzyme. Des concentrations de 0,1 mM de sonde sont suffisantes pour effectuer une détection *in vitro* de la phosphatase et la présence d'un inhibiteur permet de conserver une fluorescence négligeable (Figure V-13). En ajoutant un second groupement phosphate (Liang *et al.*^[172]), le turn-on est encore plus marqué (> 100) et la réaction complète en seulement 5 minutes avec 20 nM d'enzyme.

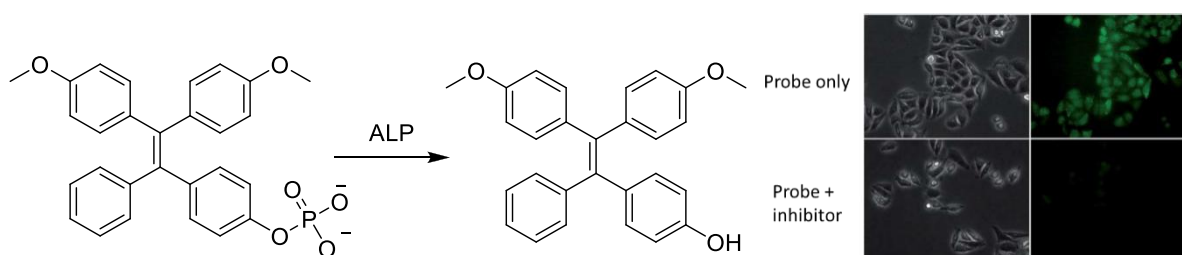


Figure V-13. Structure de la sonde synthétisée par Gu *et al.* basée sur la déprotection d'un TPE. Droite : microscopie de cellules incubées avec la sonde ou avec un inhibiteur puis la sonde.

V.2 Isovanilline-TCF : molécule de premier choix

Les exemples présentés plus haut sont basés sur la fluorescence du **TPE** ou de la **HPQ**. Malheureusement les propriétés spectroscopiques de ces deux fluorophores sont très éloignées de la

fenêtre de transparence biologique (respectivement $\lambda_{em} = 470$ nm et $\lambda_{em} = 520$ nm) contrairement à certaines molécules présentées au chapitre précédent, qui ont le Leur grand avantage de présenter une fluorescence dans le rouge, proche de la fenêtre de transparence biologique. Cependant, pour greffer un substrat d'enzyme, il est nécessaire de remplacer un des méthoxys par un phénol.

2.A. Un pKa suffisamment élevé

Pour qu'une espèce soit insoluble en milieu aqueux, il est préférable qu'elle ne soit pas chargée. Le problème se pose avec les phénols qui doivent rester sous forme phénol et non phénolate à pH physiologique. Comme l'a montré le chapitre sur les sondes pH, les positions ortho et para par rapport au **TCF** ne sont donc pas appropriées. Il ne reste que la position en méta mais une seule substitution n'est pas suffisante pour obtenir un fluorophore car le caractère dipolaire D- π -A est rompu (*m*-HO-TCF et *m*-MeO-TCF ne sont pas émissifs). Il est donc nécessaire de rajouter un second groupement donneur, et notre choix s'est tourné vers les groupements oxygénés qui présentent une fluorescence à l'état solide.

Parmi les huit molécules étudiées au chapitre précédent qui portent un groupement méthoxy en méta par rapport au **TCF**, les deux plus fluorescentes à la fois à l'état solide et en suspension sont **3,4-diMeO-TCF** et **2,3,4-triMeO-TCF**. Cependant, pour cette dernière, l'équivalent avec un groupement hydroxyle en position trois n'est pas aussi facile d'accès. Comme l'isovanilline (3-hydroxy, 4-méthoxybenzaldéhyde) est commerciale, nous nous sommes concentrés sur cette molécule. La synthèse est présentée Figure V-14. Elle correspond toujours à la condensation de Knoevenagel à partir de l'aldéhyde. Après purification par chromatographie, le composé est obtenu avec un rendement de 54 %.

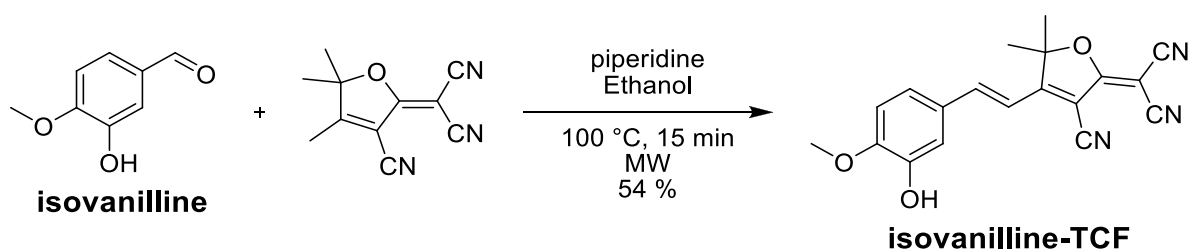


Figure V-14. Synthèse sous micro-ondes du fluorophore *isovanilline-TCF*.

Le pKa de la molécule a été mesuré par la même méthode que pour les sondes pH. La substitution en méta permet de couper la conjugaison avec le **TCF** et de faire remonter la valeur du pKa, mesuré à 9,3 (voir Figure V-15), ce qui est suffisant pour que tout le composé soit sous forme phénol à pH physiologique. En milieu acide et neutre, on retrouve une large bande à transfert de

charge, dont le maximum est à 457 nm avec un coefficient d'absorption molaire de $33\,000\text{ M}\cdot\text{cm}^{-1}$. Cependant, lorsqu'on élève le pH, jusqu'à pH 10, un épaulement apparaît à 545 nm. Il correspond à la forme déprotonée dont l'absorption est décalée vers le rouge. En solution en milieu organique (DMSO), **isovanilline-TCF** est seulement présente sous forme phénol avec un maximum d'absorption à 470 nm décalé vers le rouge par solvatochromisme et une large bande de fluorescence centrée autour de 590 nm ($\Phi_f = 1,2\%$, Figure V-16).

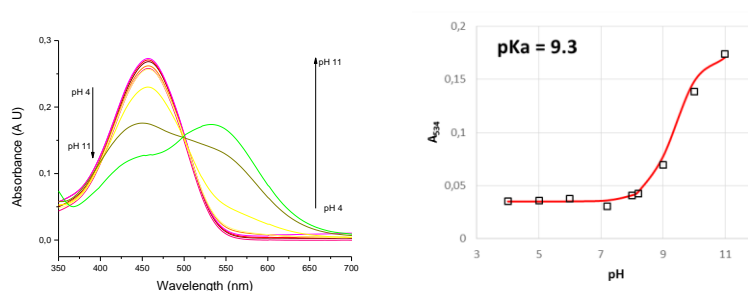


Figure V-15. Gauche : Spectres d'absorption de Isovanilline-TCF ($10\ \mu\text{M}$) à différents pH (de pH 4 à pH 11). Droite : absorbance en fonction du pH à 534 nm la longueur d'onde d'absorption maximum de la forme basique (carré) et modélisation par l'équation (1) (ligne rouge).

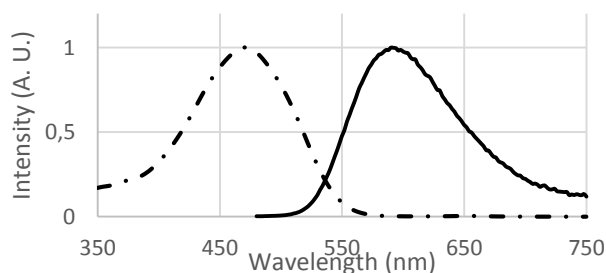


Figure V-16. Spectres d'absorption et d'émission de **isovanilline-TCF** dans le DMSO ($50\ \mu\text{M}$, $\lambda_{exc} = 470\text{ nm}$)

2.B. Présence d'un phénomène d'AIE



Figure V-17. Photographie de la poudre de **isovanilline-TCF** sous lampe UV.

Comme espéré, la poudre violette obtenue après purification est fluorescente sous la lampe UV (voir Figure V-17). Le spectre de fluorescence à l'état solide présente une bande principale, dont le

maximum est situé à 714 nm et deux épaulements : l'un, relativement intense à 674 nm et un second, beaucoup plus faible, à 790 nm (voir la Figure V-18). Quelle que soit la longueur d'onde d'excitation, la forme de l'émission est la même. Ces épaulements sont donc dus à une structure de la bande d'émission et non à des isomorphes. Le spectre d'excitation est lui aussi structuré : une très large bande avec un maximum à 538 nm et une seconde bande, beaucoup plus fine dont le maximum est à 592 nm. Cette dernière est plus intense et correspond au maximum d'émission comme le montre la Figure V-18. Ceci laisse penser que le composé **isovanilline-TCF** est sous forme d'agrégats J. La comparaison avec la solution renforce cette hypothèse car les bandes d'excitation et d'émission sont décalées vers le rouge avec un plus faible déplacement de Stokes par rapport à la solution.

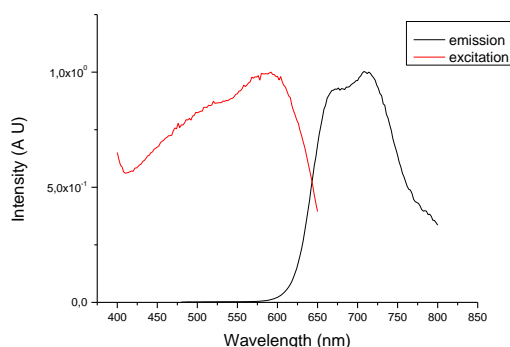


Figure V-18. Spectres d'excitation et d'émission de **Isovanilline-TCF** à l'état solide ($\lambda_{exc} = 460$ nm).

Lors de l'étude de la solubilité dans l'eau, le phénomène d'AIE apparaît comme pour les différents fluorophores **TCF**. Cette différence de comportement entre la solution et l'état solide est très intéressante car elle permet d'obtenir, comme souhaité, une sonde de type OFF/ON basée sur la précipitation du fluorophore. Dans la Figure V-19, on peut voir la fluorescence en solution pour des f_w inférieurs à 70 %. Celle-ci est faible et quasiment négligeable devant la fluorescence en suspension. La fluorescence augmente ensuite jusqu'à un maximum pour $f_w = 85$ %. On a alors un spectre structuré avec un maximum à 674 nm et deux épaulements : 590 nm qui correspond à la longueur d'onde d'émission en solution, et 646 nm. Le rendement quantique de la suspension, mesuré à l'aide d'une sphère d'intégration est de 9 %.

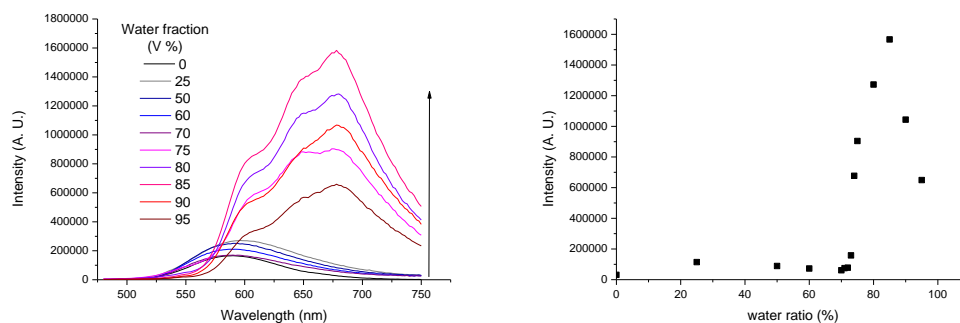


Figure V-19. Spectres d'émission dans un mélange DMSO/eau du fluorophore *isovanilline-TCF* (50 μM) à différents f_w ($\lambda_{exc} = 460$ nm). Droite : évolution de l'intensité à 674 nm en fonction de f_w .

V.3 La phosphatase alcaline, enzyme modèle

Pour valider notre approche, nous avons voulu étudier la phosphatase alcaline (ALP) comme enzyme modèle. Celle-ci catalyse l'hydrolyse d'une liaison phosphoester et libère l'ion phosphate correspondant ainsi qu'un alcool. Comme son nom l'indique, elle a une activité optimale à un pH légèrement alcalin. De plus, elle est peu substrat-spécifique, ce qui signifie qu'elle est capable de retirer un groupement phosphate de nombreuses molécules.

3.A. Quelles sondes pour détecter l'activité enzymatique ?

Différentes sondes fluorescentes sont capables de détecter l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline. On peut par exemple citer l'utilisation de « quantum dots »^[173] utilisant le phénomène de FRET pour éteindre la fluorescence après activation ou de polyélectrolytes^[174] capables de détecter la présence d'ions pyrophosphates. Les sondes entièrement organiques, elles aussi, sont souvent basées sur une extinction de la fluorescence par la phosphatase alcaline^[175].

Les exemples de sondes turn-on qui existent dans la littérature sont peu nombreux : tout d'abord, en solution, un dérivé de fluorescéine développé par Kamiya *et al.*^[176] : le groupement phénol est protégé par un phosphate et **TG-Phos** n'est pas fluorescente. Après rupture de la liaison, la fluorescence est récupérée comme le montre la Figure V-20. Le même type de sonde existe commercialement avec un dérivé coumarine : le 4-méthylumbelliféryl phosphate.

Chapitre V : Activité enzymatique et fluorescence

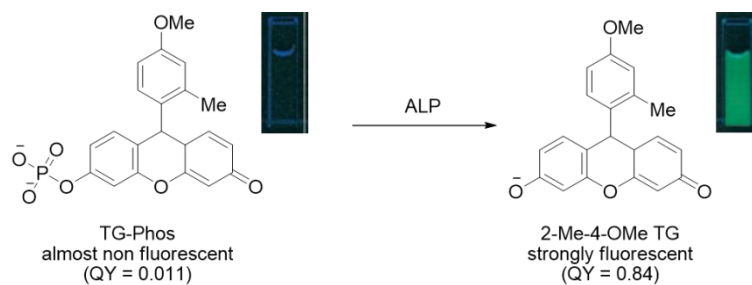


Figure V-20. Sonde de type turn-on développée pour la détection de l'activité enzymatique de ALP. La fluorescence est récupérée après clivage de la liaison phosphoester. Adapté de [176]

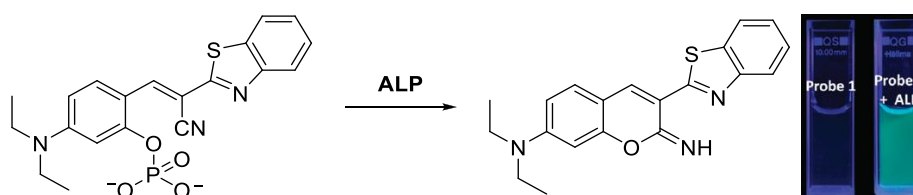


Figure V-21. Structure de la sonde développée par Kim *et al.* basée sur la formation d'un cycle imino-coumarine et la fluorescence de précipité par ESIPT. Droite : image de la sonde sans (gauche) et avec (droite) enzyme sous irradiation UV. Adapté de [177]

D'autres sondes « turn-on » sont des sondes basées sur le phénomène ESIPT. Outre la sonde ELF-97[®], commercialisée par Invitrogen et présentée plus haut, il existe une autre sonde basée sur le transfert de proton. Kim *et al.*[177] ont utilisé des dérivés imino-coumarine : la sonde n'est pas fluorescente à cause de désexcitation non radiatives qu'on peut attribuer aux différentes torsions et rotations, en particulier du benzothiazole. La rupture de la liaison P-O est suivie d'une attaque nucléophile intramoléculaire de l'oxygène libéré sur le groupement nitrile. L'imino-coumarine-benzothiazole libérée est insoluble et fluoresce par ESIPT (voir Figure V-21).

Parmi les sondes basées sur des phénomènes de précipitation, Chen *et al.*[178] ont décoré un cœur pérylène de chaînes alkyles porteuses de cations (sonde 1 dans la Figure V-22). Ainsi la molécule est fluorescente en solution sous forme de monomère. Cependant, lorsqu'on ajoute l'adénosine triphosphate (ATP), il y a de fortes interactions électrostatiques et hydrophobiques qui résultent en l'agrégation du complexe sonde/ATP accompagnée d'une extinction de la fluorescence par ACQ. La phosphatase dégrade l'ATP en adénosine et permet la dissociation du complexe qui conduit au retour de la fluorescence. Mais ce type de sonde repose sur plusieurs étapes successives et des interactions électrostatiques qui peuvent facilement être perturbées par un stimulus externe. Les approches plus simples de Liang *et al.*[172] ou Gu *et al.*[171] présentées dans la première partie de ce chapitre correspondent à la démarche que nous avons voulu mettre en place. La sonde est soluble grâce aux

groupements phosphates. Après activation, le fluorophore libéré est insoluble, il précipite sous forme d'agrégat et permet l'apparition de la fluorescence par AIE.

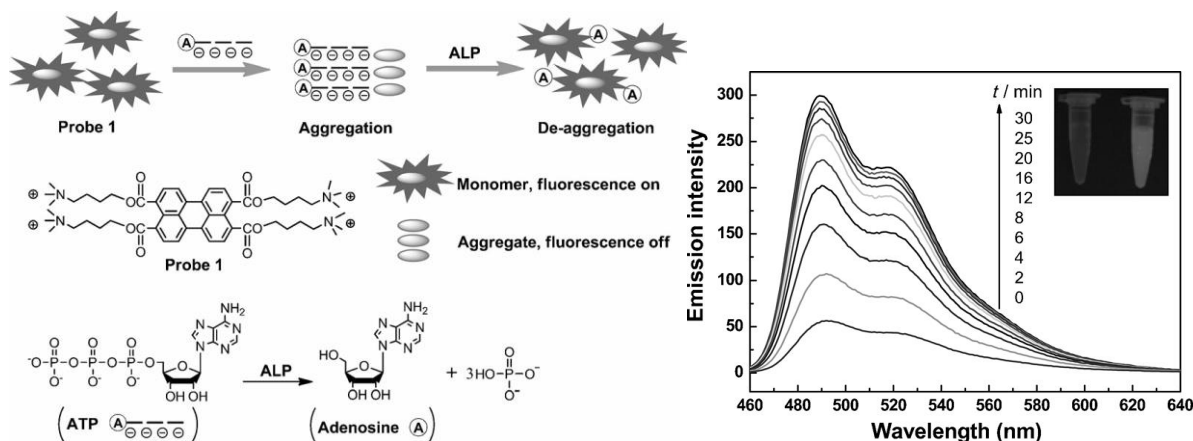


Figure V-22 Gauche : principe d'action de la sonde développée par Chen et al.^[178] : le monomère fluorescent est quenché par ACQ lorsqu'il forme un complexe avec l'ATP. L'activité de la phosphatase permet de retrouver la fluorescence du monomère. Droite : Spectres d'émission de **1** (5 μM) au cours du temps (0-30 min) en présence de 200 μM ATP et 2,5 U d'ALP. En insert solution de **1** avec ATP et absence (gauche) ou présence (droite) d'ALP après 30 min.

3.B. Synthèse des cibles

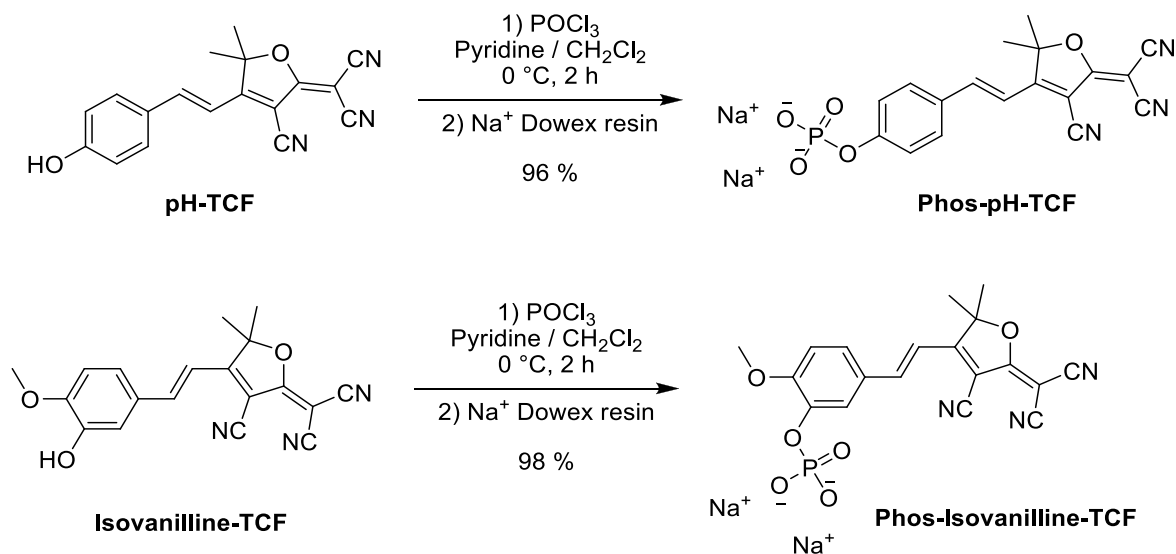


Figure V-23. Synthèse des cibles **Phos-pH-TCF** et **Phos-isovanilline-TCF** en une étape.

A partir du fluorophore **Isovanilline-TCF**, la cible **Phos-Isovanilline-TCF** est obtenue en une étape suivant le schéma réactionnel présenté Figure V-23. Dans le même temps et pour servir de contrôle, nous avons synthétisé la sonde **Phos-pH-TCF**. Les deux phénols sont convertis en O-aryle phosphate par action du trichlorure de phosphoryle suivi par un traitement aqueux. Après purification, il est nécessaire de traiter le composé sur résine échangeuse d'ion pour éliminer les ions pyridiniums

et les remplacer par des ions sodiums moins toxiques. Cette étape est réalisée avec des très bons rendements : supérieurs à 95 %.

3.C. Fluorescence et activité enzymatique

Les propriétés des deux sondes ont ensuite été étudiées pour vérifier le caractère OFF/ON ainsi que la cinétique de réaction. Pour la sonde **Phos-pH-TCF**, les mesures de fluorescence et d'absorption sont présentées dans les figures ci-dessous. De manière très surprenante, l'absorption du composé à pH 8 présente deux bandes quasiment correspondantes aux bandes de **pH-TCF** (443 nm et 570 nm, voir Figure V-24). Il ne s'agit cependant pas de dégradation car cette absorption est stable au cours du temps. Lors de l'ajout de l'enzyme à pH 8 (tampon tris-HCl, [enzyme] = 0,5 U/L), la bande située dans le bleu décroît tandis que celle correspondant au phénolate augmente. Après seulement dix minutes, l'absorption ne varie plus, elle correspond alors à l'absorption de **pH-TCF** à pH 8. Cette cinétique est relativement rapide : à titre de comparaison, la formation de l'iminocoumarine^[177], présentée en introduction, nécessite trente minutes et cinq fois plus d'enzyme. Ceci s'explique par le comportement de très bon groupe partant du phénolate à pH 8.

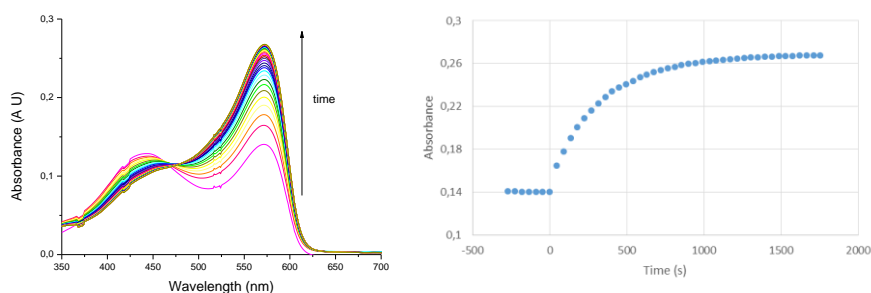


Figure V-24. Etude cinétique de l'absorption de la sonde Phos-pH-TCF (10 μ M, tampon pH 8) en présence de 0,01 U/L d'enzyme ALP. Gauche : spectres d'absorption, droite Absorbance à 570 nm en fonction du temps.

Malheureusement, la fluorescence du phosphate est non négligeable avec une excitation à 570 nm. Cette sonde n'est pas utilisable pour une sonde de type OFF/ON car l'intensité émise par le fluorophore libéré n'est même pas deux fois supérieure au phosphate (Figure V-25, gauche) avec un rapport signal sur bruit de 1,42. L'étude cinétique avec incubation avec 0,5 U/L¹ d'enzyme (température ambiante, pH 8) montre tout de même une augmentation de cette intensité (Figure V-25, droite), ce qui confirme que cette sonde est bien substrat de l'enzyme. La fluorescence augmente linéairement pendant dix minutes avant d'atteindre un plateau correspondant à une consommation totale de la sonde. Enfin, la cinétique semble être la même pour les deux modes de suivi de réaction.

¹ Une unité (U) de phosphatase alcaline est la quantité d'enzyme qui hydrolyse 1 μ mol de 4-nitrophényl phosphate en 1 min à 37 °C à pH 9,8. 0,5 U/L correspond à 68 nM.

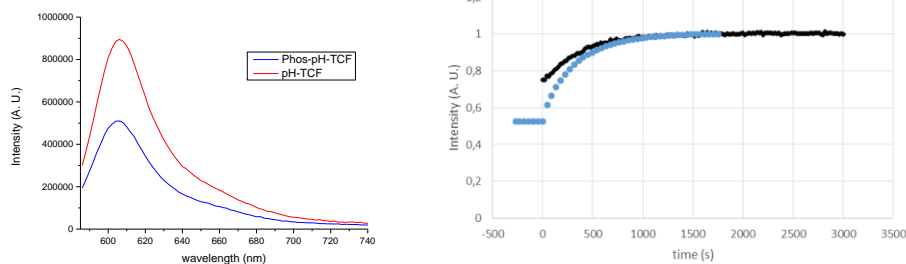


Figure V-25. Gauche : spectres d'émission ($\lambda_{exc} = 570$ nm, $10 \mu\text{M}$) de Phos-pH-TCF (bleu) et pH-TCF (rouge) en milieu basique (tampon tris pH 8). Droite : suivi cinétique en absorption ($\lambda = 570$ nm, bleu) et en émission ($\lambda_{exc} = 570$ nm, $\lambda_{em} = 610$ nm, noir) en présence de $0,5 \text{ U/L}$, pH 8.

Avant d'aller plus loin avec la **Phos-Isovanilline-TCF**, nous avons voulu vérifier que le fluorophore **Isovanilline-TCF** précipite dans les conditions d'étude ($50 \mu\text{M}$, tampon tris-HCl, pH 8), ce qui permettrait la création d'une sonde de type OFF/ON. Ceci est tout d'abord visible avec les différents spectres d'absorption (Figure V-26). Celui de la sonde phosphatée est large et correspond à un transfert de charge avec un maximum d'absorption à 450 nm . L'absorption du fluorophore présente une absorption plus faible avec un léger décalage bathochrome de cinq nanomètres. Cependant le plus important est l'élargissement de cette bande aux longueurs d'onde plus élevées (550 nm - 700 nm). Cette absorption non nulle est le signe d'une augmentation de la diffusion de la solution à cause de la précipitation du fluorophore.

La fluorescence des deux composés est elle aussi très différente : la Figure V-26 montre les spectres normalisés d'excitation et d'émission de la sonde et du fluorophore. Tout d'abord, la forme du spectre d'excitation de **Isovanilline-TCF** confirme la présence d'une suspension et d'une fluorescence à l'état solide. Dans le tampon utilisé pour ces tests, l'émission est différente ($\lambda_{em} = 660 \text{ nm}$) de celle obtenue durant les expériences d'AIE dans l'eau, ce qui semble indiquer un autre arrangement dans les nano-particules. Enfin, l'émission du phosphate est relativement intense en solution ($\lambda_{em} = 586 \text{ nm}$), ce qui, à priori ne permet pas de réaliser une sonde OFF/ON.

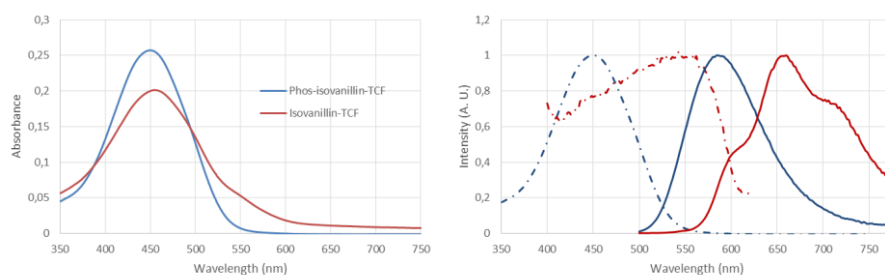


Figure V-26. Gauche) spectres d'absorption ($10 \mu\text{M}$) de **Phos-Isovanilline-TCF** (bleu) et **Isovanilline-TCF** (rouge) dans le tampon tris pH 8. Droite) spectres d'excitation (pointillés) et d'émission (trait plein) normalisés des composés.

Chapitre V : Activité enzymatique et fluorescence

Cependant, en comparant les spectres d'excitation, il est possible de choisir judicieusement les longueurs d'onde d'excitation pour permettre la formation d'une sonde OFF/ON. Il existe en fait deux gammes d'excitation possibles (Figure V-27, en haut). La première, située autour de 450 nm, permet l'excitation des deux composés (Figure V-27, bas à gauche). L'intensité émise par chacun des composés est comparable, avec un décalage vers le rouge de l'émission du phénol. Si on récolte alors l'émission à 585 nm, seule la fluorescence du phosphate est enregistrée, ce qui permet de suivre la disparition de celui-ci. Au contraire, en excitant à une longueur d'onde supérieure à 560 nm, l'absorption du phosphate est quasi-nulle, seul le phénol est fluorescent (Figure V-27 en bas à droite). Il est alors possible d'avoir une sonde OFF/ON et le ratio turn-on le plus élevé vaut 37 pour le couple $\lambda_{exc} = 560 \text{ nm} / \lambda_{em} = 720 \text{ nm}$.

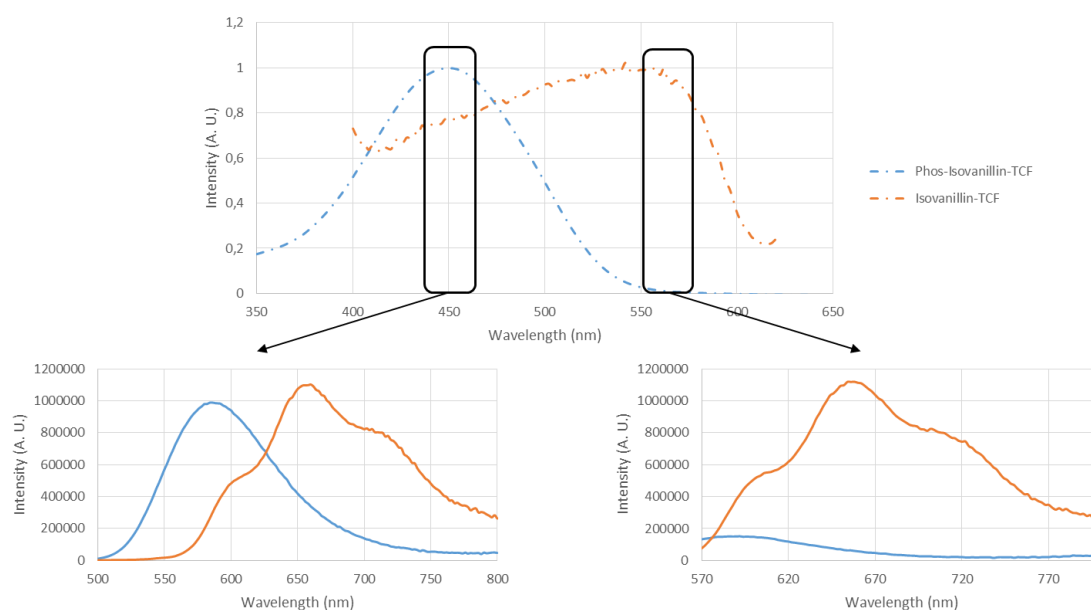


Figure V-27. Haut : spectres d'excitation des composés Phos-isoivanilline-TCF (bleu) et Isovanilline-TCF (rouge) à pH 8, 10 μM . Bas : spectres d'émission de ces composés, gauche : $\lambda_{exc} = 450 \text{ nm}$, droite $\lambda_{exc} = 560 \text{ nm}$.

Malheureusement, les études cinétiques se sont révélées beaucoup moins fructueuses pour la validation de cette sonde. En effet, il n'a pas été possible de constater l'apparition de la fluorescence du phénol au cours d'une incubation en présence d'enzyme. Les différentes expériences de contrôle nous ont cependant apporté quelques indications sur les raisons de ce résultat. Tout d'abord, la sonde est stable dans le milieu de réaction : en l'absence d'enzyme, la fluorescence de la forme phosphate (couple 450/585) est inchangée pendant la demi-heure qu'a duré le test négatif. De plus, lors de l'ajout de l'enzyme (0,01 U/L), cette fluorescence disparaît rapidement : la réaction semble finie en une dizaine de minutes, ce qui indique une cinétique proche de la sonde **Phos-pH-TCF**. Ce couple de

longueur d'onde permet ainsi d'utiliser la sonde comme une sonde qui s'éteint avec une division par dix du signal de fluorescence.

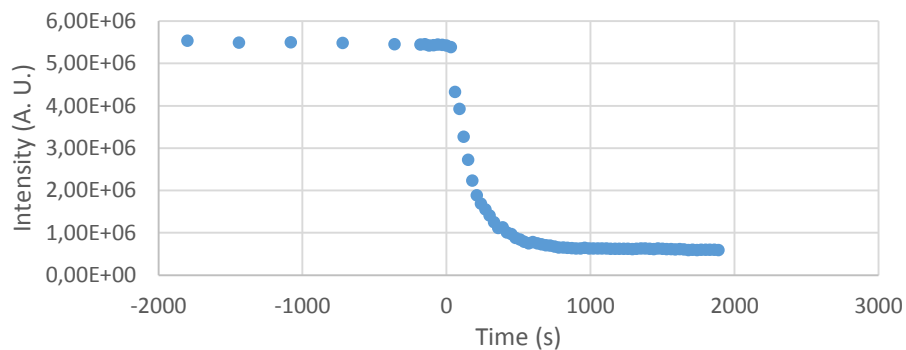


Figure V-28. Suivi cinétique ($\lambda_{exc} = 450 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 585 \text{ nm}$) de Phos-isovanilline-TCF ($10 \mu\text{M}$) à pH 8 en absence (temps négatif) et en présence de la phosphatase alcaline ($0,01 \text{ U/L}$)

Enfin, si la fluorescence du phénol n'apparaît pas au cours de l'expérience, elle est en revanche présente le lendemain. Cela semble indiquer que ce n'est pas la réaction avec l'enzyme qui pose problème mais plutôt la précipitation de **Isovanilline-TCF** en présence de la phosphatase. Cette piste est renforcée par une expérience réalisée avec $100 \mu\text{M}$ de sonde (plus concentrée donc) qui montre une apparition plus rapide de la fluorescence, dans la journée. Ces expériences avec la phosphatase alcaline nous ont ainsi montré une des limites de cette sonde, à savoir une solubilité trop grande ou une trop grande interaction du fluorophore avec l'enzyme qui entraîne un retard dans la précipitation.

V.4 β -Glucosidase

L'autre enzyme qui nous a intéressés est l'enzyme Abg qui est une β -glucosidase. Ce travail a été effectué en collaboration avec Stéphane Chambert de l'INSA Lyon et l'équipe de Stephen Withers de Université de Colombie Britannique (Vancouver). Leur projet consiste à déterminer, dans une population bactérienne, lesquelles expriment cette enzyme. Leur méthode de détection et de séparation se fait à l'aide de cytométrie de flux. Il est donc très important que les sondes soient bien localisées et non excrétées hors de la cellule.

4.A. Les sonde pour β -glucosidases : ce qui existe

Il existe peu de sondes enzymatiques pour les β -glucosidases et quasiment toutes sont basées sur des fluorophores solubles. La sonde commerciale la plus utilisée est basée sur une méthylumbelliférone porteuse d'un glucose^[179]. La présence du glucose modifie les propriétés de fluorescence avec un décalage vers le bleu d'une soixantaine de nanomètre. Pour se décaler vers le

Chapitre V : Activité enzymatique et fluorescence

rouge, il est aussi possible d'utiliser la résorufine^[180]. Plus récemment, Li *et al.*^[181] ont amélioré ces sondes en ajoutant un lien phosphodiester porteur d'une porphyrine (**TPP**). Cela permet d'être sensible simultanément à deux activités enzymatiques (Figure V-29) : La glucosidase et la phosphodiesterase.

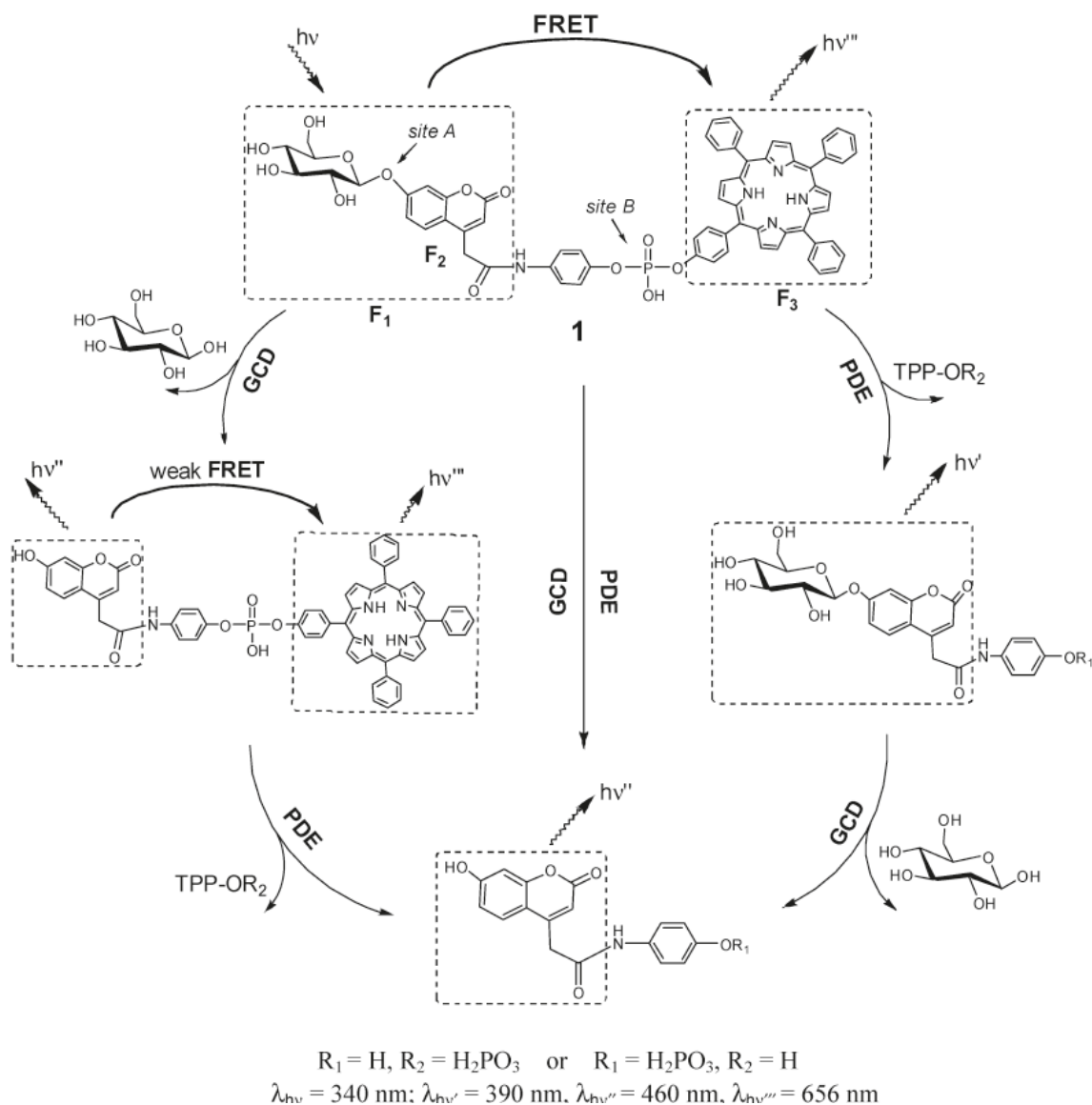


Figure V-29. Réponse de la sonde synthétisée par Li *et al.* à l'action simultanée de la β -glucosidase (GCD) ou de la phosphodiesterase (PDE).

En l'absence des deux, il y a un transfert FRET entre la coumarine et la porphyrine, seule la fluorescence à 656 nm typique de la **TPP** est présente. Après action de la glucosidase, la 7-hydroxycoumarine est déprotégé, le transfert d'énergie n'est plus total. Le spectre de fluorescence comprend alors les émissions à 460 nm de la coumarine et à 656 nm de la TPP. Si seule la phosphodiesterase est présente, la fluorescence est celle de glucopyranosyloxy coumarine (390 nm).

Enfin, si les deux enzymes sont actives, la fluorescence présente un seul pic à 460 nm, caractéristique de la seule coumarine.

Malheureusement ces différentes sondes sont basées sur des fluorophores solubles et ont tendance à diffuser comme expliqué dans la première partie de ce chapitre. Une première solution proposée à ce problème est la possibilité de libérer un fluorophore qui réagit sur l'enzyme (Figure V-2, page 150). Les chromophores portant des groupements dihalométhyles sont ainsi appréciés car ils sont sensibles à une attaque nucléophile des différents résidus de l'enzyme. Kwan *et al.*^[156] ont ainsi développé un dérivé difluorométhylcoumarine (Figure V-30). Malheureusement, en plus de contaminer l'enzyme lorsque le greffage se fait dans le site actif, cette méthode s'accompagne de la libération de HF, toxique pour les cellules.

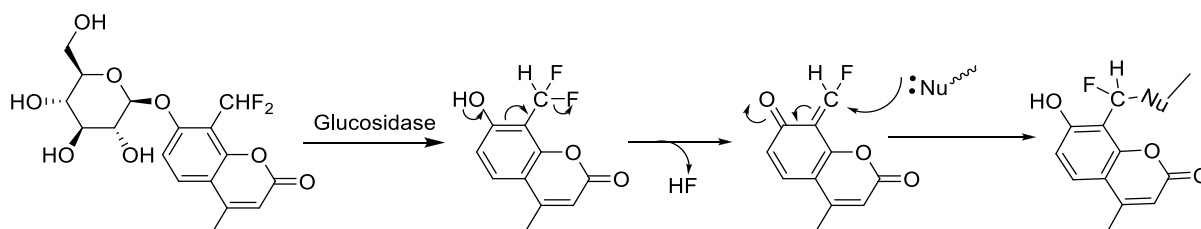


Figure V-30. Structure de la sonde créée par Kwan *et al.*^[156] et le mécanisme de libération avec l'enzyme.

Le seul exemple de sonde pour la glucosidase comportant un fluorophore insoluble est **C-TPE** présentée Figure V-11, page 156. Pour rappel, cette sonde est composée d'un noyau **TPE** lié à six unités glucose. Après clivage, le cœur aromatique précipite et émet une fluorescence bleue. Nous avons donc essayé de synthétiser le même type de sonde avec un fluorophore émettant dans le rouge.

4.B. Synthèse

Comme pour la phosphatase, deux cibles ont été synthétisées : **Glc-pH-TCF** et **Glc-Isoval-TCF**. L'idée est la même que pour la phosphatase : la première est une sonde soluble tandis que la seconde se veut comme une sonde qui libère un fluorophore qui précipite. Le glucose est introduit à des étapes différentes par le même intermédiaire : **Glc-Br**. Celui-ci est synthétisé par bromation du sucre peracétylé (Figure V-31), la forme α étant sélectivement obtenue par effet anomère. Pour la sonde **Glc-pH-TCF**, le composé **pH-TCF** est ensuite glycosylé par cet intermédiaire puis le sucre est déprotégé dans les conditions de Zemplén.

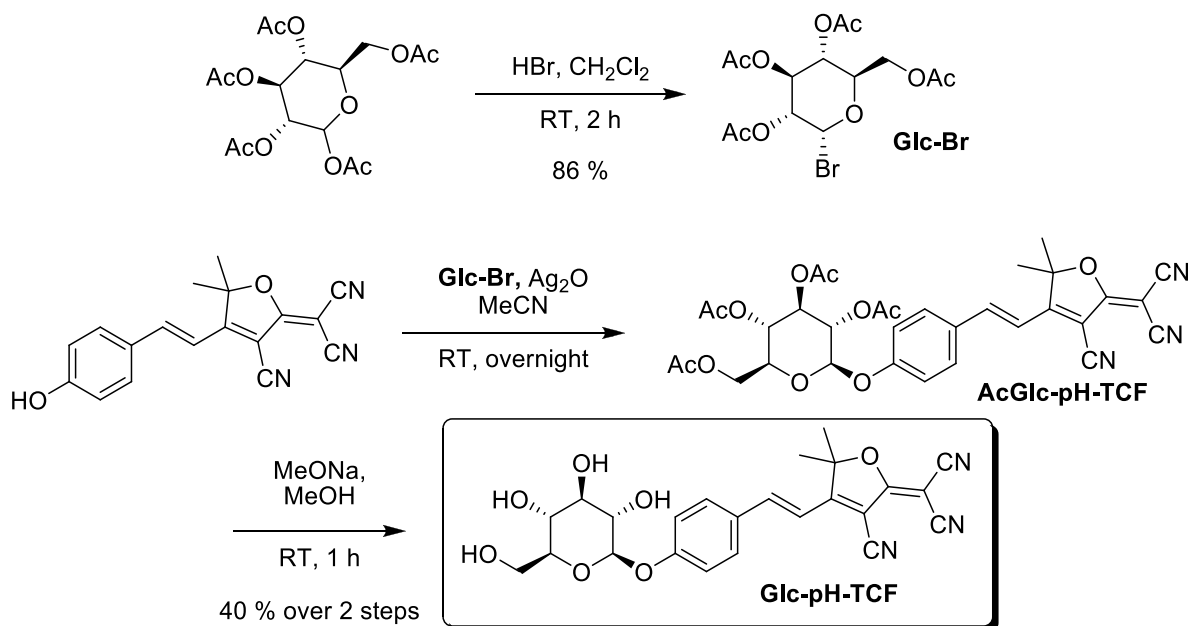


Figure V-31. Synthèse de la sonde **Glc-pH-TCF** à partir de l'intermédiaire **Glc-Br** et de **pH-TCF**.

Pour le dérivé de l'isovanilline (**Glc-isoval-TCF**), l'ordre des réactions est sensiblement différent car les essais d'introduction du sucre directement sur **Isovanilline-TCF** n'ont donné que des rendements extrêmement faibles. Nous avons donc réalisé d'abord la glycosylation de l'isovanilline. Celui-ci est réalisé par catalyse par transfert de phase ($\text{BnEt}_3\text{N}^+\text{Cl}^-$). La condensation de Knoevenagel est ensuite réalisée pour obtenir la sonde **Glc-isoval-TCF** protégée par des groupements acétates (Figure V-32). Ceux-ci sont clivés en conditions basiques (NEt_3) dans un mélange méthanol/eau à température ambiante.

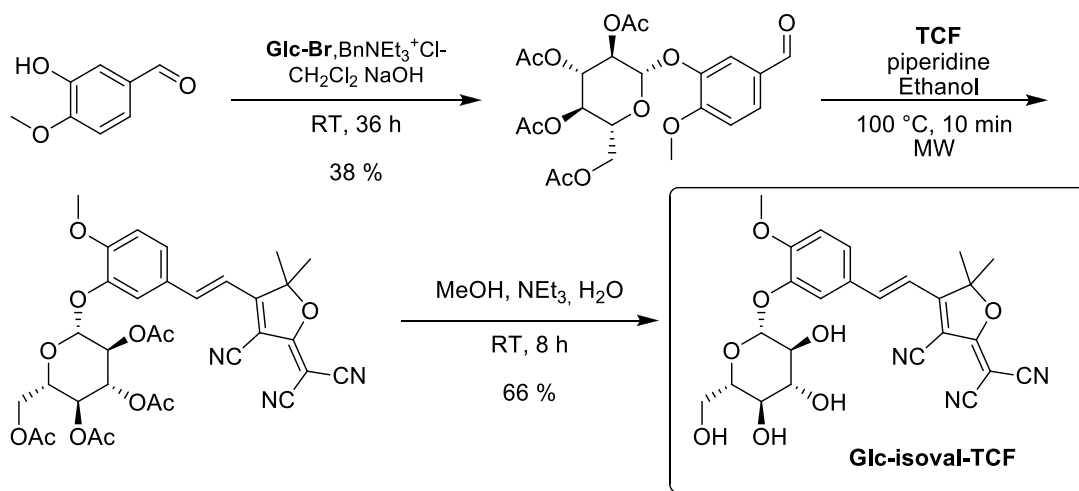


Figure V-32. Synthèse de la sonde **Glc-isoval-TCF** en trois étapes.

4.C. Tests enzymatiques

De nouveau, les deux sondes ont été testées en conditions favorables pour une activité enzymatique, à pH 7,4. L'enzyme utilisée (Abg, fournie par S. Withers) est une enzyme peu sélective capable d'hydrolyser les deux formes α et β du glucose. Le spectre d'absorption de **Glc-pH-TCF** se compose d'une seule bande à transfert de charge avec un maximum à 420 nm ($\epsilon = 16\,680\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Le spectre d'émission présente un maximum à 544 nm avec une intensité non négligeable. Cependant, à pH physiologique, **pH-TCF** présente deux bandes d'absorption : le phénol et le phénolate. Il est alors possible d'exciter sélectivement le phénolate à 570 nm. La fluorescence de la sonde **Glc-pH-TCF** est alors négligeable et le phénolate est vingt fois plus émissif (Figure V-33).

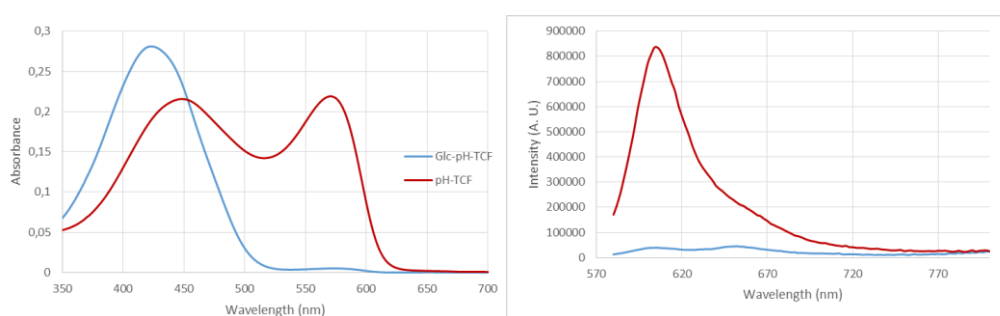


Figure V-33. Gauche : spectres d'absorption (tampon PBS à pH 7,4, $10\ \mu\text{M}$) des composé **Glc-pH-TCF** (bleu) et **pH-TCF** (rouge). Droite : spectres d'émission (mêmes conditions, $\lambda_{\text{exc}} = 570\text{ nm}$)

Lors de l'incubation de **Glc-pH-TCF** avec la glucosidase, le pic d'absorption (420 nm) diminue progressivement tandis qu'un nouveau, à 570 nm, apparaît. Cela montre clairement que la sonde est substrat de l'enzyme Abg. Dans le même temps, un pic de fluorescence apparaît à 605 nm lorsque la solution est excitée à 570 nm. La vitesse d'apparition dépend de la quantité d'enzyme (Figure V-34). Sans enzyme, la sonde est relativement stable sans aucune augmentation de fluorescence observée en une heure. La cinétique est ensuite accélérée avec des quantités croissantes d'enzyme. A 3,2 nM, la cinétique est tellement rapide que l'hydrolyse est finie en seulement cinq minutes.

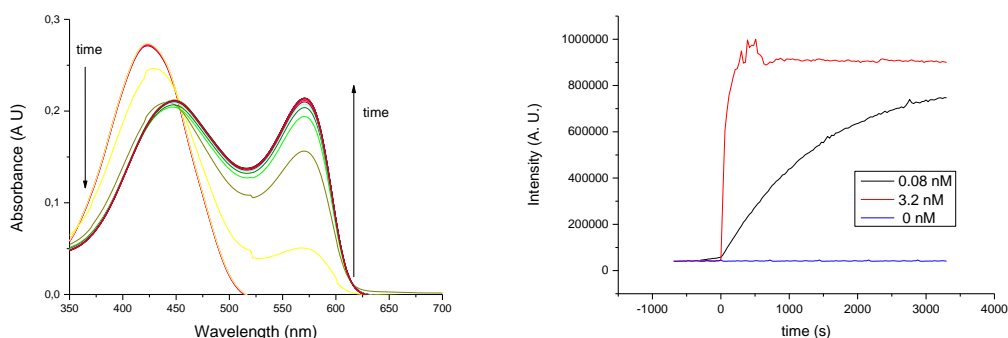


Figure V-34. Gauche : Evolution des spectres d'absorption de **Glc-pH-TCF** ($10\ \mu\text{M}$) au cours de l'incubation avec la glucosidase Abg ($3,2\ \text{nM}$, tampon PBS pH 7,4) Droite : Augmentation de la fluorescence mesurée à 605 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 570\text{ nm}$) avec différentes quantités de glucosidase. (**Glc-pH-TCF** $10\ \mu\text{M}$, tampon PBS pH 7,4, à température ambiante).

Lors de l'étude du composé **Glc-Isoval-TCF**, nous avons eu la surprise de découvrir que les propriétés spectroscopiques ne sont que très peu modifiées par l'ajout d'enzyme. L'absorption du composé demeure inchangée et la fluorescence diminue très lentement (Figure V-35). Donc, soit l'action enzymatique est extrêmement lente, ce qui est surprenant compte tenu de la cinétique observée avec la sonde **Glc-pH-TCF**, soit **Glc-Isoval-TCF** n'est pas substrat. Il n'y aurait alors aucun clivage du sucre par la glucosidase et la diminution de fluorescence observée correspondrait à un photoblanchiment de **Glc-pH-TCF**. Nous penchons plutôt pour la deuxième explication car dans le premier cas, il y aurait aussi une modification de l'absorption au cours du temps, ce que nous n'avons pas observé (Figure V-35).

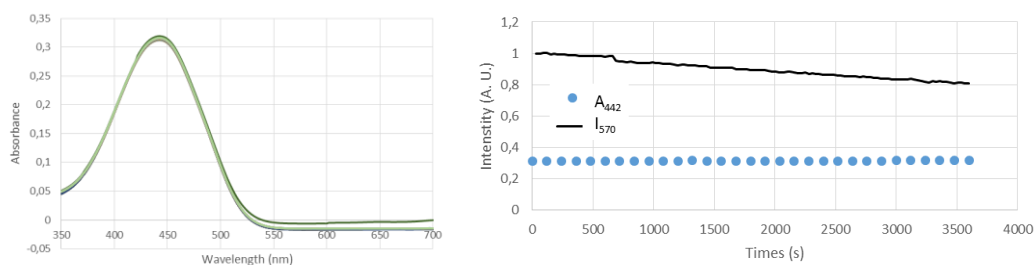


Figure V-35. Gauche : spectres d'absorption de **Glc-Isoval-TCF** au cours de la réaction avec l'enzyme Abg (tampon PBS pH 7,4, 10 μ M, 3.2 nM enzyme), attention, il y a 30 spectres sur la figure. Droite : Evolution de l'absorbance à 442 nm (points bleus) et de l'intensité à 570 nm (noir) au cours de cette réaction.

En comparant avec les différentes sondes présentées dans la partie précédente, nous nous sommes aperçus qu'aucune ne possède de substituant en ortho du sucre, ce qui peut être une raison possible pour cette non-reconnaissance. Il semble donc que l'isovanilline ne soit pas forcément le meilleur groupe porteur pour ce type de sonde. Au contraire, un phénol sans aucun groupement, comme c'est le cas pour **Glc-pH-TCF**, semble être très intéressant du point de vue cinétique.

V.5 Variations sur le thème du TCF

Avant de créer de nouvelles sondes, nous avons voulu voir s'il était possible de diminuer la solubilité grâce à des modifications du fluorophore **Isovanilline-TCF**. Celui-ci possède de nombreuses caractéristiques intéressantes pour l'imagerie cellulaire, nous avons donc voulu conserver la partie donneuse d'électrons ainsi que la conjugaison du **TCF**. La première piste pour diminuer la solubilité est de remplacer les deux méthyles présents sur le cycle. Cette modification peut ensuite modifier les interactions à l'état solide et ainsi modifier les propriétés à l'état solide mais l'intérêt, ici, est surtout de remplacer les méthyles du groupement **TCF** par des groupements hydrophobes qui vont permettre de diminuer la solubilité.

5.A. Il faut remonter aux sources pour faire varier les méthyles

Par une étude de rétro-synthèse, on peut s'apercevoir que les deux méthyles présents sur le **TCF** sont aussi les deux méthyle présent sur la 3-hydroxy-3-méthylbutan-2-one (**II-1**). Si on utilise une autre cétone (Figure V-36 : R_1 et R_2 différents d'un méthyle), il est possible d'obtenir une nouvelle tête acceptrice sur le modèle du **TCF**. Dans cette optique, He *et al.*^[2] ont développé une voie de synthèse qui permet de faire varier les hydroxycétone utilisées (voir Figure V-36). Pour éviter d'introduire une chiralité au sein de nos molécules, nous avons utilisé uniquement des cétones symétriques ($R_1 = R_2$).

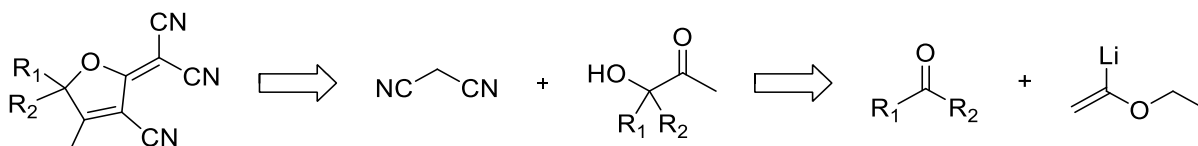


Figure V-36. Stratégie de synthèse développée par He *et al.*^[2] pour introduire différents substituants sur le cycle **TCF**.

Pour tenter de conserver un aspect cristallin et éviter les huiles à température ambiante, nous avons écarté les longues chaînes aliphatiques pour nous concentrer sur des cétones de départ avec des chaînes courtes ou rigides. La synthèse générale des dérivés **TCF** et des fluorophores correspondants est présentée Figure V-37.

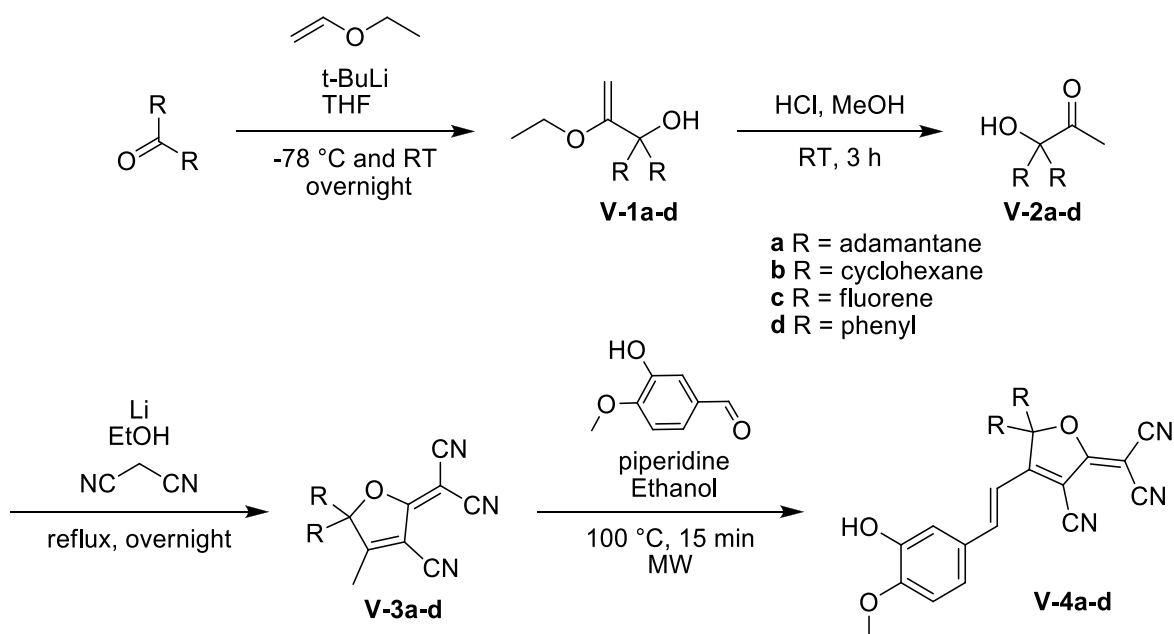


Figure V-37. Synthèse générales des dérivés **TCF** avec différents substituants. Attaque électrophile et déprotection pour obtenir l'hydroxycétone puis cyclisation en milieu basique avant une condensation de Knoevenagel.

L'éther éthylvinylique réagit avec le Butyl-lithium à -78 °C pour former l'anion vinylique correspondant. La cétone, lorsqu'elle est ajoutée subit une attaque électrophile pour former l'intermédiaire **V-1** qui est isolé sans être purifié. L'hydrolyse en milieu acide permet la déprotection de l'éther en énol correspondant conduisant à la cétone **V-2**. Ces deux étapes permettent d'obtenir rapidement des α -hydroxycétones très différentes et marchent relativement bien quel que soit le substituant (voir Tableau V-1).

L'étape suivante est la condensation de cette cétone sur des malononitriles pour donner le **TCF**. Au contraire des précédentes, l'efficacité de celle-ci est dépendante du groupement R. Toujours dans le même article que précédemment, les auteurs expliquent que deux facteurs peuvent ralentir voire empêcher cette étape : l'encombrement stérique et des groupements électro-attracteurs. L'étape clé dans la formation du cycle **TCF** est l'attaque du nitrile par le groupe hydroxyle comme expliqué dans le premier chapitre. Quand le substituant est électro-donneur, l'anion oxygéné est plus nucléophile, plus réactif ce qui conduit à une amélioration de la cinétique et du rendement de la réaction. Au contraire, quand les substituants permettent de stabiliser l'anion en étant électro-attracteurs, la cyclisation est plus lente.

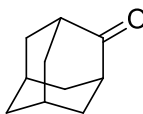
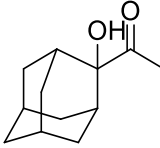
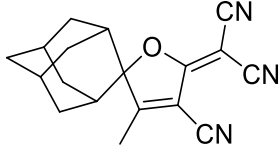
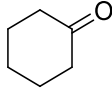
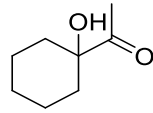
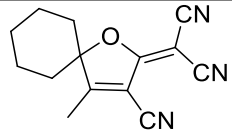
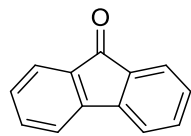
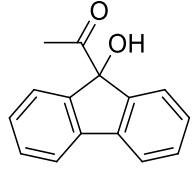
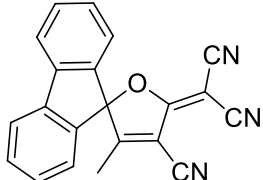
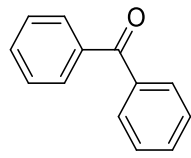
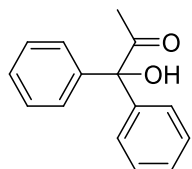
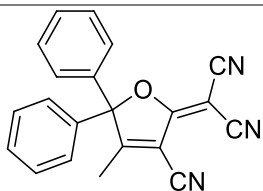
réf	cétone	α -cétol V-2	rendement	accepteur V-3	rendement
a			52 %		0 %
b			63 %		64 %
c			72 %		55 %
d			70 %		26 %

Tableau V-1. Exemple de dérivés **TCF** synthétisés par la voie présentée plus haut avec les rendements correspondants.

Les tentatives réalisées avec différentes cétones conduisent aux mêmes conclusions et sont résumées dans le Tableau V-1. Une cétone très encombrée comme l'adamantanone ne permet pas la formation du cycle **TCF (V-3a)**. Au contraire, en rigidifiant les substituants par formation d'un cycle (**cyclohexy-TCF V-3b** ou **fluorenyl-TCF V-3c**), il est possible d'obtenir des rendements de synthèse très intéressants : au-delà de 50 %. Avec un composé diphenyle (**diphenyl-TCF**), plus encombré car non plan, le rendement diminue. La dernière étape est l'habituelle condensation de Knoevenagel en conditions micro-ondes. L'aldéhyde utilisé est l'isovanilline pour facilement comparer les propriétés avec **Isovanilline-TCF**.

5.B. Une spectroscopie surprenante

Les composés **V-4b-d** présentent tous une fluorescence rouge à l'état solide. Leurs spectres d'émission sont présentés Figure V-38. La première chose que l'on peut signaler est que, même si les groupements R ne sont pas conjugués au reste de la molécule, et donc interviennent peu par leur densité électronique, ils sont très importants pour les interactions intermoléculaires et l'arrangement au sein de la phase condensée. Ceci a des conséquences importantes sur les propriétés spectroscopiques : le maximum d'émission se décale vers le bleu, de 710 nm pour **Isovanilline-TCF** à 633 nm pour **V-4c** avec un fluorényle. Ce décalage hypsochrome s'accompagne d'une diminution du rendement quantique (voir Tableau V-2). Plus le groupement est gros et encombré, plus la fluorescence est faible et décalée vers le bleu. En augmentant la taille de ces groupements latéraux, les molécules peuvent être plus espacées et la structure se rapproche d'un agrégat H. Seul le composé diphenyle déroge à cette règle avec un maximum d'émission à 655 nm sensiblement plus décalé vers le rouge que le composé avec un fluorène.

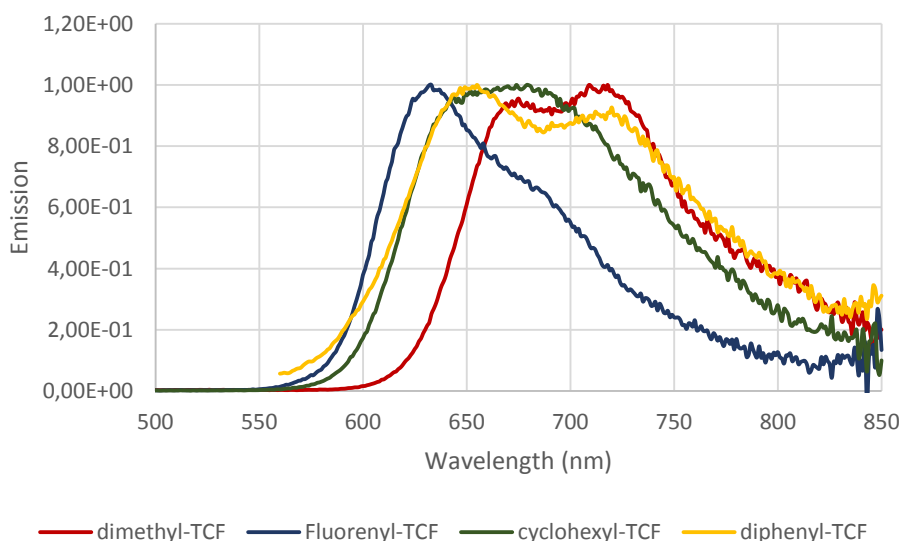
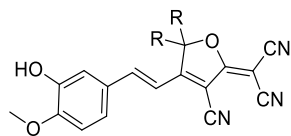


Figure V-38. Spectres d'émission normalisés des composés présentant une variation de la tête **TCF**. $\lambda_{exc} = 460$ nm.



R = Me R = Cyclohexyl R = Fluorenyl R = phenyl

λ_{em} (nm)	Solide	710	674	633	655
Φ_f		11 %	7 %	4 %	3 %
λ_{em} (nm)	Suspension	674	688	616	650
Φ_f		9 %	6 %	1 %	1,6 %
α_{AIE}		7,5	3,5	1,3	1,8

Tableau V-2. Propriétés à l'état solide et en suspension dans un mélange DMSO/H₂O (50 μ M) des composés avec différentes têtes TCF.

5.C. Une baisse de solubilité

Nous avons ensuite effectué les mêmes expériences de suspension pour vérifier la baisse de solubilité des fluorophores. Premier point positif : il a été possible de réaliser ces expériences à seulement 10 μ M contre 50 μ M pour la sonde **Isovanilline-TCF**. A 10 μ M, cette dernière ne précipite pas ; la solubilité est donc bien baissée en remplaçant les méthyles du TCF.

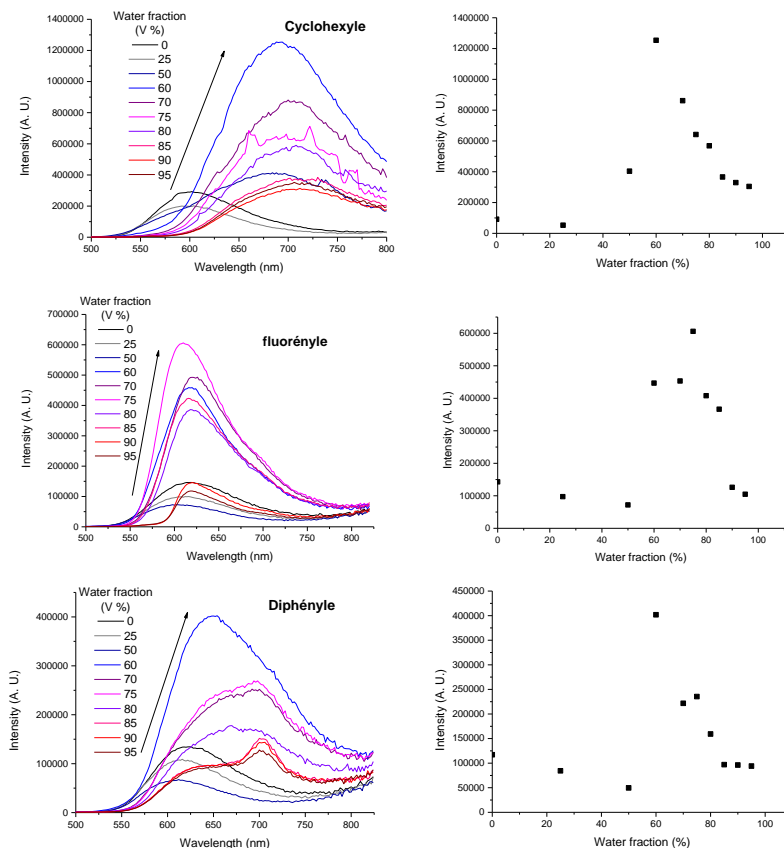


Figure V-39. Gauche : spectres d'émission dans un mélange DMSO/eau des dérivés du fluorophore **isovanilline-TCF** (50 μ M) à différents f_w (λ_{exc} est situé au maximum d'absorption dans le DMSO). Droite : évolution de l'intensité à la longueur d'onde d'émission la plus intense de la suspension en fonction de f_w .

Pour pouvoir comparer plus facilement avec **Isoanillin-TCF**, les expériences d'AIE ont été réalisées à 50 μM (voir Figure V-39). Tout d'abord, en solution, l'intensité de fluorescence est relativement proche, quelle que soit la substitution (Figure V-40) à l'exception du composé cyclohexyle qui est quasiment deux fois plus fluorescent ($\Phi_f = 1,9\%$). Des variations apparaissent cependant lors des expériences AIE : comme attendu, la fluorescence solide apparaît à des f_w plus faibles, ce qui confirme la baisse de solubilité. Surtout et malheureusement, les composés porteurs de cycles aromatiques sont beaucoup moins fluorescents avec des intensités maximales et des rendements quantiques de fluorescence bien inférieurs aux deux autres composés (voir Figure V-40 et Tableau V-2). Les deux composés les plus intéressants semblent donc être les composés substitués par des chaînes alkyles. Cependant, lorsqu'on les compare, l'intensité maximale du composé cyclohexyle se trouve à des f_w beaucoup plus riches en DMSO (40 %), ce qui nous éloigne des conditions biologiques. Aux très fortes fractions en eau, **Isovanilline-TCF** est trois fois plus fluorescent. De plus, comme le composé **isovanilline-TCF** est moins fluorescent en solution, le facteur α_{AIE} est plus élevé, ce qui permettra une plus grande augmentation de la fluorescence lors d'un test enzymatique.

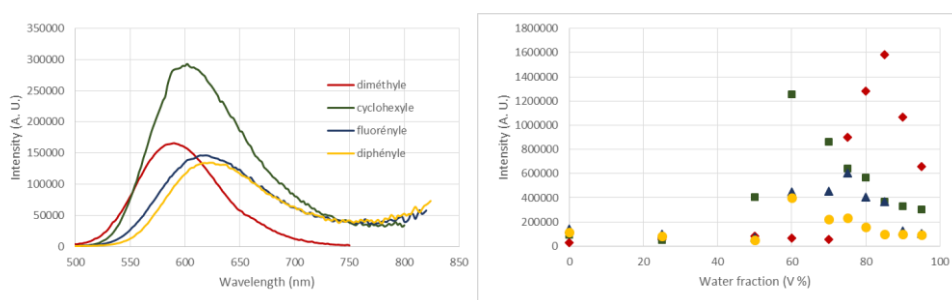


Figure V-40. Gauche : spectres d'émission dans le DMSO des différents fluorophores. λ_{exc} est situé au maximum d'absorption pour chacun. Droite : superposition de l'évolution de l'intensité d'émission à différents f_w des quatre composés.

Cette étude sur les variations de la tête **TCF** a permis de diminuer la solubilité du fluorophore **isovanilline-TCF**. Malheureusement, cela s'accompagne d'une diminution de l'intensité de fluorescence, du décalage vers le bleu des longueurs d'onde et d'une possible diminution du caractère turn-on des sondes avec un facteur α_{AIE} beaucoup plus faible. Nous avons donc cherché d'autres possibilités pour diminuer la solubilité de ce type de fluorophores.

V.6 Eloignement du substrat à l'aide d'un groupement hydrophobe

De plus, au cours de notre étude sur la fluorescence solide, nous nous sommes aperçus que les fluorophores présentant un groupement hydroxyle sont moins fluorescents à l'état solide que leurs

équivalents avec un groupement méthoxy. Or, dans l'approche présentée précédemment, il y a libération d'un groupement phénol. Pour conserver une intensité la plus élevée possible, nous avons alors décidé de substituer le l'oxygène par un groupement hydrophobe porteur de l'hydroxyle sur lequel est greffé le substrat. Pour diminuer au maximum la solubilité, nous avons privilégié les cycles aromatiques par rapport aux chaînes alkyles et choisi d'utiliser de nouveau des phénols (Figure V-41). Enfin pour des raisons synthétiques, nous avons privilégié des phénols substitués en para. L'architecture des nouvelles cibles est présentée Figure V-41.

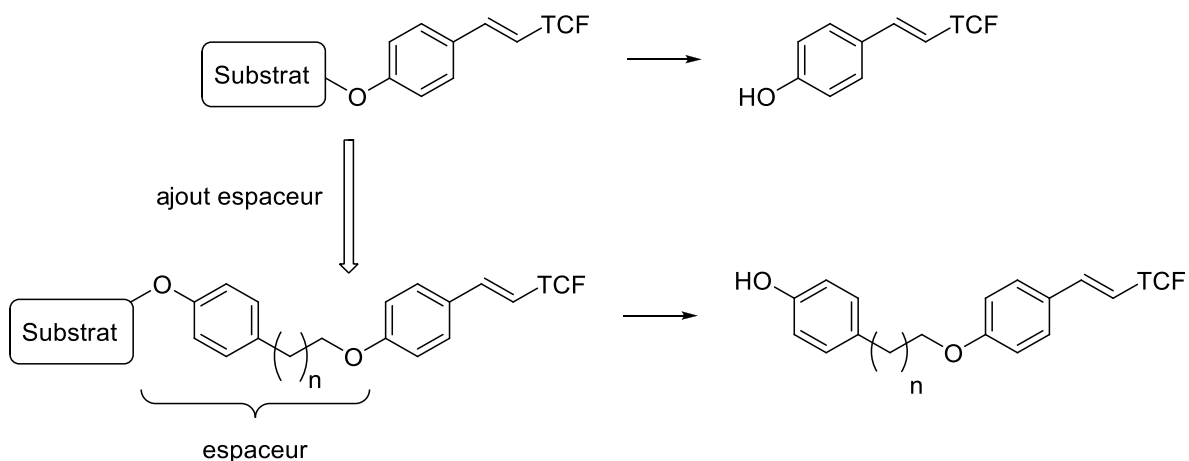


Figure V-41. Stratégie utilisée avec l'ajout d'un espaceur pour diminuer la solubilité et conserver une intensité de fluorescence élevée.

6.A. Choix de l'espaceur

Pour choisir le meilleur espaceur et pour des facilités de synthèse, nous avons comparé les propriétés de fluorescence de composés porteurs d'un cycle phényle et non phénol (voir Figure V-42) que l'on a appelé **p-C_n-TCF** (où n représente le nombre de carbone et varie de 0 à 3 et p une substitution en para).

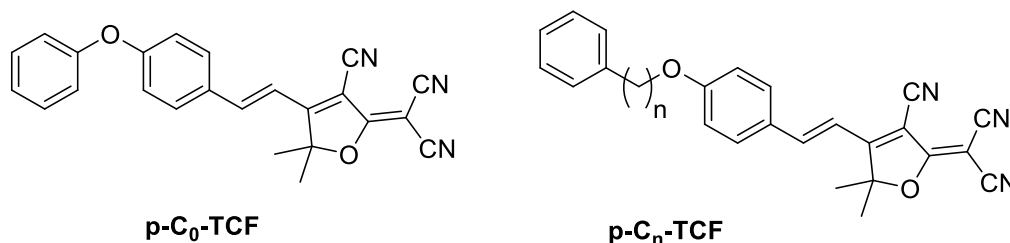


Figure V-42. Les fluorophores tests pour comparer les différentes longueurs de l'espaceur. avec $n = 1, 2, 3$

6.A.i Synthèse

La synthèse des différents aldéhydes correspondants (qu'on appellera par analogie **p-C_n-CHO**) est présentée dans la Figure V-43. Pour le composé sans carbone, une substitution nucléophile aromatique est réalisée entre le p-fluorobenzaldéhyde et le phénol en présence d'une base. Le produit précipite lors de l'ajout d'eau et permet une récupération par simple filtration.

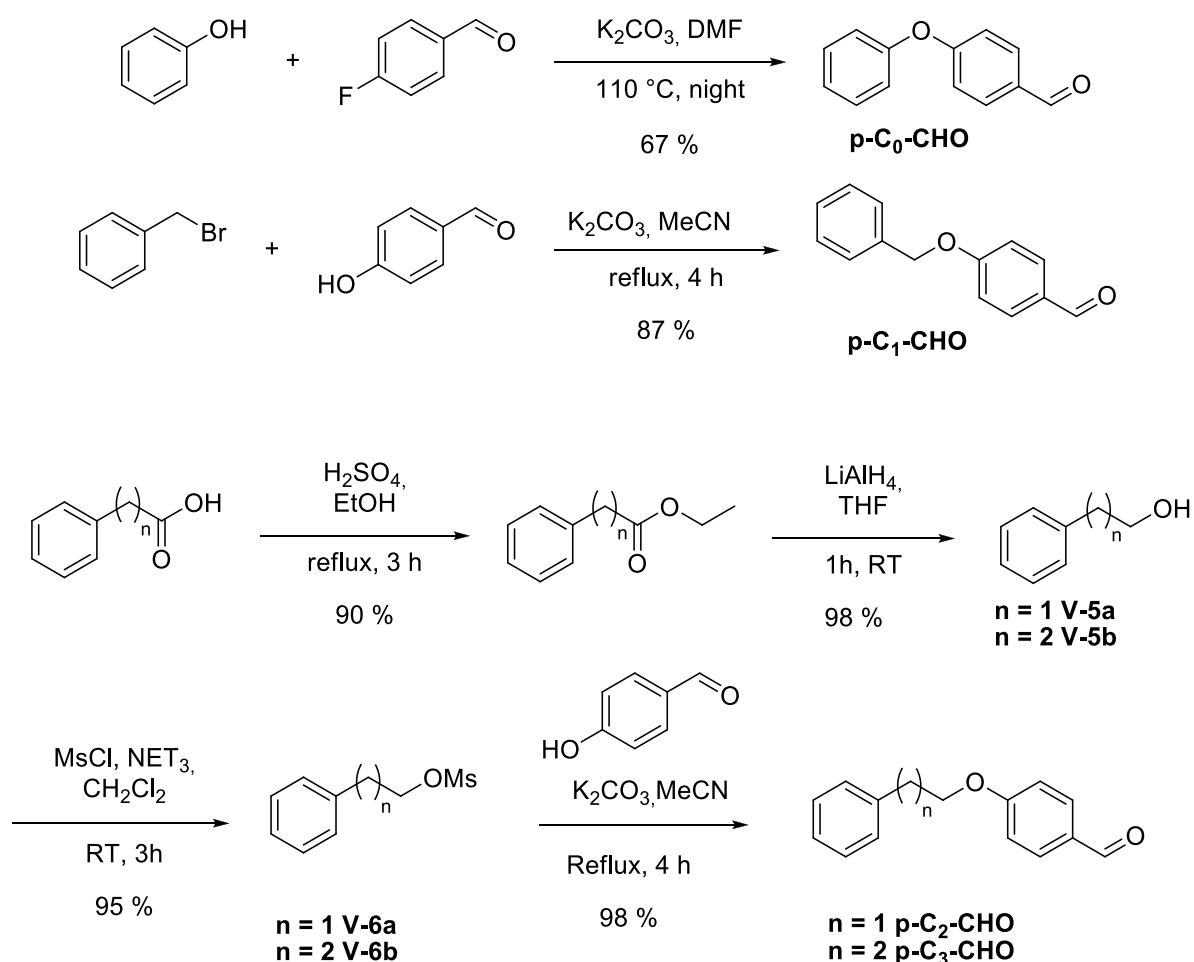


Figure V-43. Synthèse des aldéhydes **p-C_n-CHO** nécessaires pour tester la longueur du bras espaceur.

Avec un carbone, le produit de départ est le bromure de benzyle. Il subit une substitution nucléophile par le para-hydroxybenzaldéhyde pour donner l'aldéhyde **p-C₁-CHO**. Avec deux et trois carbones, la synthèse est plus longue : on part de l'acide carboxylique (respectivement acide 2-phényl acétique et acide 3-phényl propanoïque) qui est estérifié puis réduit en alcool par LiAlH₄. Le groupement alcool est mésylé pour en faire un groupe partant qui subit ensuite une substitution nucléophile par le para-hydroxybenzaldéhyde. Ces trois aldéhydes ont été obtenus avec de très bons rendements, au-dessus de 80 %. Les fluorophores correspondants sont ensuite obtenus avec une

condensation de Knoevenagel pour donner des poudres rouges à marron après purification par colonne de chromatographie.

6.A.ii Spectroscopie

La spectroscopie à l'état solide des différents composés est présentée dans le Tableau V-3 et sur la Figure V-44. Pour $n = 0$, la fluorescence n'est pas visible sous la lampe UV et n'a donc pas été mesurée. En augmentant le nombre de carbone, le maximum est progressivement décalé vers le rouge (de 619 nm à 672 nm) et le rendement quantique augmente (9 % puis 11 % puis 14 %). Un allongement du bras semble donc être favorable à la fluorescence à l'état solide

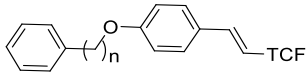
	Solide				suspension		
	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\lambda^a$ (nm)	Φ_f^b (%)	λ_{em} (nm)	Φ_f^b (%)	α_{AIE}
n = 1	562	619	57	9	613	12	97
n = 2	536	661	125	11	647	15	80
n = 3	552	672	120	14	624	8	7

Tableau V-3. Propriétés d'émission à l'état solide des composés avec un bras espaceur. ^a différence entre les longueurs d'onde d'excitation et d'émission, ^b mesuré avec une sphère d'intégration ;

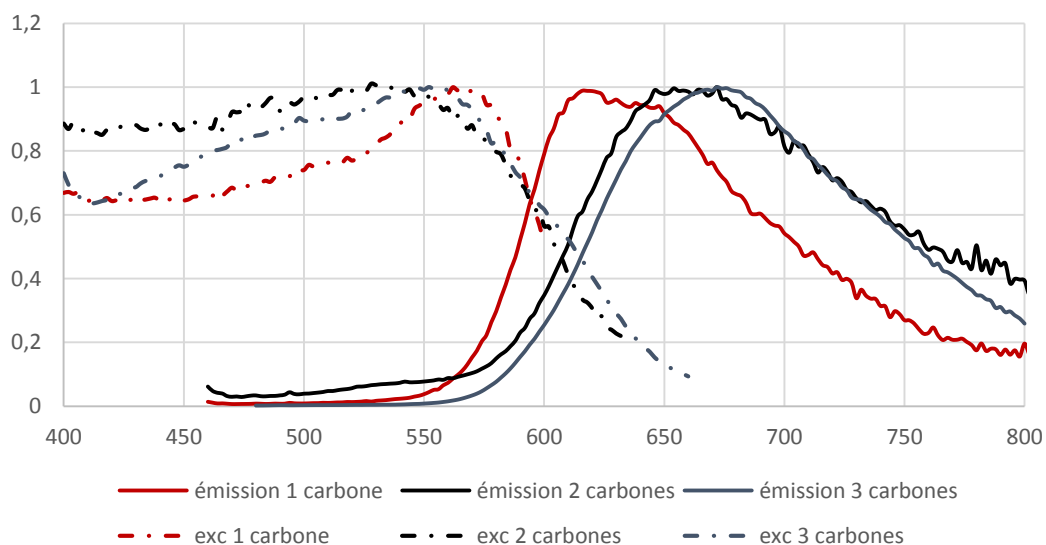


Figure V-44. Spectres d'excitation (en pointillés) et d'émission ($\lambda_{exc} = 460$ nm, traits pleins) des composés $p-C_n-TCF$.

Pour nous aider à déterminer la taille optimale, les propriétés AIE des composés ont été mesurées en suspension. Ces conditions sont en effet plus proches d'un possible milieu biologique. Les trois composés sont actifs en AIE, mais avec un comportement différent vis à vis de la précipitation : pour les deux plus longues chaînes, la fluorescence est maximale dans un mélange avec $f_w = 95$ %. Ceci

est très intéressant pour une application biologique où la proportion en eau est quasiment de 100 %. Au contraire, avec un seul carbone, le maximum a lieu pour $f_w = 85$ %. Pour tous les composés, les longueurs d'onde d'émission sont déplacées vers le bleu par rapport à la poudre mais plus la chaîne est courte, plus ce déplacement est faible : seulement 6 nm pour **p-C₁-TCF** avec un maximum à 613 nm contre 48 nm lorsqu'il y a trois carbones dans la chaîne (624 nm). Ceci fait que le composé à deux carbones est le plus déplacé vers le rouge avec un maximum d'émission à 647 nm. De plus, ce composé est le plus brillant avec un rendement quantique mesuré à 15 % et un facteur alpha égal à 80. En allongeant la longueur, la fluorescence diminue avec seulement $\Phi_f = 8$ % et $\alpha = 7$. Nous avons ainsi continué nos recherches avec un seul nombre de carbones : deux car le composé **p-C₂-TCF** présente les meilleures propriétés spectroscopiques en suspension.

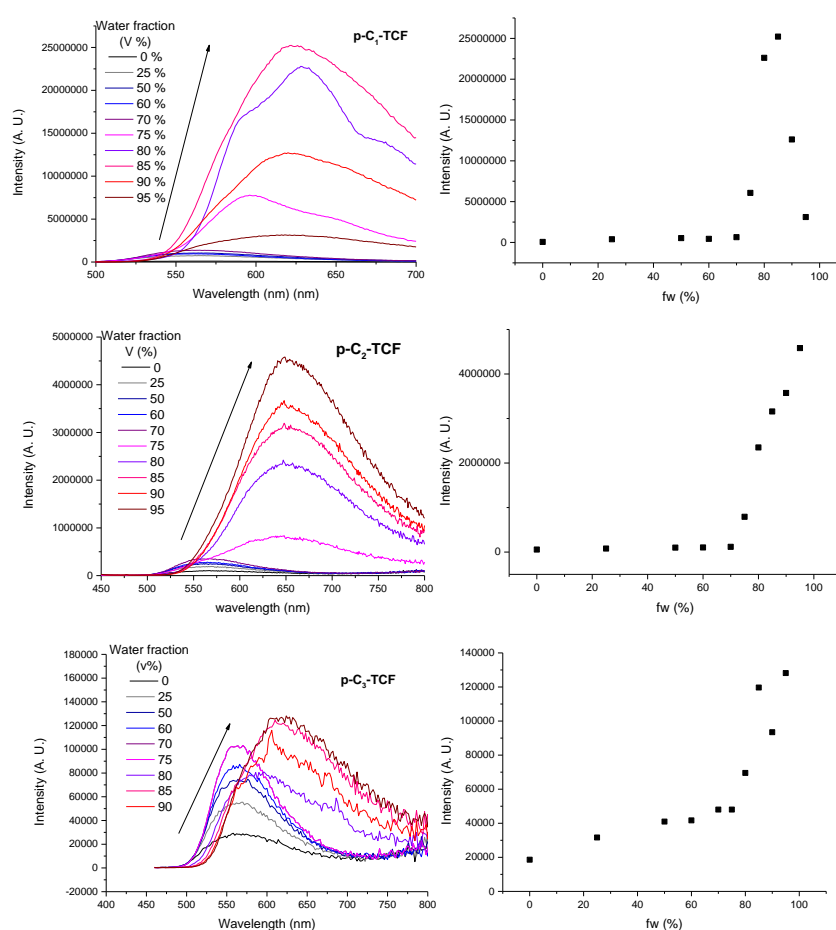


Figure V-45. Spectres d'émission des composés p-C_n-TCF dans un mélange THF/H₂O à différents f_w.

6.B. Nouvelles cibles

Le choix de l'espaceur à deux carbones permet ensuite de synthétiser de nouvelles cibles pour détecter une activité enzymatique. En greffant le substrat sur un phénol, il est possible de synthétiser une cible pour les deux enzymes présentées auparavant. Elles sont présentées dans la Figure V-46.

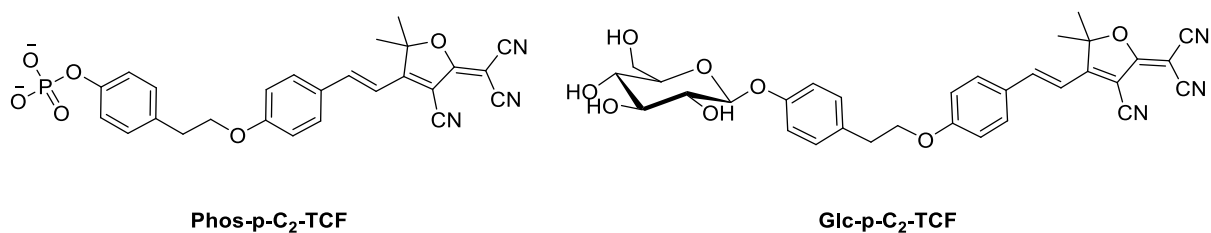


Figure V-46. Structure des sondes Phos-p-C₂-TCF pour l'alkaline phosphatase et Glc-p-C₂-TCF.

6.B.i Synthèse

La synthèse ressemble à celle présentée dans la Figure V-43 : l'acide *p*-hydroxyphénylacétique est estérifié puis réduit par LiAlH₄ pour donner l'alcool **V-7** avec un rendement de 85 % sur deux étapes. Après déprotonation du phénol par NaOH, la fonction phénolate est protégée sous forme d'acétate à l'aide d'anhydride acétique et la seconde fonction alcool est mésylée pour en faire un groupement partant. Le composé **V-9** est ainsi obtenu sur plusieurs grammes avec un rendement global de 63 %. Ce composé est très intéressant car il pourra ensuite être greffé sur différents phénols si le besoin s'en fait sentir. Une substitution nucléophile par le *p*-hydroxybenzaldéhyde puis une déprotection du phénol en milieu basique permet alors d'obtenir l'aldéhyde **HO-p-C₂-CHO**.

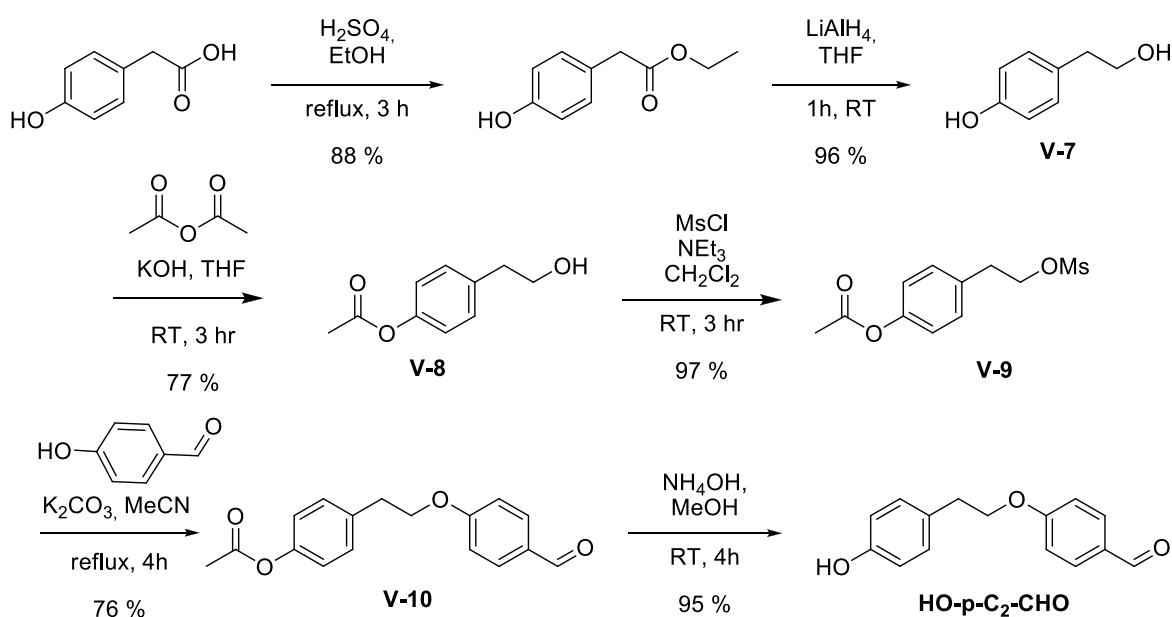


Figure V-47. Synthèse de l'intermédiaire commun à toutes les cibles.

Pour obtenir la sonde **Phos-p-C₂-TCF**, deux étapes sont ensuite nécessaires : la traditionnelle condensation de Knoevenagel (53 %) permet de récupérer **HO-p-C₂-TCF**, qui sera le fluorophore libéré. Une phosphorylation dans les mêmes conditions que celles présentées précédemment permet d'obtenir la cible avec un très bon rendement (Figure V-48).

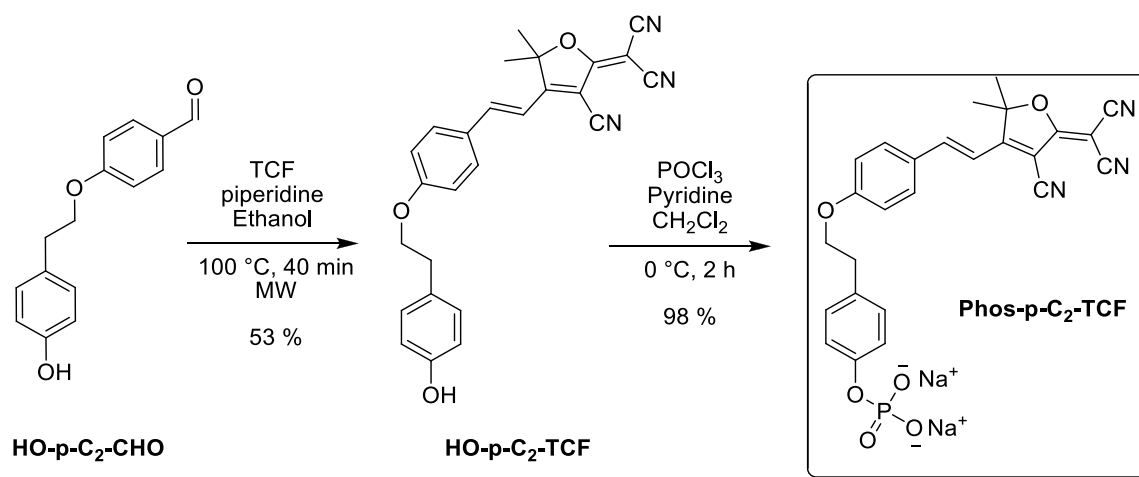


Figure V-48. Dernières étapes de la synthèse Phos-p-C₂-TCF à partir de l'intermédiaire HO-p-C₂-CHO

Pour l'autre sonde, dédiée à la β -glucosidase, trois étapes sont nécessaires. La stratégie est la même que pour **Glc-isoval-TCF** : d'abord une glycosylation par **Glc-Br** par catalyse par transfert de phase. La condensation de Knoevenagel et enfin la déprotection des acétates dans les mêmes conditions que précédemment permet d'obtenir la sonde **Glc-p-C₂-TCF**.

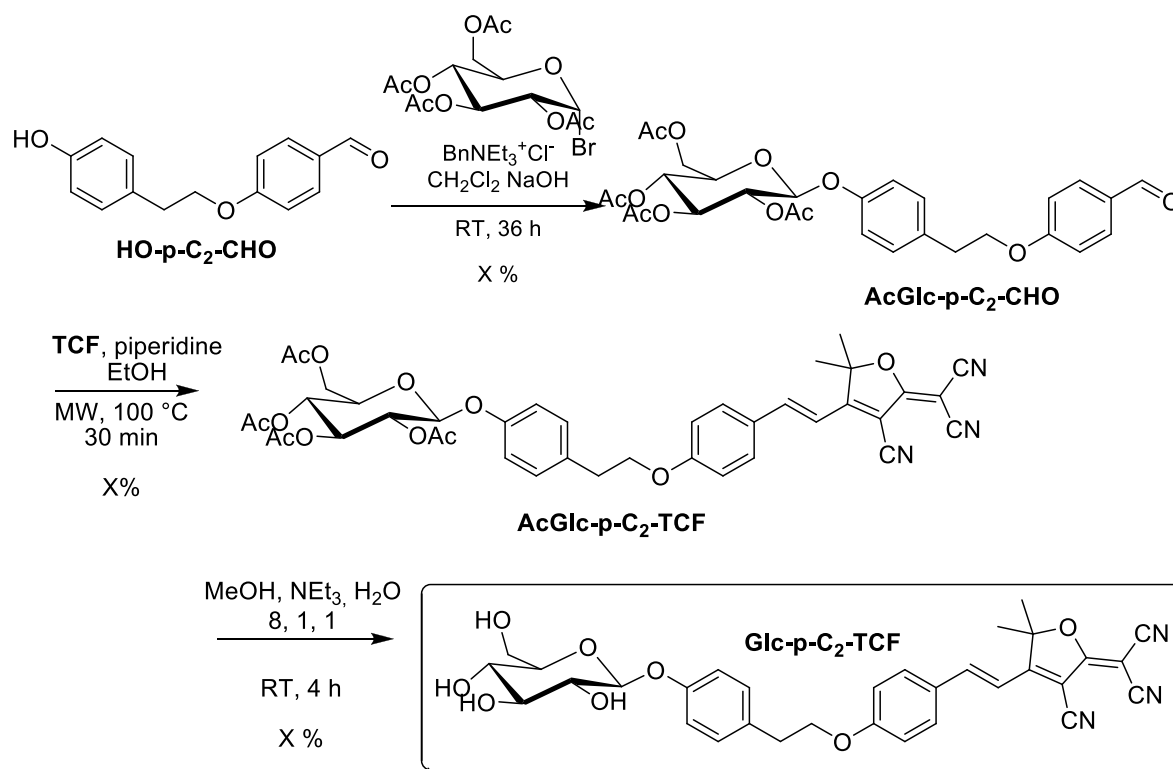


Figure V-49. Synthèse de la sonde Glc-p-C₂-TCF en trois étapes à partir de l'intermédiaire HO-p-C₂-CHO.

6.B.ii La β -glucosidase ne veut pas révéler ses secrets

Les résultats présentés dans cette section et la suivante ont été obtenus à la fin de cette thèse. Ils ne sont donc que préliminaires. Une étude plus poussée sera nécessaire ultérieurement. Lors de l'étude préliminaire de la β -glucosidase (Abg), il n'a malheureusement pas été possible de trouver un couple de longueurs d'onde permettant de ne visualiser que le phénol. En effet, comme pour **Glc-pH-TCF**, la sonde **Glc-p-C₂-TCF** est fluorescente en solution (tampon PBS, Figure V-50). De plus, les spectres d'excitation de la sonde (**Glc-p-C₂-TCF**) et du fluorophore (**HO-p-C₂-TCF**) sont relativement proches avec un maximum à 445 nm pour la sonde et à 455 nm pour le fluorophore. La Figure V-50 montre les spectres d'excitation et d'émission (avec une excitation à 460 nm non optimale). Le couple le plus favorable est alors une excitation à 500 nm et une émission à 700 nm. L'intensité émise par le phénol est alors quatre fois supérieure.

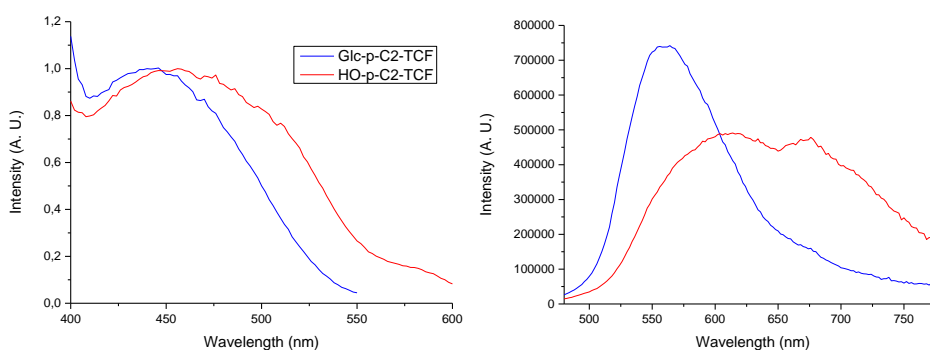


Figure V-50. Gauche : Spectres d'excitation (50 μ M, tampon PBS pH 7,4) des composés **Glc-p-C₂-TCF** (bleu) et **HO-p-C₂-TCF** (rouge). Droite : spectres d'émission dans les mêmes conditions ($\lambda_{exc} = 460$ nm).

Lors des tests enzymatiques (tampon PBS, pH 7,4, 3,2 nM d'Abg et 50 μ M de sonde **Glc-p-C₂-TCF**), il a été possible de noter une multiplication par trois de la fluorescence dès les dix premières minutes. La fluorescence augmente ensuite très lentement comme le montre la Figure V-51. Pendant les trois heures suivantes, la fluorescence continue d'augmenter, probablement grâce à une précipitation du composé phénolique. Malgré ces résultats, cette sonde n'est malheureusement pas assez fluorescente lorsqu'elle est activée. Une première explication peut être apportée par l'étude menée au paragraphe suivant où le changement de tampon occasionne une grande augmentation de l'intensité de fluorescence du fluorophore.

V.6 : Eloignement du substrat à l'aide d'un groupement hydrophobe

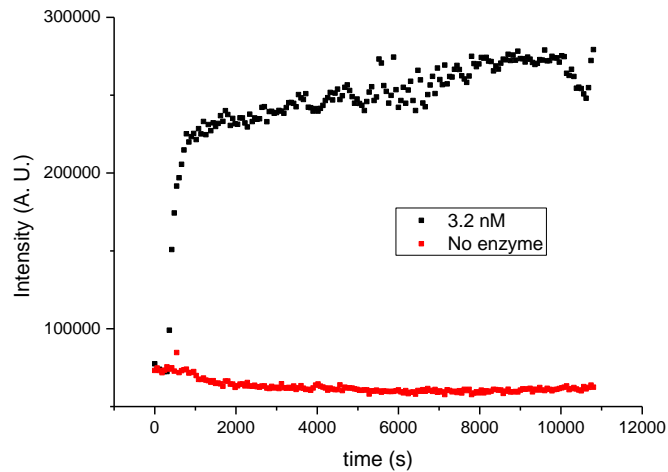


Figure V-51. Evolution de la fluorescence au cours de la digestion de Glc-p-C2-TCF par la glucosidase ($\lambda_{exc} = 500$ nm, $\lambda_{em} = 700$ nm).

6.B.iii Des premiers résultats sur la phosphatase encourageants

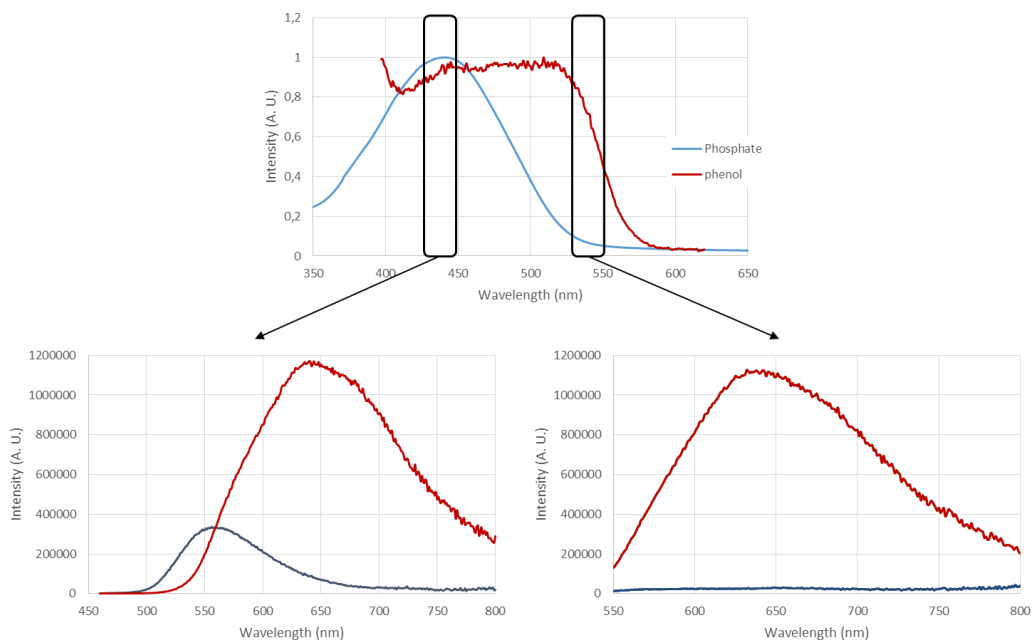


Figure V-52. Haut : spectres d'absorption et d'excitation de respectivement **Phos-p-C2-TCF** (bleu) et **HO-p-C2-TCF** (rouge) (50 µM, in Tris-HCl pH 8, température ambiante). Bas : spectres d'émission des composés dans les mêmes conditions avec respectivement $\lambda_{exc} = 440$ nm (gauche) et $\lambda_{exc} = 550$ nm (droite).

L'activité de la sonde **Phos-p-C2-TCF** vis-à-vis de la phosphatase alcaline a été vérifiée à pH 8, dans un tampon Tris-HCl. Ce changement de tampon est nécessaire car le tampon PBS est un tampon phosphate. Les résultats préliminaires ont montré que dans les conditions de l'étude (température ambiante, tampon Tris-HCl pH 8, 50 µM de composé), le fluorophore **HO-p-C2-TCF** précipite et est

fluorescent à l'état solide, bien plus que dans le tampon PBS. La Figure V-52 montre les spectres de fluorescence enregistrés pour deux longueurs d'onde d'excitation différentes : 450 nm, favorable à la sonde **Phos-p-C₂-TCF** et 540 nm pour laquelle l'absorbance de la sonde est très faible. Avec le couple 540 nm/635 nm on a alors une multiplication de la fluorescence par quarante, très bon signe pour une sonde OFF/ON.

Les résultats de l'étude enzymatique sont présentés dans la Figure V-53. Tout d'abord, en absorption, le pic situé à 450 nm, correspondant à l'absorption du phosphate diminue et s'élargit. De plus, l'absorption s'élargit avec une augmentation de l'absorption au-delà de 550 nm. Ceci correspond à la disparition du phosphate et à l'apparition d'une suspension. Nous avons pu vérifier que cette suspension est fluorescente avec le suivi cinétique de l'apparition de la fluorescence à 635 nm.

La Figure V-53 (droite) montre l'évolution de cette fluorescence avec différentes quantités d'enzyme ($t = 0$ a été fixé au moment de l'ajout de l'enzyme). Sans enzyme, il n'y a pas d'apparition de la fluorescence, ce qui montre une bonne stabilité de **Phos-p-C₂-TCF**. Que ce soit avec 0,5 U/L ou 0,01 U/L, on peut par contre constater l'apparition d'un précipité et l'augmentation de la fluorescence dès les trente premières secondes après l'ajout d'enzyme. Avec 0,5 U/L (soit pour cette enzyme 68 nM), le temps de demi-réaction de la sonde est alors 480 s. On constate une augmentation linéaire jusqu'à un palier après une demi-heure et une multiplication par trente de la fluorescence. La cinétique est réduite avec cinquante fois moins d'enzyme, puisque le palier n'est pas atteint après une heure de réaction (temps de demi-réaction calculé à 1260 s). Cependant un temps plus long pourrait permettre de vérifier si celui-ci correspond à la même valeur de fluorescence.

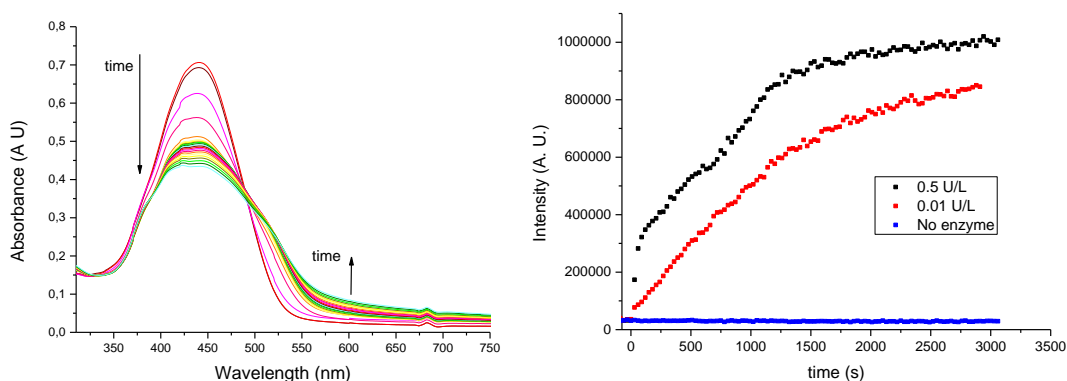


Figure V-53. Gauche : spectres d'absorption au cours de la réaction de la sonde avec 0,5 U/L de phosphatase alcaline (tampon Tris-HCl pH 8, 50 μ M de sonde). Droite : évolution de la fluorescence au cours de la même réaction (mêmes conditions, $\lambda_{exc} = 540$ nm, $\lambda_{em} = 635$ nm)

La limite de détection de notre sonde est fixée autour de 1 mM, comme le montre la Figure V-54. Pour des concentrations plus élevées en sonde **Phos-p-C₂-TCF**, on observe rapidement une

augmentation de la fluorescence avec une multiplication par une valeur supérieure à dix (respectivement 12, 24 et 30 en augmentant la concentration). Excepté pour 5 mM, la fluorescence augmente dans les trente secondes après l'ajout d'enzyme, ce qui indique que la concentration critique de précipitation est atteinte dès le début de la cinétique. Pour 5 mM, un temps de latence, de l'ordre de deux à trois minutes, est nécessaire pour atteindre cette concentration. Par contre, la courbe avec 1 mM montre une faible augmentation de l'intensité mesurée, seulement multipliée par cinq.

Ces résultats sont très intéressants car cette sonde semble réagir plus vite que les sondes présentées en introduction. Par exemple, dans la publication de Kim *et al.* présentant la sonde imino-coumarine, 350 nM de phosphatase sont nécessaires pour convertir 10 μM en trente minutes. Dans notre cas, il semble que 68 nM soient suffisantes pour 50 μM .

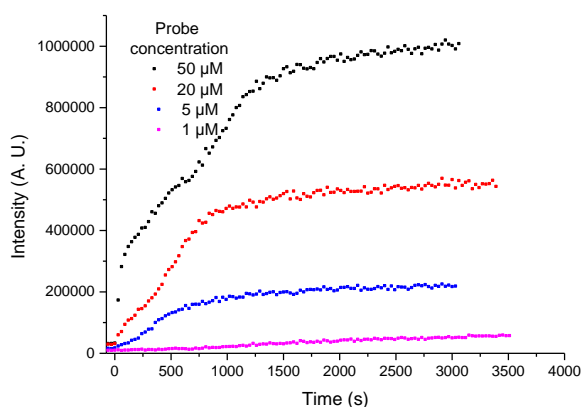


Figure V-54. Evolution de la fluorescence en fonction du temps et différentes concentrations de sonde (tampon Tris-HCl, pH 8, température ambiante) $\lambda_{exc} = 540 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 635 \text{ nm}$.

V.7 Conclusions

Le but de ce chapitre était de concevoir des sondes activables pour la détection enzymatique. Pour diminuer le risque de diffusion de l'espèce émissive, nous avons voulu utiliser les propriétés d'AIE et de précipitation des composés du chapitre précédent. Pour cela, nous nous sommes d'abord intéressés au fluorophore **Isovanilline-TCF**. Celui-ci est très fluorescent à l'état solide avec des longueurs d'onde d'émission très décalées vers le rouge (11 % @ 700 nm). Avec ce fluorophore, nous avons alors synthétisé deux sondes, l'une pour la phosphatase alcaline et l'autre pour la glucosidase. Malheureusement, ces sondes n'ont pas permis de détecter une activité enzymatique au contraire de leurs équivalents solubles basés sur le fluorophore **pH-TCF**. Ces résultats nous ont indiqué que l'architecture générale de ce type de sonde est satisfaisante, mais qu'il faut améliorer les fluorophores suivant deux axes : diminuer la solubilité et diminuer l'encombrement stérique pour faciliter l'accès au

site actif. Les sondes **Phos-pH-TCF** et **Glc-pH-TCF** sont, de leur côté, très intéressantes pour de nouvelles sondes solubles. Elles permettent une multiplication par 1,4 (**Phos-pH-TCF**) et 20 (**Glc-pH-TCF**) du signal avec une cinétique supérieure aux sondes commerciales. Cependant, la fluorescence de départ n'est pas nulle, ce qui empêche toute utilisation sur un mode OFF/ON.

Pour le premier axe d'amélioration, nous nous sommes intéressés à la possibilité de modifier la tête **TCF** pour augmenter son hydrophobie. Si les fluorophores ont pu être synthétisés avec succès, leurs propriétés à l'état solide (en poudre ou en suspension) n'ont pas permis d'envisager une utilisation pour notre objectif. En effet, les longueurs d'onde d'émission de ces composés sont décalées vers le bleu avec une baisse de l'intensité d'émission. La diminution de la solubilité ne compense pas ces défauts et nous avons envisagé une seconde approche.

Une autre possibilité envisagée est l'éloignement du substrat de la partie électrodonneuse de la molécule. L'utilisation d'un noyau aromatique permet alors d'augmenter l'hydrophobie et de diminuer la solubilité. La sonde **Phos-p-C₂-TCF** construite sur ce principe pour la détection de l'activité de la phosphatase alcaline permet ainsi de quasiment réaliser une sonde turn-on avec une fluorescence négligeable avant activation et une intensité multipliée par 30 au cours de la réaction enzymatique. La sonde créée pour la détection de l'activité de la glucosidase (**Glc-p-C₂-TCF**) n'a pas présenté de résultats aussi prometteurs même si une multiplication par 5 du signal est observable après plusieurs heures.

Ces résultats ne sont pour l'instant que préliminaires : les différentes sondes doivent ainsi être testées en conditions biologiques, pour vérifier leur toxicité et la possibilité de retrouver les mêmes comportements vis-à-vis de l'activation de la fluorescence. En particulier, **Glc-pH-TCF** semble être extrêmement fluorescente en bactérie, plus que **pH-TCF**, ce qui remet en cause les résultats présentés dans cette partie. De même, **Phos-p-C₂-TCF** n'a été synthétisée qu'à la fin de la thèse ; de nombreuses expériences sont nécessaires pour valider cette approche. La principale limite de ces sondes reste toujours la solubilité trop importante. Celle-ci pourrait être modifiée en utilisant d'autres groupements électro-donneurs. L'utilisation d'un poly phénol (cathécol par exemple) pourrait ainsi permettre l'introduction de plusieurs groupements aromatiques et diminuer la solubilité. De plus, un tel cœur pourrait être substitué par plusieurs substrats, permettant la détection simultanée de différentes enzymes (Figure V-55).

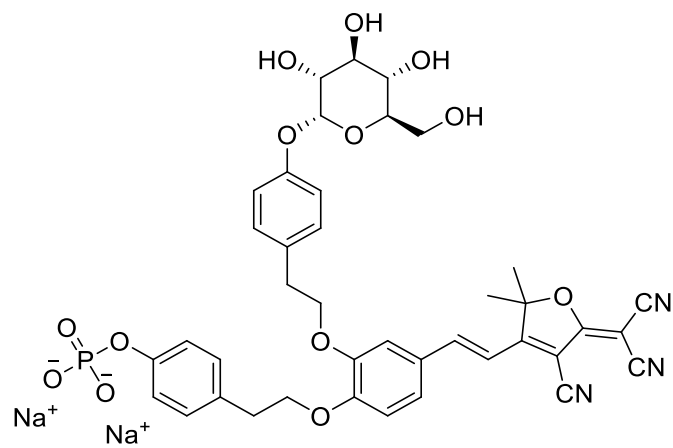


Figure V-55. Proposition de sonde pouvant être activée par la combinaison de deux enzymes.

Conclusions et perspectives

Nous avons cherché au cours de cette thèse à développer l'utilisation de fluorophores dipolaires particuliers pour l'imagerie biologique. Les fluorophores dérivés du tricyanofurane, puisque c'est d'eux dont il s'agit, présentent une émission dans le rouge adaptée aux milieux biologiques. De plus, ils présentent d'autres avantages : ils sont en effet relativement solubles en milieu aqueux, photostables et semblent peu toxiques. Nous avons choisi pour notre étude des composés dont le groupement électro-donneur est oxygéné pour moduler et adapter les propriétés des fluorophores et être capable d'imager divers événements cellulaires.

Lorsqu'on travaille avec un phénol, il est possible d'obtenir une molécule présentant des propriétés spectroscopiques sensibles au pH de l'environnement. En effet, la simple conjugaison avec le tricyanofurane permet d'abaisser le pKa du phénol à une valeur de 7,6. Il est même possible de faire varier ce pKa en utilisant des phénols substitués : un effet inductif attracteur permet ainsi de baisser la valeur du pKa jusqu'à 4,8 et de couvrir une large gamme de pH cible. A pH acide, le phénol protoné présente une absorption autour de 450 nm et une émission décalée vers le rouge autour de 570 nm. Lorsque le pH est élevé, le phénolate déprotoné possède des caractéristiques différentes, absorption à 580 nm et émission à 720 nm. Ces sondes pour le pH ont été utilisées pour détecter de manière ratiométrique des variations intracellulaires de pH grâce à une collaboration avec l'équipe du Pr Jacques Samarut, à l'IGFL de Lyon.

Lorsque le caractère dipolaire du fluorophore est brisé, la molécule n'est plus émissive. Nous nous sommes servis de cette caractéristique pour bâtir des sondes « turn-on » sensibles au peroxyde d'hydrogène. En remplaçant le phénol par un groupement pinacolborane, la fluorescence est éteinte, mais elle peut être récupérée par réaction de la sonde avec H_2O_2 qui reforme le phénol **pH-TCF**. Cette sonde présente quelques caractéristiques très intéressantes : une cinétique de réaction relativement élevée ($k_{app} = 9,9 \text{ s}^{-1}$ pour $[H_2O_2] = 1 \text{ mM}$) ainsi qu'une très bonne limite de détection puisque la sonde est capable de détecter des concentrations autour de la centaine de nanomolaire. Enfin, en plus d'être relativement sélective la sonde **P-TCF** libère une sonde sensible au pH, ce qui permet de faire d'une pierre deux coups et d'imager le peroxyde d'hydrogène et le pH en même temps.

A l'exception des sondes pH, il n'a malheureusement pas été possible de tester ces sondes pour une imagerie *in-vitro*. Des études plus poussées sont donc nécessaires afin de vérifier la possibilité d'utiliser les sondes décrites pour des applications au service des biologistes. Les fluorophores en solution présentés dans cette thèse (pour le pH ou le peroxyde d'hydrogène) peuvent aussi être fonctionnalisés pour cibler certains compartiments cellulaires, assurer la solubilité aqueuse ou encore

cibler certaines cellules cancéreuses. Nous avons essayé, pour notre part, de cibler les mitochondries avec **Mito-pH-TCF**. Ce premier exemple ne doit cependant pas cacher les très larges possibilités offertes par la simplicité de la synthèse et l'existence de groupements hydroxyles qui permettent de greffer un grand nombre de groupements d'intérêt.

Les fluorophores **TCF** présentent aussi des caractéristiques intéressantes à l'état solide : sous lampe UV, la poudre des sondes pH présente une fluorescence orange ou rouge. Nous avons alors synthétisé différents fluorophores ayant des méthoxys comme groupements donneurs et étudié leurs propriétés spectroscopiques à l'état solide. Suivant le motif de substitution et le nombre de groupements, il est possible d'obtenir une très large gamme de fluorescence avec des maxima variant de 585 nm à au-delà de 700 nm avec des rendements quantiques supérieurs à 20 %, ce qui est rare pour de si petites molécules. De plus, les fluorophores sont quasiment tous actifs vis-à-vis de la précipitation (AIE) avec des multiplications du signal pouvant aller jusqu'à 300 entre la solution et la suspension. Pour améliorer les propriétés de fluorescence, nous nous sommes intéressés à d'autres substitutions ou d'autres pont π -conjugués. Par exemple, l'emploi d'atomes d'halogènes permet d'augmenter l'intensité de fluorescence mais cela se fait au prix d'un décalage hypsochrome (20 nm pour un fluor et 50 nm pour un chlore). L'utilisation d'un groupement donneur carbazole permet, quant à lui, un décalage bathochrome : le composé **Cbz-TCF**, par exemple, possède un rendement quantique supérieur à 10 % pour un maximum situé à 740 nm. L'obtention de structures cristallographiques a permis de mieux comprendre l'importance des interactions intermoléculaires au sein de la phase condensée avec des agrégats J plus fluorescents et plus décalés vers le rouge que les agrégats H.

Nous avons ensuite voulu utiliser la fluorescence à l'état solide pour une détection de l'activité enzymatique. Pour commencer, différents substrats (phosphate ou glucose) ont été greffés sur le fluorophore **Isovanilline-TCF**. En théorie, l'activité enzymatique s'accompagne de la libération d'un fluorophore insoluble et celle-ci s'accompagne d'une émission à l'état solide. Malheureusement, cette première génération de sonde ne précipite pas suffisamment rapidement. Une étude a donc été menée pour diminuer la solubilité en milieu aqueux. Le travail sur les variations du **TCF** n'a cependant pas permis de conserver des propriétés d'émission suffisamment importantes pour permettre l'utilisation visée ; nous avons alors proposé l'ajout d'un groupement hydrophobe entre le substrat et le fluorophore, ce qui nous a conduit à **HO-p-C₂-TCF** qui présente un maximum de fluorescence à 635 nm. Le greffage d'un phosphate permet alors la création d'une sonde qui libère le fluorophore après activité enzymatique. La fluorescence est multipliée par 30 en moins d'une demi-heure avec des concentrations en enzymes inférieures à la dizaine de nanomolaires. Pour la sonde dédiée à la glucosidase, la multiplication n'est que de trois, principalement due à une faible séparation des

spectres d'excitation de la sonde et du fluorophore et une grande fluorescence de la sonde glucosylée. Ces exemples ont été réalisés pour démontrer le concept et n'utilisent que des enzymes courantes. Cependant, il serait intéressant de : 1) vérifier le comportement de ces sondes dans les conditions demandées par nos collaborateurs (dans des bactéries et tri par cytométrie de flux) et 2) développer ce principe avec de nouvelles enzymes comme la glucuronidase, ou les caspases.

Les fluorophores tricyanofuranes semblent montrer une augmentation de l'intensité de fluorescence dans un environnement rigide et contraint. C'est pourquoi il pourrait être très intéressant d'encapsuler nos fluorophores dans des matrices, que ce soit des hydrogels pour les sondes pH ou des matrices de silice pour nos composés fluorescents à l'état solide. Dans un hydrogel, la sonde pH serait sensible au milieu extérieur et formerait un indicateur solide. L'amélioration espérée des propriétés spectroscopiques s'accompagnerait alors d'un changement d'applications car un tel gel ne peut pénétrer à l'intérieur d'une cellule.

Pour une utilisation biologique, il serait intéressant de se tourner vers des nanoparticules de silice. Une telle utilisation s'inscrit dans le cadre d'une collaboration de longue date avec l'institut Neel, à Grenoble, pour des fluorophores encapsulés permettant une imagerie par angiographie. Les fluorophores **TCF** présentent en effet des caractéristiques intéressantes pour de telles applications avec de hauts rendements quantiques et une émission très décalée vers le rouge, dans la fenêtre de transparence biologique.

Un autre projet est en préparation avec l'utilisation de nano-capsules de polymères. Le but est de combiner la nano-précipitation du fluorophore avec la formation d'une nano-capsule de polymère qui enrobe le cœur émissif. L'utilisation de polymère permet une fonctionnalisation de la surface de la nanoparticule avec des molécules d'intérêt biologique (biotine, nanoparticule métallique pour l'IRM) pour développer une nouvelle famille d'outils pour l'imagerie biologique.

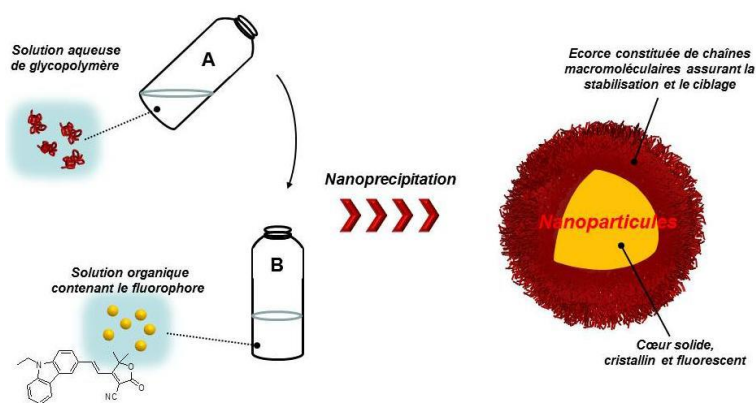


Figure V-56. Figure représentant la stratégie employée pour la synthèse de nano-capsules de polymère enrobant les fluorophores synthétisés durant cette thèse.

Enfin, de par leur petite taille, ces molécules auraient pu sembler peu intéressantes pour l'optique non linéaire et pourtant, d'après des résultats préliminaires non montrés ici, elles présentent une fluorescence par excitation à deux photons non négligeable, en particulier pour les fluorophores à l'état solide. Les premières études sont en cours et permettront de mieux comprendre l'importance de l'organisation au sein de la poudre pour de tels phénomènes. Ces caractéristiques sont aussi très intéressantes pour envisager une application biologique, car l'excitation se ferait alors à des longueurs d'onde proches de 1000 nm.

Chapitre VI Bibliographie

- [1] G. Melikian, F. P. Rouessac, C. Alexandre, *Synth. Commun.* **1995**, *25*, 3045–3051.
- [2] M. He, T. M. Leslie, J. A. Sinicropi, *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 2393–2400.
- [3] B. H. Robinson, L. R. Dalton, A. W. Harper, A. Ren, F. Wang, C. Zhang, G. Todorova, M. Lee, R. Anisfeld, S. Garner, et al., *Chem. Phys.* **1999**, *245*, 35–50.
- [4] C. Zhang, L. R. Dalton, M.-C. Oh, H. Zhang, W. H. Steier, *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 3043–3050.
- [5] C. Zhang, C. Wang, J. Yang, L. R. Dalton, G. Sun, H. Zhang, W. H. Steier, *Macromolecules* **2001**, *34*, 235–243.
- [6] M. E. van der Boom, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 3363–3366.
- [7] L. R. Dalton, B. H. Robinson, A. K. Y. Jen, W. H. Steier, R. Nielsen, *Opt. Mater. (Amst.)* **2003**, *21*, 19–28.
- [8] A. J. Kay, A. D. Woolhouse, Y. Zhao, K. Clays, *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 1321–1330.
- [9] D. W. Kim, S. C. Yoon, J.-S. Lim, C. Lee, *Opt. Mater. (Amst.)* **2007**, *29*, 1423–1428.
- [10] Y. Cheng, J. Luo, S. Hau, D. H. Bale, T. Kim, Z. Shi, D. B. Lao, N. M. Tucker, Y. Tian, L. R. Dalton, et al., *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 1154–1163.
- [11] R. Andreu, M. A. Cerdán, S. Franco, J. Garín, A. B. Marco, J. Orduna, D. Palomas, B. Villacampa, R. Alicante, M. Allain, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 4963–4966.
- [12] P.-A. Bouit, G. Wetzel, G. Berginc, B. Loiseaux, L. Toupet, P. Feneyrou, Y. Bretonnière, K. Kamada, O. Maury, C. Andraud, *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 5325–5335.
- [13] C. Cabanetos, W. Bentoumi, V. Silvestre, E. Blart, Y. Pellegrin, V. Montembault, A. Barsella, K. Dorkenoo, Y. Bretonnière, C. Andraud, et al., *Chem. Mater.* **2012**, *24*, 1143–1157.
- [14] W. Bentoumi, J.-C. Mulatier, P.-A. Bouit, O. Maury, A. Barsella, J.-P. Vola, E. Chastaing, L. Divay, F. Soyer, P. Le Barny, et al., *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 8909–13.
- [15] A. B. Cubitt, R. Heim, S. R. Adams, A. E. Boyd, L. A. Gross, R. Y. Tsien, *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20*, 448–455.
- [16] J. Bouffard, Y. Kim, T. M. Swager, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 37–40.
- [17] H. D. Lee, S. J. Lord, S. Iwanaga, K. Zhan, H. Xie, J. C. Williams, H. Wang, G. R. Bowman, E. D. Goley, L. Shapiro, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 15099–15101.
- [18] M.-Y. Wu, K. Li, C.-Y. Li, J.-T. Hou, X.-Q. Yu, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 183–185.

- [19] S. Y. Nishimura, S. J. Lord, L. O. Klein, K. A. Willets, M. He, Z. Lu, R. J. Twieg, W. E. Moerner, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 8151–8157.
- [20] H. Kobayashi, M. Ogawa, R. Alford, P. L. Choyke, Y. Urano, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2620–2640.
- [21] V. Ntziachristos, J. Ripoll, R. Weissleder, *Opt. Lett.* **2002**, *27*, 333–335.
- [22] L. D. Lavis, R. T. Raines, *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 142–155.
- [23] S. J. Lord, N. R. Conley, H.-L. D. Lee, S. Y. Nishimura, A. K. Pomerantz, K. a Willets, Z. Lu, H. Wang, N. Liu, R. Samuel, et al., *Chemphyschem* **2009**, *10*, 55–65.
- [24] S. J. Lord, Z. Lu, H. Wang, K. A. Willets, P. J. Schuck, H. D. Lee, S. Y. Nishimura, R. J. Twieg, W. E. Moerner, *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 8934–8941.
- [25] H.-L. Lee, E. A. Dubikovskaya, H. Hwang, A. N. Semyonov, H. Wang, L. R. Jones, R. J. Twieg, W. E. Moerner, P. A. Wender, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9364–9370.
- [26] N. R. Conley, A. K. Pomerantz, H. Wang, R. J. Twieg, W. E. Moerner, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 7929–7931.
- [27] X. Zhou, F. Su, Y. Tian, C. Youngbull, R. H. Johnson, D. R. Meldrum, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18530–18533.
- [28] S.-Y. Gwon, S.-H. Kim, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2014**, *117*, 810–813.
- [29] J. Park, H. Kim, Y. Choi, Y. Kim, *Analyst* **2013**, *138*, 3368–3371.
- [30] A. K. Atta, S.-B. Kim, J. Heo, D.-G. Cho, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 1072–1075.
- [31] A. E. Ondrus, H. D. Lee, S. Iwanaga, W. H. Parsons, B. M. Andresen, W. E. Moerner, J. Du Bois, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 902–912.
- [32] H. Y. Yoon, S. H. Shim, L. J. Baek, J.-I. Hong, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 2403–2405.
- [33] J. S. Yount, L. K. Tsou, P. D. Dossa, A. L. Kullas, A. W. M. van der Velden, H. C. Hang, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8244–8245.
- [34] M. K. Lee, J. Williams, R. J. Twieg, J. Rao, W. E. Moerner, *Chem. Sci.* **2013**, *42*, 220–225.
- [35] S. J. Lord, N. R. Conley, H. D. Lee, R. Samuel, N. Liu, R. J. Twieg, W. E. Moerner, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9204–9205.
- [36] T. Chen, Y. Zheng, Z. Xu, M. Zhao, Y. Xu, J. Cui, *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 2980–2982.
- [37] D. Villemin, L. Liao, *Synth. Commun.* **2001**, *31*, 1771–1780.
- [38] E. Font-Sanchis, F. J. Céspedes-Guirao, Á. Sastre-Santos, B. Villacampa, J. Orduna, R. Alicante, F. Fernández-Lázaro, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 4513–4520.

- [39] E. Font-Sanchis, R. E. Galian, F. J. Céspedes-Guirao, A. Sastre-Santos, L. R. Domingo, F. Fernández-Lázaro, J. Pérez-Prieto, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 7768–7771.
- [40] F. Gallego-Gómez, J. C. Álvarez-Santos, J. L. Rodríguez-Redondo, E. Font-Sanchis, J. M. Villalvilla, Á. Sastre-Santos, M. A. Díaz-García, F. Fernández-Lázaro, *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 12220–12228.
- [41] H. Wang, Z. Lu, S. J. Lord, W. E. Moerner, R. J. Twieg, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 3471–3474.
- [42] P. S. Aronson, J. Nee, M. A. Suhm, *Nature* **1982**, *299*, 161–163.
- [43] R. A. Johnson, *Arch. Biochem. Biophys.* **1982**, *218*, 68–76.
- [44] L. A. Menahan, K. D. Hepp, O. Wieland, *Eur. J. Biochem.* **1969**, *8*, 435–443.
- [45] R. A. Gottlieb, J. Nordberg, E. Skowronski, B. M. Babior, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93*, 654–658.
- [46] W. B. Busa, R. Nuccitelli, *Am J Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* **1984**, *246*, 409–438.
- [47] A. Ishaque, M. Al-Rubeai, *J. Immunol. Methods* **1998**, *221*, 43–57.
- [48] M. A. Barry, A. Eastman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *186*, 782–789.
- [49] A. Zetterberg, W. Engstrom, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1981**, *78*, 4334–4338.
- [50] H. Rubin, *J. Cell Biol.* **1971**, *51*, 686–702.
- [51] G. Calothy, C. M. Croce, V. Defendi, H. Koprowski, H. Eagle, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1973**, *70*, 366–368.
- [52] Y. Obara, H. Yoshida, L. S. Chai, H. Weinfeld, A. A. Sandberg, *J. Cell Biol.* **1973**, *58*, 608–617.
- [53] I. F. Tannock, D. Rotin, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4373–4384.
- [54] T. J. Rink, R. Y. Tsien, T. Pozzan, *J. Cell Biol.* **1982**, *95*, 189–196.
- [55] N. Boens, W. Qin, N. Basarić, A. Orte, E. M. Talavera, J. M. Alvarez-Pez, *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 9334–9343.
- [56] J. Liu, Z. Diwu, D. H. Klaubert, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 3069–3072.
- [57] J. Han, K. Burgess, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2709–2728.
- [58] J. E. Whitaker, R. P. Haugland, F. G. Prendergast, *Anal. Biochem.* **1991**, *194*, 330–344.
- [59] I. Kurtz, R. S. Balaban, *Biophys. J.* **1985**, *48*, 499–508.
- [60] Z. Zhujun, W. R. Seitz, *Anal. Chim. Acta* **1984**, *160*, 47–55.
- [61] J. Han, A. Loudet, R. Barhoumi, R. C. Burghardt, K. Burgess, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1642–1643.

- [62] S. Yao, K. J. Schafer-Hales, K. D. Belfield, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 5645–5648.
- [63] Y. Jin, Y. Tian, W. Zhang, S.-H. Jang, A. K.-Y. Jen, D. R. Meldrum, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 1375–1384.
- [64] H. Xu, M. Zhang, A. Zhang, G. Deng, P. Si, H. Huang, C. Peng, M. Fu, J. Liu, L. Qiu, et al., *Dye. Pigment.* **2014**, *102*, 142–149.
- [65] S. Liu, M. A. Haller, H. Ma, L. R. Dalton, S.-H. Jang, A. K.-Y. Jen, *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 603–607.
- [66] C. Hansch, A. Leo, R. W. Taft, *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 165–195.
- [67] A. Weller, *Zeitschrift für Elektrochemie, Berichte der Bunsengesellschaft für Phys. Chemie* **1952**, *56*, 662–668.
- [68] P. Peng, D. Strohecker, Y. Liao, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 8575–8577.
- [69] V. K. Johns, P. Peng, J. DeJesus, Z. Wang, Y. Liao, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 689–692.
- [70] A. M. Porcelli, A. Ghelli, C. Zanna, P. Pinton, R. Rizzuto, M. Rugolo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *326*, 799–804.
- [71] J. Santo-Domingo, N. Demaurex, *J. Gen. Physiol.* **2012**, *139*, 415–423.
- [72] E. Quatresous, C. Legrand, S. Pouvreau, *J. Gen. Physiol.* **2012**, *140*, 567–570.
- [73] M. F. Ross, T. A. Prime, I. Abakumova, A. M. James, C. M. Porteous, R. A. J. Smith, M. P. Murphy, *Biochem. J.* **2008**, *411*, 633–645.
- [74] S. C. Dodani, S. C. Leary, P. A. Cobine, D. R. Winge, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8606–8616.
- [75] G. Masanta, C. H. Heo, C. S. Lim, S. K. Bae, B. R. Cho, H. M. Kim, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 3518–3520.
- [76] M. Culcasi, G. Casano, C. Lucchesi, A. Mercier, J.-L. Clément, V. Pique, L. Michelet, A. Krieger-Liszky, M. Robin, S. Pietri, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 2487–2499.
- [77] H. Wang, Z. Lu, S. J. Lord, K. A. Willets, J. A. Bertke, S. D. Bunge, W. E. Moerner, R. J. Twieg, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 103–114.
- [78] B. Chance, H. Sies, A. Boveris, *Physiol Rev* **1979**, *59*, 527–605.
- [79] M. Giorgio, M. Trinei, E. Migliaccio, P. G. Pelicci, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 722–728.
- [80] L. C. Seaver, J. A. Imlay, *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 7182–7189.
- [81] R. F. Castilho, A. J. Kowaltowski, A. Meinicke, E. J. H. Bechara, A. E. Vercesi, *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *18*, 479–486.
- [82] E. R. Stadtman, *Free Radic. Res.* **2006**, *40*, 1250–1258.

- [83] S. Kanvah, J. Joseph, G. B. Schuster, R. N. Barnett, C. L. Cleveland, U. Landman, *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 280–287.
- [84] K. Ishikawa, K. Takenaga, M. Akimoto, N. Koshikawa, A. Yamaguchi, H. Imanishi, K. Nakada, Y. Honma, J.-I. Hayashi, *Science* **2008**, *320*, 661–664.
- [85] T. Finkel, N. J. Holbrook, *Nature* **2000**, *408*, 239–247.
- [86] M. Giorgio, E. Migliaccio, F. Orsini, D. Paolucci, M. Moroni, C. Contursi, G. Pelliccia, L. Luzi, S. Minucci, M. Marcaccio, et al., *Cell* **2005**, *122*, 221–233.
- [87] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, J. Telser, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*, 44–84.
- [88] N. Tavakoli, C. Kluge, D. Gollmack, T. Mimura, K.-J. Dietz, *Plant J.* **2001**, *28*, 51–59.
- [89] D. A. Davis, F. M. Newcomb, J. Moskovitz, P. T. Wingfield, S. J. Stahl, J. Kaufman, H. M. Fales, R. L. Levine, R. Yarchoan, *Biochem. J.* **2000**, *346*, 305–311.
- [90] Y. Keisari, L. Braun, E. Flescher, *Immunobiology* **1983**, *165*, 78–89.
- [91] S. Schreml, M. Landthaler, M. Schäferling, P. Babilas, *Exp. Dermatol.* **2011**, *20*, 229–231.
- [92] M. G. Bonini, C. Rota, A. Tomasi, R. P. Mason, *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, *40*, 968–975.
- [93] L. M. Henderson, J. B. Chappell, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *217*, 973–980.
- [94] N. Soh, *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386*, 532–543.
- [95] M. Schäferling, D. B. M. Grögel, S. Schreml, *Microchim. Acta* **2011**, *174*, 1–18.
- [96] P. Wardman, M. J. Burkitt, K. B. Patel, A. Lawrence, C. M. Jones, S. A. Everett, B. Vojnovic, *J. Fluoresc.* **2002**, *12*, 65–68.
- [97] N. Soh, O. Sakawaki, K. Makihara, Y. Odo, T. Fukaminato, T. Kawai, M. Irie, T. Imato, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 1131–1139.
- [98] H. Maeda, Y. Fukuyasu, S. Yoshida, M. Fukuda, K. Saeki, H. Matsuno, Y. Yamauchi, K. Yoshida, K. Hirata, K. Miyamoto, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 2389–2391.
- [99] K. Xu, B. Tang, H. Huang, G. Yang, Z. Chen, P. Li, L. An, *Chem. Commun.* **2005**, *41*, 5974–5976.
- [100] M. C. Y. Chang, A. Pralle, E. Y. Isacoff, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15392–15393.
- [101] W. P. Jencks, J. Carriuolo, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 1778–1786.
- [102] Y. Ren, H. Yamataka, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5660–5667.
- [103] E. W. Miller, O. Tulyathan, E. Y. Isacoff, C. J. Chang, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 263–267.
- [104] B. C. Dickinson, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9638–9639.

- [105] B. C. Dickinson, J. Peltier, D. Stone, D. V Schaffer, C. J. Chang, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 106–112.
- [106] A. E. Albers, V. S. Okreglak, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9640–9641.
- [107] A. R. Lippert, T. Gschneidner, C. J. Chang, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7510–7512.
- [108] N. Karton-Lifshin, E. Segal, L. Omer, M. Portnoy, R. Satchi-Fainaro, D. Shabat, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 10960–10965.
- [109] L. Yuan, W. Lin, S. Zhao, W. Gao, B. Chen, L. He, S. Zhu, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13510–13523.
- [110] T. Ogura, T. Usuki, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 2807–2815.
- [111] L. Chausset-Boissarie, R. Arvai, G. R. Cumming, C. Besnard, E. P. Kündig, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6264–6266.
- [112] A. R. Lippert, G. C. Van de Bittner, C. J. Chang, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 793–804.
- [113] G. Li, D. Zhu, Q. Liu, L. Xue, H. Jiang, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 924–927.
- [114] B. C. Dickinson, C. Huynh, C. J. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5906–5915.
- [115] X. Sun, S.-Y. Xu, S. E. Flower, J. S. Fossey, X. Qian, T. D. James, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 8311–8313.
- [116] J. Yoon, A. W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5874–5875.
- [117] J. B. Birks, *Photophysics of Aromatic Molecules*, Wiley, London, **1970**.
- [118] C.-T. Chen, *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 4389–4400.
- [119] P. Zrazhevskiy, M. Sena, X. Gao, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4326–4354.
- [120] P.-T. Chou, Y. Chi, *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 380–395.
- [121] T. Ozdemir, S. Atilgan, I. Kutuk, L. T. Yildirim, A. Tulek, M. Bayindir, E. U. Akkaya, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2105–2107.
- [122] W. Li, W. Lin, J. Wang, X. Guan, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 1768–1771.
- [123] D. Li, K. Wang, S. Huang, S. Qu, X. Liu, Q. Zhu, H. Zhang, Y. Wang, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 15298–15304.
- [124] B. Z. Tang, X. Zhan, G. Yu, P. Sze, *J. Mater. Chem.* **2001**, 2974–2978.
- [125] J. Luo, Z. Xie, J. W. Y. Lam, L. Cheng, B. Z. Tang, H. Chen, C. Qiu, H. S. Kwok, X. Zhan, Y. Liu, et al., *Chem. Commun.* **2001**, *381*, 1740–1741.
- [126] Y. Hong, J. W. Y. Lam, B. Z. Tang, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5361–5388.

- [127] Y. Hong, J. W. Y. Lam, B. Z. Tang, *Chem. Commun.* **2009**, 4332–4353.
- [128] Z. Zhao, S. Chen, X. Shen, F. Mahtab, Y. Yu, P. Lu, J. W. Y. Lam, H. S. Kwok, B. Z. Tang, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 686–688.
- [129] Z. Huang, E. Terpetschnig, W. You, R. P. Haugland, *Anal. Biochem.* **1992**, 39, 32–39.
- [130] G. O. W. Lins, L. F. Campo, F. S. Rodembusch, V. Stefani, *Dye. Pigment.* **2010**, 84, 114–120.
- [131] K. Sakai, H. Kawamura, N. Kobayashi, T. Ishikawa, C. Ikeda, T. Kikuchi, T. Akutagawa, *CrystEngComm* **2014**, 16, 3180.
- [132] Z. Zheng, Z. Yu, M. Yang, F. Jin, Q. Zhang, H. Zhou, J. Wu, Y. Tian, *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 3222–3234.
- [133] E. Ishow, A. Brosseau, G. Clavier, K. Nakatani, P. Tauc, C. Fiorini-Debuisschert, S. Neveu, O. Sandre, A. Léaustic, *Chem. Mater.* **2008**, 20, 6597–6599.
- [134] C. Shi, Z. Guo, Y. Yan, S. Zhu, Y. Xie, Y. S. Zhao, W. Zhu, H. Tian, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, 5, 192–198.
- [135] A. Singh, C.-K. Lim, Y.-D. Lee, J. Maeng, S. Lee, J. Koh, S. Kim, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, 5, 8881–8888.
- [136] C.-L. Chiang, M.-F. Wu, D.-C. Dai, Y.-S. Wen, J.-K. Wang, C.-T. Chen, *Adv. Funct. Mater.* **2005**, 15, 231–238.
- [137] Y.-T. Lee, C.-L. Chiang, C.-T. Chen, *Chem. Commun.* **2008**, 44, 217–219.
- [138] T. Ishi-i, M. Sakai, C. Shinoda, *Tetrahedron* **2013**, 69, 9475–9480.
- [139] M. Shimizu, Y. Takeda, M. Higashi, T. Hiyama, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2009**, 48, 3653–3656.
- [140] M. Shimizu, R. Kaki, Y. Takeda, T. Hiyama, N. Nagai, H. Yamagishi, H. Furutani, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, 51, 4095–4099.
- [141] Y. Liu, X. Tao, F. Wang, X. Dang, D. Zou, Y. Ren, M. Jiang, *J. Phys. Chem. C* **2008**, 112, 3975–3981.
- [142] G. Qian, B. Dai, M. Luo, D. Yu, J. Zhan, Z. Zhang, *Chem. Mater.* **2008**, 19, 6208–6216.
- [143] Y. Li, F. Li, H. Zhang, Z. Xie, W. Xie, H. Xu, B. Li, F. Shen, L. Ye, M. Hanif, et al., *Chem. Commun.* **2007**, 1, 231–233.
- [144] S. S. Palayangoda, X. Cai, R. M. Adhikari, D. C. Neckers, *Org. Lett.* **2008**, 10, 281–284.
- [145] H.-C. Yeh, W.-C. Wu, Y.-S. Wen, D.-C. Dai, J.-K. Wang, C.-T. Chen, *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 6455–6462.
- [146] J. Massin, W. Dayoub, J.-C. Mulatier, C. Aronica, Y. Bretonnière, C. Andraud, *Chem. Mater.* **2011**, 23, 862–873.

- [147] G. Scheibe, *Angew. Chemie* **1937**, *50*, 212–219.
- [148] E. E. Jelley, *Nature* **1937**, *139*, 631–632.
- [149] F. Würthner, T. E. Kaiser, C. R. Saha-Möller, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 3376–3410.
- [150] J. Gierschner, S. Y. Park, *J. Mater. Chem. C* **2013**, *1*, 5818–5832.
- [151] S. Choi, J. Bouffard, Y. Kim, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 751–755.
- [152] X. Zhang, Z. Chi, B. Xu, C. Chen, X. Zhou, Y. Zhang, S. Liu, J. Xu, *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 18505–18513.
- [153] Y. Naito, M. Sugiura, Y. Yamaura, C. Fukay, K. Yokoyama, Y. Nakagawa, T. Ikeda, M. Senda, T. Fujita, *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 1736–1745.
- [154] B. A. Kamino, B. Mills, C. Reali, M. J. Gretton, M. a Brook, T. P. Bender, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 1663–1674.
- [155] M. Prost, L. Canaple, J. Samarut, J. Hasserodt, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 1413–1417.
- [156] D. H. Kwan, H.-M. Chen, K. Ratananikom, S. M. Hancock, Y. Watanabe, P. T. Kongsaree, A. L. Samuels, S. G. Withers, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 300–303.
- [157] Y. Liu, C. Deng, L. Tang, A. Qin, R. Hu, J. Z. Sun, B. Z. Tang, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 660–663.
- [158] T. Sanji, K. Shiraishi, M. Tanaka, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2009**, *1*, 270–273.
- [159] H. Tong, Y. Hong, Y. Dong, M. Häussler, Z. Li, J. W. Y. Lam, Y. Dong, H. H.-Y. Sung, I. D. Williams, B. Z. Tang, *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 11817–11823.
- [160] Y. Hong, C. Feng, Y. Yu, J. Liu, J. W. Y. Lam, K. Q. Luo, B. Z. Tang, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 7035–7043.
- [161] S. Girouard, M.-H. Houle, A. Grandbois, J. W. Keillor, S. W. Michnick, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 559–566.
- [162] Y. Liu, Y. Yu, J. W. Y. Lam, Y. Hong, M. Faisal, W. Z. Yuan, B. Z. Tang, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 8433–8438.
- [163] V. B. Paragas, J. A. Kramer, C. Fox, R. P. Haugland, V. L. Singer, *J. Microsc.* **2002**, *206*, 106–119.
- [164] J. J. Naleway, C. M. J. Fox, D. Robinhold, E. Terpetschnig, N. A. Olson, R. P. Haugland, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 8569–8572.
- [165] M. Zhou, R. H. Upson, Z. Diwu, R. P. Haugland, *J. Biochem. Biophys. Methods* **1996**, *33*, 197–205.
- [166] A. Rukavishnikov, K. R. Gee, I. Johnson, S. Corry, *Anal. Biochem.* **2011**, *419*, 9–16.

- [167] O. Thorn-Seshold, M. Vargas-Sanchez, S. McKeon, J. Hasserodt, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 6253–6255.
- [168] J.-X. Wang, Q. Chen, N. Bian, F. Yang, J. Sun, A.-D. Qi, C.-G. Yan, B.-H. Han, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 2219–2226.
- [169] J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555–578.
- [170] H. Shi, R. T. K. Kwok, J. Liu, B. Xing, B. Z. Tang, B. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17972–17981.
- [171] X. Gu, G. Zhang, Z. Wang, W. Liu, L. Xiao, D. Zhang, *Analyst* **2013**, *138*, 242724–31.
- [172] J. Liang, R. T. K. Kwok, H. Shi, B. Z. Tang, B. Liu, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 8784–8789.
- [173] L. Jia, J.-P. Xu, D. Li, S.-P. Pang, Y. Fang, Z.-G. Song, J. Ji, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7166–7168.
- [174] X. Zhao, Y. Liu, K. S. Schanze, *Chem. Commun.* **2007**, *1*, 2914–2916.
- [175] Q. Chen, N. Bian, C. Cao, X.-L. Qiu, A.-D. Qi, B.-H. Han, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 4067–4069.
- [176] M. Kamiya, Y. Urano, N. Ebata, M. Yamamoto, J. Kosuge, T. Nagano, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 5439–5441.
- [177] T.-I. Kim, H. Kim, Y. Choi, Y. Kim, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9825–9827.
- [178] J. Chen, H. Jiao, W. Li, D. Liao, H. Zhou, C. Yu, *Chem. Asian J.* **2013**, *8*, 276–281.
- [179] R. D., *Biochem. J.* **1956**, *63*, 39–44.
- [180] W. S. Hays, D. E. Wheeler, B. Eghtesad, R. H. Glew, D. E. Johnston, *Hepatology* **1998**, *28*, 156–163.
- [181] Y. Li, H. Wang, J. Li, J. Zheng, X. Xu, R. Yang, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 1268–1274.
- [182] B. J. Ayers, J. Hollinshead, A. W. Saville, S. Nakagawa, I. Adachi, A. Kato, K. Izumori, B. Bartholomew, G. W. J. Fleet, R. J. Nash, *Phytochemistry* **2014**, *100*, 126–131.
- [183] L. Porrès, A. Holland, L.-O. Pålsson, A. P. Monkman, C. Kemp, A. Beeby, *J. Fluoresc.* **2006**, *16*, 267–272.
- [184] J. C. De Mello, H. F. Wittmann, R. H. Friend, *Adv. Mater.* **1997**, *9*, 230–232.

Partie expérimentale

VI.1 General Information

Commercially available materials were used as received. Analytical thin-layer chromatography (TLC) was carried out on Merck 60 F254 precoated silica gel plate (0.2 mm thickness). Visualization was performed using a UV lamp. Anhydrous solvent (THF, CH₂Cl₂) were dried over Al₂O₃ column. Microwave syntheses were conducted in 20 mL sealed tube on a Biotage Initiator 2.5 single-mode reactor using external IR temperature control. Column chromatography was performed on Merck Gerduran 60 (40-63 μm) silica.

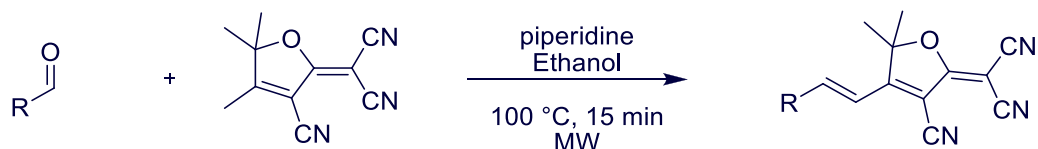
Melting points were recorded on a Koffler bench operating between 30 and 270°C. NMR spectra were recorded at ambient temperature on a standard spectrometer operating at 500 MHz or 300 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C. Chemical shifts are given in parts per million (ppm,) and are reported relative to tetramethylsilane (¹H, ¹³C, ³¹P) using the residual solvent peaks as internal standard. ¹H NMR splitting patterns are designated as singlet (s), doublet (d), triplet (t), quartet (q), dd (doublet of doublets), q (quadruplet), quint (quintuplet) or m (multiplets). Infrared spectra (IR) were recorded on a FT-IR spectrophotometer and are reported as wavelength numbers (cm⁻¹). Low resolution mass spectra were taken on a LC-MS instrument.

Absorption spectra (UV-Vis) were recorded on a dual beam spectrometer and are reported as absorption maximum wavelength (λ_{max}, nm) and molar extinction coefficient at the absorption maximum wavelength (ε, L.mol⁻¹.cm⁻¹). Fluorescence spectra were performed on a spectrofluorimeter equipped with a red-sensitive photomultiplier tube. Spectra were reference corrected for both the excitation source light intensity variation (lamp and grating) and the emission spectral response (detector and grating).

VI.2 Synthesis

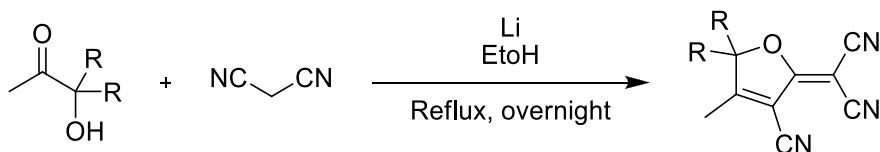
2.A. General Procedures

2.A.i General Procedure A: Knoevenagel condensation



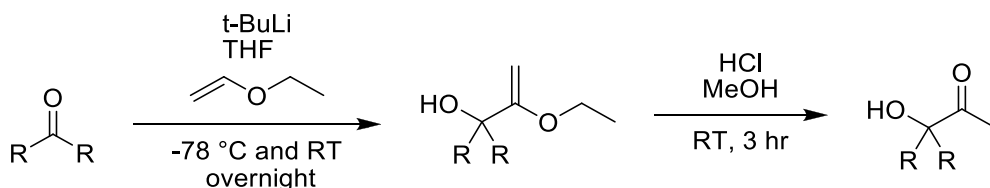
The aldehyde (1 mmol) and **TCF** (230 mg, 1.15 mmol) were dissolved in 10 mL of anhydrous ethanol in a 20 mL microwave vial. 2 drops of piperidine were added. The vial was sealed with a pressure septum and the mixture was irradiated by focused microwave at 100 °C for 15 minutes by controlling the temperature. After cooling, the precipitate was filtered off and washed with ethanol to give the pure desired product.

2.A.ii General Procedure B: Tricyanofuran derivatives



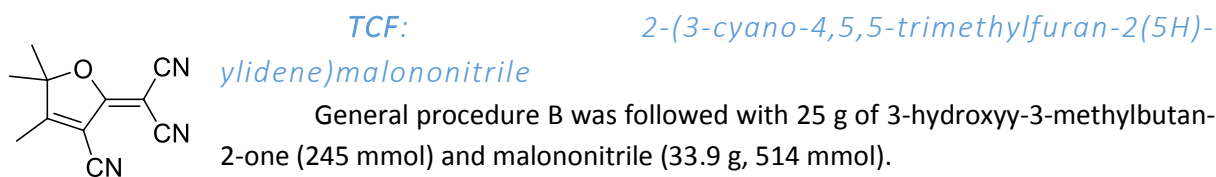
A flask equipped with Soxhlet apparatus containing 4 Å molecular sieves was charged with a solution of hydroxyketone (1 eq) and malononitrile (2.1 eq) in anhydrous ethanol (2 mL /mmol of ketone), A catalytic amount of lithium solid was added and this mixture was refluxed overnight under nitrogen and then allowed to cool to room temperature. The yellow precipitate was filtered and washed with cold ethanol to give the pure desired product.

2.A.iii General Procedure C: α -hydroxyketon



Under inert atmosphere, ^tBuLi (1.6 mol.L⁻¹ in pentane, 35 mL, 56 mmol, 1.8 eq) was added dropwise at -78 °C to a solution of ethyl vinyl ether (5.7 mL, 60 mmol, 2 eq) in 20 mL of anhydrous THF. The orange solution was allowed to warm-up to -10 °C and ketone (30 mmol, 1 eq) was added dropwise as a concentrated solution in THF. The final mixture was stirred overnight at room temperature. After the addition of 50 mL of 1M HCl and 50 mL of methanol, the acidic solution was stirred an additional 3 hours followed by concentration under vacuum. The organic layer was extracted with diethyl ether (3 x 40 mL), washed with 3 x 20 mL of brine, dried over Na₂SO₄ and evaporated. The product was used in the next step without further purification

2.B. Product Characterization



Yield: 62 % (30.2 g), yellow solid.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 2.37 (s, 3 H), 1.59 (s, 6 H).

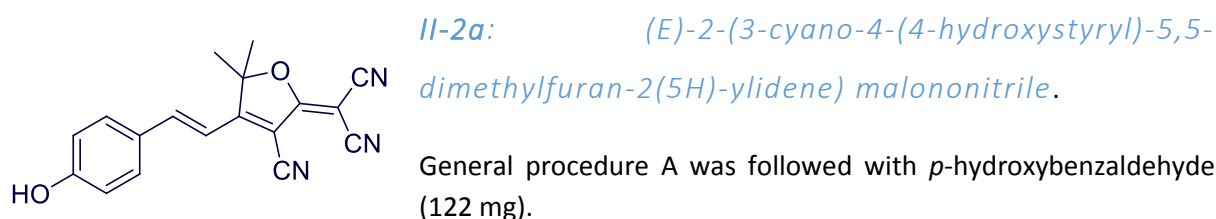
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 186.3, 177.9, 112.8, 112.1, 110.5, 104.2, 101.9, 55.3, 23.8 (2 C), 14.8.

Melting point: 196 °C.

Elemental analysis: calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}$: C 66.32, H 4.55, N 21.09; found: C 66.06, H 4.50, N 20.89.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 198.1 for $[\text{M}-\text{H}]^-$.

IR: (KBr, cm^{-1}): 2232, 2220, 1612, 1590, 1360, 1155.



Yield: 66 % (200 mg), orange solid.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 10.57 (s, 1 H, OH), 7.86 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz), 7.77 (d, 2 H, $J = 8.4$ Hz), 6.98 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz), 6.86 (d, 2 H, $J = 8.4$ Hz), 1.74 (s, 6 H, -CH₃).

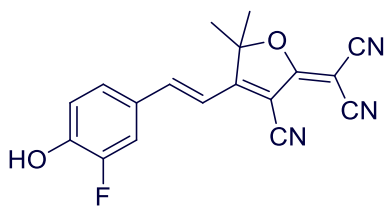
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 177.9, 176.5, 162.9, 148.9, 132.9 (2 C), 126.3, 117.0 (2C), 113.5, 112.7, 112.3, 111.8, 99.6, 97.3, 53.8, 25.9 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2$: C 71.28, H 4.32, N 13.85; found: C 71.92, H 4.46, N 13.88.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 302.0 for $[\text{M}-\text{H}]^-$.

IR: (KBr, cm^{-1}): 3366, 2224, 1554, 1524, 1380, 1281, 1211, 1162.



II-2b: *(E)-2-(3-cyano-4-(3-fluoro-4'-hydroxystyryl))-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene malononitrile*

General procedure A was followed with 3-Fluoro-*p*-hydroxybenzaldehyde (140 mg).

Yield: 39 % (125 mg), brown solid.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 11.02 (s, 1 H, -OH), 7.89 (dd, 1 H, $J = 12.6$ Hz, $J = 1.5$ Hz, arom), 7.85 (d, 1 H, $J = 16.3$ Hz, allyl), 7.58 (dd, 1 H, $J = 8.4$ Hz, $J = 1.5$ Hz, arom), 7.08 (d, 1 H, $J = 16.3$ Hz, allyl), 7.05 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz, arom), 1.77 (s, 6 H, -CH $_3$).

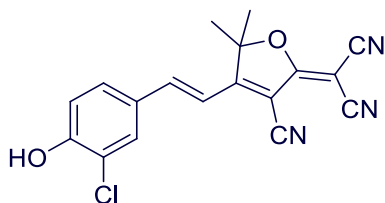
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 177.8, 175.9, 151.5 (d, 1 C, $J_{\text{C-F}} = 240$ Hz), 150.5 (d, 1 C, $J_{\text{C-F}} = 15$ Hz), 147.5, 128.8, 126.8 (d, 1 C, $J_{\text{C-F}} = 7$ Hz), 118.8 (d, 1 C, $J_{\text{C-F}} = 5$ Hz), 117.3 (d, 1 C, $J_{\text{C-F}} = 18$ Hz), 113.7, 113.4, 112.6, 111.7, 99.7, 97.9, 54.2, 25.8 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: calcd for C $_{18}$ H $_{12}$ FN $_3$ O $_2$: C, 67.29; H, 3.76; N, 13.08; found: C 67.28; H 4.10; N 13.00.

Mass: Mass spectrum (ES $^-$, m/z): 320 .0 (100 %), 321.0 (20.6 %) for [M-H] $^-$.

IR: (KBr, cm^{-1}): 3420, 2222, 1563, 1531, 1516, 1300, 1282, 1180, 1165, 1101.



II-2c: *(E)-2-(3-cyano-4-(3-chloro-4'-hydroxystyryl))-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene malononitrile.*

General procedure A was followed with 3-chloro-*p*-hydroxybenzaldehyde (156 mg).

Yield: 45 % (150 mg), orange solid.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 11.28 (s, 1 H, -OH), 8.03 (d, 1 H, $J = 1.5$ Hz), 7.80 (d, 1 H, $J = 16.0$ Hz), 7.70 (dd, 1 H, $J = 8.4$ Hz, $J = 1.5$ Hz), 7.05 (d, 1 H, $J = 16.0$ Hz), 7.03 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz), 1.74 (s, 6 H, -CH $_3$).

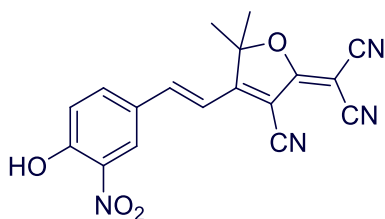
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 177.8, 176.1, 157.7, 147.2, 132.2, 130.8, 127.4, 121.5, 117.7, 113.8, 113.4, 112.6, 111.6, 99.8, 98.4, 54.4, 25.8 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: calcd for C $_{18}$ H $_{12}$ ClN $_3$ O $_2$: C 64.01, H 3.58, N 12.44; found: C 64.18, H 3.69, N 12.11.

Mass: spectrum (ES $^-$, m/z): 336.0 (100%), 337.0 (19 %), 338.0 (30 %) for [M-H] $^-$.

IR: (KBr, cm^{-1}): 2237, 2225, 1556, 1513, 1414, 1385, 1298, 1278.



II-2d: *(E)-2-(3-cyano-4-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene) malononitrile.*

General procedure A was followed with 3-Nitro-*p*-hydroxybenzaldehyde (167 mg).

Yield: 51 % (178 mg), brown solid.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 11.96 (s, 1 H, -OH), 8.50 (d, 1 H, $J = 1.8$ Hz), 8.08 (dd, 1 H, $J = 9.0$ Hz, $J = 1.8$ Hz), 7.86 (d, 1 H, $J = 16.6$ Hz), 7.16 (d, 1 H, $J = 9.0$ Hz), 7.12 (d, 1 H, $J = 16.6$ Hz), 1.76 (s, 6 H, -CH $_3$).

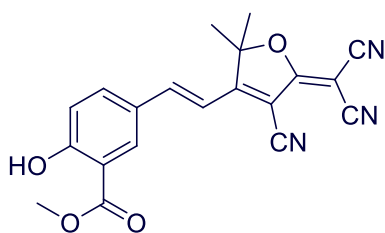
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 177.6, 175.6, 155.9, 146.1, 138.2, 135.2, 128.3, 126.1, 120.6, 115.0, 113.3, 112.5, 111.3, 99.9, 99.6, 54.7, 25.8 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: calcd for C $_{18}$ H $_{12}$ N $_4$ O $_4$: C 62.07, H 3.47, N 16.09; found: C 61.92, H 3.62, N 16.11.

Mass: Mass spectrum (ES $^-$, m/z): 347.0 for [M-H] $^-$.

IR: (KBr, cm^{-1}): 3257, 2233, 1579, 1544, 1531, 1311, 1168.



II-2e: *(E)-methyl-5-(2-(4-cyano-5-(dicyanomethylene)-2,2-dimethyl-2,5-dihydrofuran-3-yl)vinyl)-2-hydroxybenzoate.*

General procedure A was followed with methyl 5-formyl-2-hydroxybenzoate (180 mg).

Yield: 51 % (184 mg), red solid.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 11.12 (s, 1 H, -OH), 8.29 (d, 1 H, $J = 2.3$ Hz), 8.15 (dd, 1 H, $J = 8.4$ Hz, $J = 2.3$ Hz), 7.94 (d, 1 H, $J = 16.5$ Hz), 7.12 (d, 1 H, $J = 16.5$ Hz), 7.11 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz), 3.92 (s, 3 H, -OMe), 1.80 (s, 6 H, -CH $_3$).

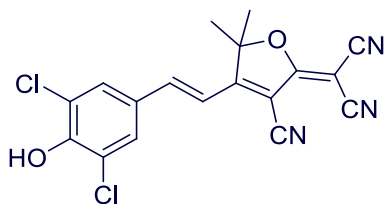
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 177.7, 176.1, 168.4, 163.2, 147.2, 135.1, 134.5, 126.6, 119.4, 114.1, 115.6, 113.3, 112.5, 111.5, 99.9, 99.1, 54.5, 53.2, 25.8 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: calcd for C $_{20}$ H $_{15}$ N $_3$ O $_4$: C 66.48, H 4.18, N 11.63; found: C 65.95, H 4.23, N 11.71.

Mass: Mass spectrum (ES $^-$, m/z): 360.1 for [M-H] $^-$.

IR: (KBr, cm^{-1}): 3448, 3235, 2231, 2215, 1685, 1575, 1529, 1319, 1216.



II-2f: *(E)-2-(3-cyano-4-(3,5-dichloro-4-hydroxystyryl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene) malononitrile.*

General procedure A was followed with 3,5-dichloro-*p*-hydroxybenzaldehyde (190 mg).

Yield: 60 % (223 mg), orange solid.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 8.08 (s, 2 H), 7.76 (d, 1 H, $J = 16.6$ Hz), 7.21 (d, 1 H, $J = 16.6$ Hz), 1.77 (s, 6 H, $-\text{CH}_3$).

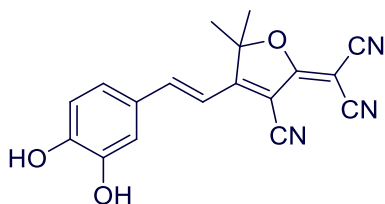
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 177.7, 175.5, 145.5, 130.5 (2 C), 127.9, 123.4 (2 C), 115.4, 113.3, 112.8, 112.5, 111.3, 101.9, 99.8, 54.8, 25.7 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_2$: C 58.08, H 2.98, N 11.29; found: C 57.92; H 3.45; N 11.22.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 370.0 (100 %), 371.0 (19 %), 372.0 (67 %) for $[\text{M}-\text{H}]^-$.

IR: (KBr, cm^{-1}): 3364, 2233, 2212, 1573, 1561, 1525, 1411, 1286.



II-2g: *(E)-2-(3-cyano-4-(3,4-dihydroxystyryl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene) malononitrile.*

General procedure A was followed with 3,4-dihydroxybenzaldehyde (138 mg).

Yield: 59 % (188 mg), dark red solid.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 10.26 (s, 1 H), 9.46 (s, 1 H), 7.83 (d, 1 H, $J = 16.2$ Hz), 7.31 (d, 1 H, $J = 2.0$ Hz), 7.28 (dd, 1 H, $J = 8.0$ Hz, $J = 2.0$ Hz), 6.90 (d, 1 H, $J = 16.2$ Hz), 6.86 (d, 1 H, $J = 8.0$ Hz), 1.77 (s, 6 H).

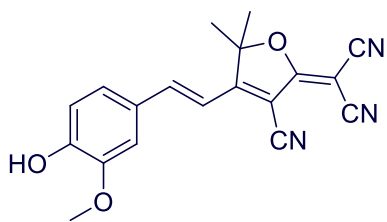
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 177.8, 176.3, 152.1, 149.3, 146.7, 126.8, 125.4, 116.8, 115.6, 113.6, 112.7, 112.1, 111.9, 99.5, 97.0, 53.5, 25.9 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$: C 67.71, H 4.10, N 13.16; found: C 67.60, H 4.11, N 13.15.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 318.0 $[\text{M}+\text{H}]^-$.

IR: (KBr, cm^{-1}): 3444, 3324, 2242, 2224, 1572, 1519, 1444, 1287, 1192, 1149.



II-2h: *(E)-2-(3-cyano-4-(4-hydroxy-3-methoxystyryl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene) malononitrile*

General procedure A was followed with 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (152 mg).

Yield: 55 % (183 mg), brown solid.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 10.30 (s, 1 H), 7.88 (d, 1 H, $J = 16.2$ Hz), 7.50 (s, 1 H), 7.42 (d, 1 H, $J = 8.2$ Hz), 7.04 (d, 1 H, $J = 16.2$ Hz), 6.90 (d, 1 H, $J = 8.2$ Hz), 3.87 (s, 1 H), 1.79 (s, 6 H, - CH_3).

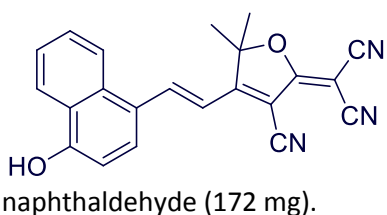
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 177.9, 176.4, 152.7, 149.4, 148.8, 126.8, 126.1, 116.7, 113.5, 113.3, 112.7, 112.5, 111.8, 99.6, 96.9, 56.4, 53.7, 25.9 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3$: C 68.46, H 4.54, N 12.61; found: C 68.81, H 4.66, N 12.65.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 332.1 for $[\text{M}-\text{H}]^-$.

IR: (KBr, cm^{-1}): 3405, 2224, 1568, 1506, 1437, 1301, 1287.



II-2i: *(E)-2-(3-cyano-4-(2-(4-hydroxynaphthalen-1-yl)vinyl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene) malononitrile.*

General procedure A was followed with 4-hydroxy-1-naphthaldehyde (172 mg).

Yield: 73 % (258 mg), violet solid.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 11.56 (s, 1 H, -OH), 8.84 (d, 1 H, $J = 15.8$ Hz), 8.34 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz), 8.26 (d, 1 H, $J = 7.8$ Hz), 8.22 (d, 1 H, $J = 7.8$ Hz), 7.72 (t, 1 H, $J = 7.8$ Hz), 7.58 (t, 1 H, $J = 7.8$ Hz), 7.22 (d, 1 H, $J = 15.8$ Hz), 7.07 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz), 1.80 (s, 6 H, - CH_3).

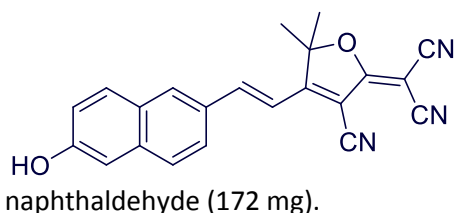
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 178.1, 176.3, 160.3, 144.0, 133.8, 130.5, 129.4, 126.2, 125.1, 123.8, 122.8, 122.0, 113.7, 113.3, 112.9, 112.8, 110.2, 99.6, 95.3, 53.4, 25.7 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$: C 74.68, H 4.28, N 11.89; found: C 73.62, H 4.41, N 11.97.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 352.1 for $[\text{M}-\text{H}]^-$.

IR: (KBr, cm^{-1}): 3280, 2228, 22209, 1540, 1510, 1377, 1354, 1262, 1218, 1189.



II-2j: *(E)-2-(3-cyano-4-(2-(6-hydroxynaphthalen-2-yl)vinyl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene) malononitrile.*

General procedure A was followed with 6-hydroxy-2-naphthaldehyde (172 mg).

Yield: 87 % (307 mg), brown solid.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 10.27 (s, 1 H, -OH), 8.27 (s, 1 H), 8.05 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz), 7.92 (d, 1 H, $J = 8.6$ Hz), 7.86 (d, 1 H, $J = 8.7$ Hz), 7.75 (d, 1 H, $J = 8.6$ Hz), 7.21 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz), 7.15 (d, 1 H, $J = 2.5$ Hz), 7.13 (dd, 1 H, $J = 8.7$ Hz, $J = 2.5$ Hz), 1.78 (s, 6 H, - CH_3).

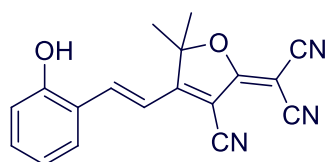
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 177.8, 176.0, 158.8, 148.8, 137.4, 133.7, 131.8, 129.6, 127.9, 127.8, 124.6, 120.3, 114.4, 113.4, 112.6, 111.8, 109.9, 99.9, 98.3, 54.2, 25.7 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$: C 74.68, H 4.28, N 11.89; found: C 73.92, H 4.30, N 11.73.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 352.1 for $[\text{M}-\text{H}]^-$.

IR: (KBr, cm^{-1}): 3357, 2225, 1560, 1525, 1478, 1375, 1294, 1160.



o-pH-TCF: *(E)-2-(3-cyano-4-(2-hydroxystyryl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene) malononitrile*

General procedure A was followed with o-hydroxybenzaldehyde (122 mg).

Yield: 86 % (266 mg), orange solid.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 10.57 (s, 1 H, -OH), 8.17 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz), 7.84 (d, 1 H, $J = 7.8$ Hz), 7.42 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz), 7.37 (t, 1 H, $J = 7.8$ Hz), 6.95 (d, 1 H, $J = 7.8$ Hz), 6.92 (t, 1 H, $J = 7.8$ Hz), 1.77 (s, 6 H, - CH_3).

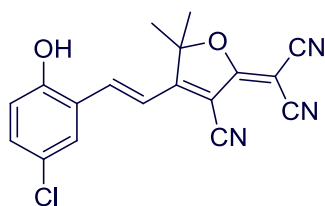
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz). 177.9, 176.8, 159.0, 144.6, 134.6, 131.2, 121.9, 120.4, 117.1, 115.7, 113.4, 112.6, 111.8, 99.7, 98.0, 54.2, 25.7 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2$: C, 71.28; H, 4.32; N, 13.85. Found: C, 70.40; H, 4.32; N, 13.85.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 302.0 for $[\text{M}-\text{H}]^-$.

IR: (KBr, cm^{-1}): 3250, 3002, 2236, 2220, 1566, 1535, 1376, 1104, 756.



5-Cl-o-pH-TCF: *(E)-2-(3-cyano-4-(5-chloro-2-hydroxystyryl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene) malononitrile*

General procedure A was followed with 6-chloro-2-hydroxybenzaldehyde (156 mg).

Yield: 64 % (217 mg), dark red solid

NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 11.06 (s, 1 H, -OH), 8.07 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz), 7.96 (d, 1 H, $J = 2.6$ Hz), 7.45 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz), 7.34 (dd, 1 H, $J = 8.6$ Hz $J = 2.6$ Hz), 6.92 (d, 1 H, $J = 8.6$ Hz), 1.72 (s, 6 H, - CH_3).

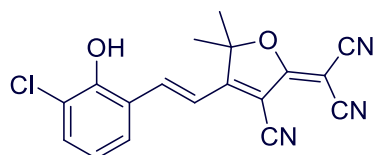
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz). 177.9, 176.4, 157.6, 142.6, 133.6, 129.9, 124.1, 123.3, 118.8, 117.0, 113.3, 112.4, 111.7, 99.9, 98.8, 54.7, 25.5 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{ClN}_3\text{O}_2$: C, 64.01; H, 3.58; N, 12.44; O, 9.47. Found: C, 64.20; H, 3.66; N, 12.54; O, 9.53.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 336.0 (100 %), 337.0 (20 %), 338.0 (32 %) for $[\text{M}-\text{H}]^-$.

IR: (KBr, cm^{-1}): 3353, 2228, 1584, 1563, 1527, 1105, 818.



3-Cl-o-pH-TCF: *(E)-2-(3-cyano-4-(3-chloro-2-hydroxystyryl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene) malononitrile*

General procedure A was followed with 3-chloro-2-hydroxybenzaldehyde (156 mg).

Yield: 68 % (225 mg), dark red solid.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 10.55 (s, 1 H, -OH), 8.21 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz), 7.85 (d, 2 H, $J = 8.0$ Hz), 7.52 (d, 1 H, $J = 8.0$ Hz), 7.33 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz), 6.96 (t, 1 H, $J = 8.0$ Hz), 1.73 (s, 6 H, - CH_3).

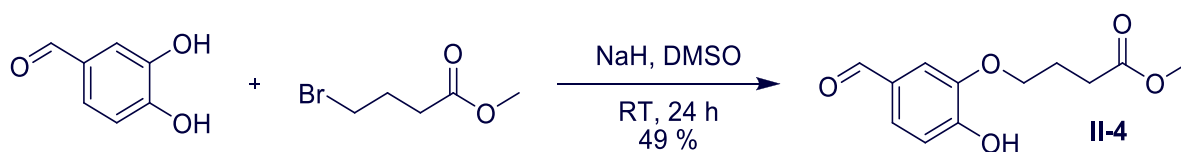
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz). 177.9, 176.1, 153.5, 142.7, 133.9, 128.9, 124.9, 122.6, 121.6, 116.9, 113.3, 112.4, 111.7, 100.0, 99.1, 54.9, 25.5 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{ClN}_3\text{O}_2$: C, 64.01; H, 3.58; N, 12.44; O, 9.47. Found: C, 64.12; H, 3.69; N, 12.59; O, 8.77.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 336.0 (100 %), 337.0 (26 %), 338.0 (52 %) for $[\text{M}-\text{H}]^-$.

IR: (KBr, cm^{-1}): 3365, 2227, 1556, 1531, 1263, 1242.



II-4: methyl 4-(5-formyl-2-hydroxyphenoxy)butanoate

At 0 °C, NaH (880 mg, 22 mmol, 2.2 eq) was dissolved in 10 mL DMSO and dihydroxybenzaldehyde (1.38 g, 10 mmol) in 10 mL of DMSO was added dropwise. The solution was stirred at room temperature for 2 hours and then methyl 4-bromobutyrate (1.3 mL, 10 mmol, 1 eq) was added dropwise. After 24 h of reaction, the solution was quenched with 40 mL of HCl 1M, extracted with 3 x 100 mL of EtOAc, washed with 2 x 50 mL brine and dried over Na₂SO₄. After evaporation of the solvent, the crude oil was purified by column chromatography on silica gel with dichloromethane as eluant. The product **II-4** was obtained as a white-pink solid.

Yield: 49 % (1.2 g), white-pink solid.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 10.24 (s, 1 H, -OH), 9.74 (s, 1 H), 7.40 (d, 1 H, *J* = 7.8 Hz), 7.36 (s, 1 H), 6.95 (d, 1 H, *J* = 7.8 Hz), 4.04 (t, 2 H, *J* = 5.8 Hz), 3.61 (s, 3 H), 2.54 (t, 2 H, *J* = 5.8 Hz), 1.99 (quint, 2 H, *J* = 5.8 Hz).

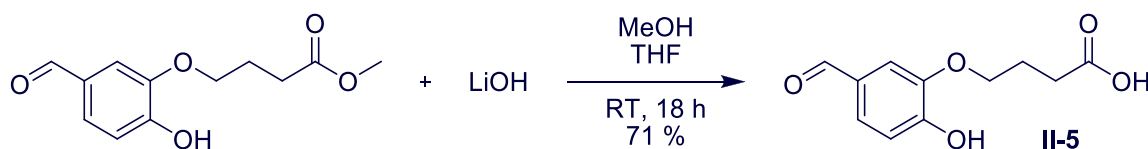
¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz). 191.4, 173.7, 154.2, 147.9, 129.0, 126.6, 116.2, 112.5, 67.8, 51.9, 30.4, 24.7.

Melting point: 74 °C.

Elemental analysis: Calcd for C₁₂H₁₄O₅: C 60.50, H 5.92 Found: C 60.47, H 5.68.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, *m/z*): 237.0 (100 %), 236.0 (19 %), for [M-H]⁻.

IR: (KBr, cm⁻¹): 3405, 2950, 2716, 1727, 1684, 1592, 1508, 1436, 1267, 1159.



II-5: 4-(5-formyl-2-hydroxyphenoxy)butanoic acid

Compound **II-4** (967 mg, 4 mmol) was dissolved in 80 mL of THF. LiOH (2.28 g, 90 mmol) in 60 mL of methanol was then added and the solution was stirred at room temperature overnight. The mixture was then evaporated to give a white powder which was dissolved in water and extracted with 2 x 50 mL of CH₂Cl₂. The organic phases were washed with 2 x 40 mL brine, dried over Na₂SO₄ and evaporated to give a white solid which was recrystallized from EtOAc.

Yield: 71 % (635 mg), white solid.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 12.13 (s, 1 H), 10.12 (s, 1 H), 9.76 (s, 1 H), 7.41 (dd, 1 H, $J = 7.9$ Hz, $J = 1.4$ Hz), 7.37 (d, 1 H, $J = 1.4$ Hz), 6.97 (d, 1 H, 7.9 Hz), 4.05 (t, 1 H, $J = 6.2$ Hz), 2.45 (t, 2 H, $J = 6.2$ Hz), 1.97 (quint, 2 H, $J = 6.2$ Hz).

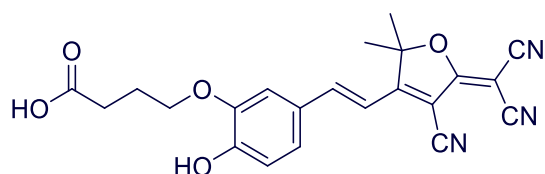
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz): 191.6, 174.8, 153.7, 147.8, 129.3, 126.4, 116.1, 112.6, 68.0, 30.6, 24.7.

Melting point: 139 °C.

Elemental analysis: Calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_5$: C 58.93, H 5.39, Found: C 58.68, H 5.54.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 224.1 (100 %), 223.1 (22 %), for $[\text{M}-\text{H}]^-$.

IR: (KBr, cm^{-1}): 2944, 2885, 1697, 1663, 1587, 1509, 1439, 1269, 1156, 1122.



II-6 : *(E)-4-(5-(2-(4-cyano-5-(dicyanomethylene)-2,2-dimethyl-2,5-dihydrofuran-3-yl)vinyl)-2-hydroxyphenoxy)butanoic acid*

General procedure A was followed with **II-5**

(224 mg).

Yield: 49 % (183 mg), violet solid

NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 12.12 (s, 1 H), 10.17 (s, 1 H), 7.88 (d, 1 H, $J = 16.2$ Hz), 7.49 (d, 1 H, $J = 1.4$ Hz), 7.41 (dd, 1 H, $J = 8.4$ Hz, $J = 1.4$ Hz), 7.02 (d, 1 H, $J = 16.2$ Hz), 6.92 (d, 1 H, 8.4 Hz), 4.06 (t, 1 H, $J = 6.2$ Hz), 2.46 (t, 2 H, $J = 6.2$ Hz), 1.98 (quint, 2 H, $J = 6.2$ Hz).

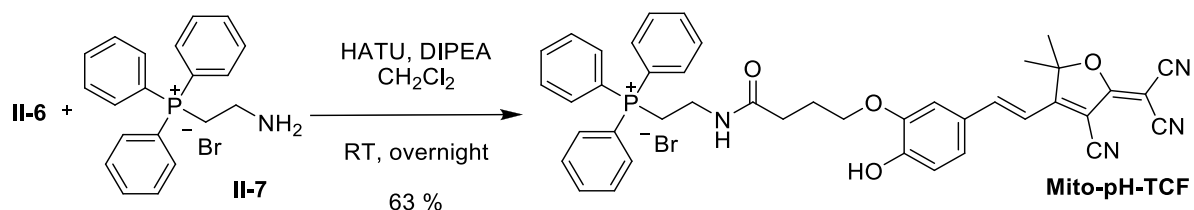
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz). 177.9, 176.4, 174.8, 152.8, 149.3, 148.0, 126.8, 125.9, 116.8, 114.6, 113.6, 112.7, 112.5, 111.8, 99.6, 96.9, 68.2, 53.7, 30.6, 25.9 (2 C), 24.8.

Melting point: 216 °C.

Elemental analysis: Calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5$: C 65.18, H 4.72, N 10.37. Found: C 65.39, H 4.84, N 10.12.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 405.1 (100 %), for $[\text{M}-\text{H}]^-$.

IR: (KBr, cm^{-1}): 3348, 2231, 1759, 1720, 1576, 1534, 1504, 1440, 1285, 1269, 1168.



Mito-pH-TCF : *(E)*-2-(4-(5-(2-(4-cyano-5-(dicyanomethylene)-2,2-dimethyl-2,5-dihydrofuran-3-yl)vinyl)-2-hydroxyphenoxy)butanamido)ethyl)triphenylphosphonium bromide

Compound **II-6** (202 mg, 0.5 mmol) and HATU (190 mg, 0.55 mmol, 1.1 eq) were dissolved in 40 mL of dry CH_2Cl_2 . After 20 minutes at room temperature and under inert atmosphere, triphenylphosphonium (211 mg, 1.1 eq) was added to the solution. 20 min later, DIPEA (190 μL , 1.1 mmol, 2.2 eq) was also added. The solution was stirred at room temperature overnight. The solvent were evaporated and the blue/red oil was dissolved in a minimum of NaOH 1M. The solution was acidified with HCL 1 M. After 2 days, the black precipitate was filtered off.

Yield: 49 % (270 mg), black solid.

NMR ^1H NMR (δ/ppm in DMSO-d_6 , 500 MHz): 10.23 (s, 1 H), 8.26 (t, 1 H, $J = 6.0$ Hz, -NH), 7.82-7.90 (m, 10 H), 7.74-7.78 (m, 6 H), 7.48 (s, 1 H), 7.43 (d, 1 H, $J = 8.5$ Hz), 7.02 (d, 1 H, $J = 16$ Hz), 6.92 (d, 1 H, $J = 8.5$ Hz), 4.03 (t, 2 H, $J = 6.8$ Hz), 3.72 (quint, 2 H, $J = 6.0$ Hz), 3.37 (m, 2 H), 2.21 (t, 2 H, $J = 6.8$ Hz), 1.92 (quint, 2 H, $J = 6.8$ Hz), 1.77 (s, 1 H).

^{13}C NMR (δ/ppm in DMSO-d_6 , 125 MHz). 177.9, 176.3, 172.8, 152.9, 149.3, 148.0, 135.5 (3 C), 134.3 (d, 6 C, $J = 10.3$ Hz), 130.8 (d, 6 C, $J = 12.5$ Hz), 126.8, 126.2, 118.7 (d, 3 C, $J = 82.8$ Hz), 117.7, 116.8, 114.4, 113.5, 112.7, 112.5, 111.8, 99.5, 96.9, 68.4, 33.3, 31.9, 25.9 (6 C), 24.9, 21.5 (d, 1 C, $J = 54$ Hz).

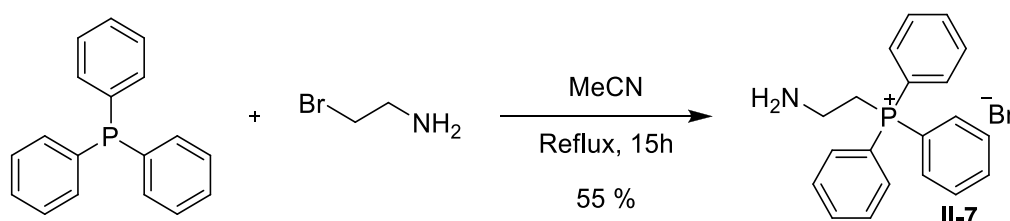
^{31}P NMR (200 MHz, δ/ppm in CDCl_3) 21.47.

Melting point: = 216 $^\circ\text{C}$.

Elemental analysis: Calcd for $\text{C}_{42}\text{H}_{38}\text{BrN}_4\text{O}_4\text{P}$: C 65.20, H 4.95, N 7.24. Found: C 65.54, H 5.12, N 7.29.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 693.2 (100 %), 694.2 (44 %), 695.2 (12 %) for $[\text{M}]^+$.

IR: (KBr, cm^{-1}): 3058, 2225, 1667, 1561, 1526, 1507, 1279, 1171, 1108, 836.



II-7: (2-aminoethyl)triphenylphosphonium bromide

Bromoethylamine hydrobromide (3.9 g, 19 mmol) and triphenylphosphine (5 g, 19 mmol) were dissolved in 25 mL of acetonitrile and stirred at reflux for 15 h. The formed precipitate was dissolved in 100 mL of water, basified with 150 mL of K₂CO₃ saturated solution and extracted with 3 x 100 mL of chloroform. The organic phase was dried over Na₂SO₄, and reduced to 100 mL. The crude was triturated in 150 mL of petroleum ether and the precipitate was filtered to give the desired product **II-7** as a white powder

Yield: 57 % (4.2 g) white solid.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in CDCl₃, 500 MHz): 7.87 (ddd, 6 H, *J* = 1.0 Hz, *J* = 8.6 Hz, *J* = 13.0 Hz), 7.80 (dt, 3 H, *J* = 1.0 Hz, *J* = 8.6 Hz), 7.70 (dt, 6 H, *J* = 3.3 Hz, *J* = 8.6 Hz), 4.10 (dt, 2 H, *J* = 12.55 Hz, *J* = 6.85 Hz), 3.21 (quint, 2 H, 6.85 Hz), 2.50 (bs, 2 H, -NH₂).

¹³C NMR (125 MHz, δ/ppm in CDCl₃) 134.9 (d, 3 C, *J* = 3.2 Hz), 133.9 (d, 6 C, *J* = 9.6 Hz), 130.5 (d, 6 C, *J* = 12.8 Hz), 119.3 (d, 3 C, *J* = 85.7 Hz), 36.5, 26.0 (d, 1 C, *J* = 50.2 Hz).

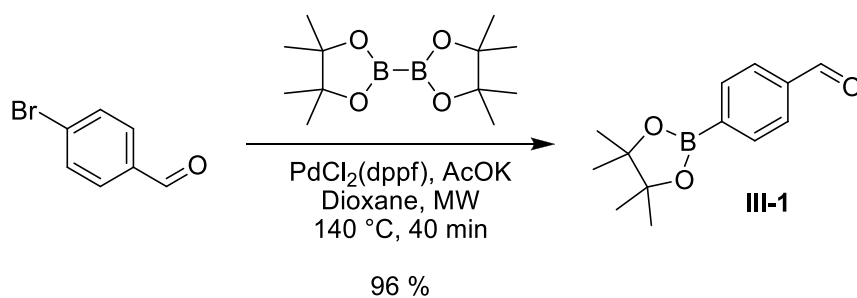
³¹P NMR (200 MHz, δ/ppm in CDCl₃) 23.7.

Melting point: 210 °C.

Elemental analysis: Calcd for C₂₀H₂₁BrNP: C 62.19, H 5.48, N 3.63. Found: C 62.24, H 5.36, N 3.98.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, *m/z*): 306.1 (100 %) for [M]⁺.

IR: (KBr, cm⁻¹): 3284, 1602, 1586, 1484, 1437, 1111, 994.



III-1: 4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzaldehyde

Sodium acetate (820 mg, 10 mmol) was dried under vacuum and

added to a solution of bromobenzaldehyde (185 mg, 1 mmol) and bispinacolatodiboron (280 mg, 1.1 mmol) in 15 mL of dry dioxane. A catalytic amount (5 mg) of PdCl₂(dppf) was added and the mixture was stirred for 5 min at room temperature under Nitrogen flux and then stirred under micro-wave irradiation at 140 °C for 40 min. After cooling to room temperature, the mixture was filtered over Celite[®] and washed with 100 mL of Ethyl Acetate. After evaporation of the solvent, the crude brown oil was purified with column chromatography on silica gel (eluent pentane/diethyl ether: 2/1) to give the desired product.

Yield: 96 % (200 mg) colorless crystals.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in CDCl_3 , 500 MHz): 10.10 (s, 1 H), 8.01 (d, 2 H, $J = 8.1$ Hz), 7.91 (d, 2 H, $J = 8.1$ Hz), 1.41 (s, 12 H).

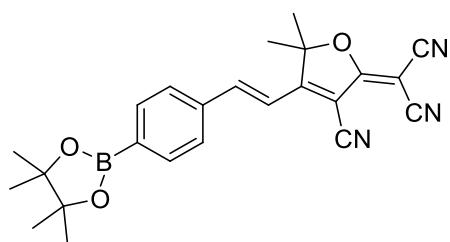
^{13}C NMR (125 MHz, δ /ppm in CDCl_3): 192.6, 138.1 (br, 2 C), 135.2 (2 C), 128.7 (2 C), 84.3, 24.9.

Melting point: 58 °C.

Elemental analysis: Calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{BO}_3$: C 67.28, H 7.38, Found: C 66.98, H 7.52.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 231.1 (100 %), 232.2 (17 %) for $[\text{M}-\text{H}]^-$.

IR: (KBr, cm^{-1}): 2977, 2926, 1700, 1508, 1357, 1331, 1139, 1086, 646.



P-TCF: (E)-2-(3-cyano-5,5-dimethyl-4-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)styryl)furan-2(5H)-ylidene)malononitrile

General procedure A was followed with **III-1** (232 mg).

Yield: 40 % (163 mg), brown/orange solid.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in $\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz): 7.90 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz), 7.87 (d, 2 H, $J = 7.8$ Hz), 7.75 (d, 2 H, $J = 7.8$ Hz), 7.25 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz), 1.76 (s, 6 H), 1.27 (s, 12 H).

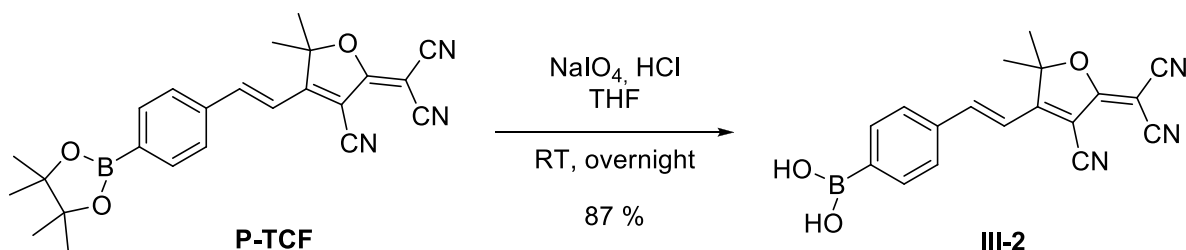
^{13}C NMR (δ /ppm in $\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz) 177.6, 175.4, 147.1, 137.5, 135.6 (2 C), 129.1 (2 C), 117.0, 113.2, 112.3 (2 C), 111.4, 100.8, 100.2, 84.6 (2 C), 55.4, 25.6 (2 C), 25.3 (4 C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{BN}_3\text{O}_3$: C 69.75, H 5.85, N 10.17. Found: C 69.66, H 5.83, N 10.00.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 411.3 (19 %), 312.2 (100 %), 413.2 (28 %) for $[\text{M}-\text{H}]^-$.

IR: (KBr, cm^{-1}): 2978, 2231, 1584, 1542, 1356, 1326, 1086, 655.



III-2: (E)-4-(2-(4-cyano-5-(dicyanomethylene)-2,2-dimethyl-2,5-dihydrofuran-3-yl)vinyl)phenylboronic acid

P-TCF (102 mg, 0.25 mmol) was dissolved in a mixture of 1 mL of water and 4 mL of THF. NaIO_4 (161 mg, 0.75 mmol, 3 eq) was added and the solution was stirred at room temperature for 30 min.

After the addition of 1M HCl (200 μ L) the mixture was stirred an additional 18 hours before quenching with 15 mL of water. The product was extracted with 2 x 15 mL of EtOAc, washed with brine and dried over Na_2SO_4 . Evaporation of the solvent gave the pure product without further purification.

Yield: 87 % (74 mg), orange solid.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 8.27 (s, 2 H), 7.95 (d, 1 H, J = 16.4 Hz), 7.92 (d, 2 H, J = 8.1 Hz), 7.87 (d, 2 H, J = 8.1 Hz), 7.28 (d, 1 H, J = 16.4 Hz), 1.81 (s, 6 H).

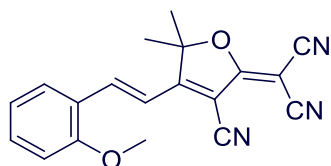
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 177.1, 175.1, 147.2, 135.6 (2 C), 134.7, 128.2 (2 C), 115.7, 112.6, 111.8 (2 C), 110.8, 101.7, 99.6, 99.5, 54.6, 25.0 (2 C).

Melting point: > 260 $^\circ\text{C}$.

Elemental analysis: Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{BN}_3\text{O}_3$: C 65.29, H 4.26, N 12.69. Found: C 65.56, H 4.13; N 12.37.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 330.2 (100 %), 331.2 (22 %) for $[\text{M}-\text{H}]^-$.

IR: (KBr, cm^{-1}): 3343, 2234, 1578, 1556, 1329, 656, 627.



o-MeO-TCF: (E)-2-(3-cyano-4-(2-methoxystyryl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene)malono-nitrile.

General procedure A was followed with 2-methoxybenzaldehyde (136 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH_2Cl_2 to CH_2Cl_2 + 2 % ethanol as eluent to get rid of a slightly blue by-product.

Yield: 45 % (144 mg), orange solid.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 8.22 (d, 1 H, J = 16.4 Hz), 7.95 (d, 1 H, J = 8.0 Hz), 7.55 (t, 1 H, J = 8.0 Hz), 7.33 (d, 1 H, J = 16.4 Hz), 7.17 (d, 1 H, J = 8.0 Hz), 7.08 (t, 1 H, J = 8.0 Hz), 3.92 (s, 3 H), 1.76 (s, 6 H, $-\text{CH}_3$).

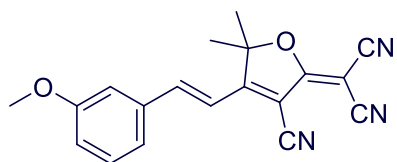
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 177.9, 176.4, 159.5, 143.0, 134.8, 130.6, 123.3, 121.6, 116.3, 113.3, 112.8, 112.5, 111.8, 99.9, 98.6, 56.7, 54.7, 25.5 (2 C).

Melting point: > 260 $^\circ\text{C}$.

Elemental analysis: calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$: C 71.91, H 4.76, N 13.24; found: C 72.24, H 4.77, N 13.53.

Mass: Mass spectrum (ES^+ , m/z): 318.0 (100 %), 378.9 (29.2 %) for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 340.0 (26.8 %) for $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

IR: (cm^{-1}): 3001, 2934, 2834, 2223, 2197, 1556, 1527, 1483, 1375, 1245, 757.



m-MeO-TCF: (E)-2-(3-cyano-4-(3-methoxystyryl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene)malono-nitrile

General procedure A was followed with 3-methoxybenzaldehyde (136 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂ + 2 % ethanol as eluent to get rid of a slightly blue by-product.

Yield: 60 % (188 mg), orange solid.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 7.90 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.48 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz), 7.47 (s, 1 H), 7.43 (t, 1 H, *J* = 8.4 Hz), 7.23 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.11 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz), 3.84 (s, 3 H), 1.80 (s, 6 H, -CH₃).

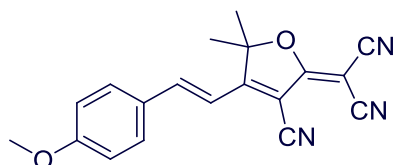
¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz) 177.7, 175.7, 160.3, 147.7, 136.3, 130.9, 122.3, 118.9, 116.3, 114.7, 113.2, 112.4, 111.4, 100.3, 100.1, 56.0, 55.2, 25.6 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: calcd for C₁₉H₁₅N₃O₂: C 71.91, H 4.76, N 13.24; found: C 71.56, H 4.70, N 13.15.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, *m/z*): 318.0 (100 %), 378.9 (24.7 %) for [M+H]⁺, 340.0 (19.7 %) for [M+Na]⁺.

IR: (cm⁻¹): 2986, 2934, 2228, 1577, 1537, 1272, 829.



p-MeO-TCF: (E)-2-(3-cyano-4-(4-methoxystyryl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene)malono-nitrile

General procedure A was followed with 4-methoxybenzaldehyde (136 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂ + 2 % ethanol as eluent to get rid of a slightly blue by-product.

Yield: 54% (172 mg), orange solid.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 7.92 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.91 (d, 2 H, *J* = 8.4 Hz), 7.10 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.09 (d, 2 H, *J* = 8.4 Hz), 3.86 (s, 3 H), 1.79 (s, 6 H).

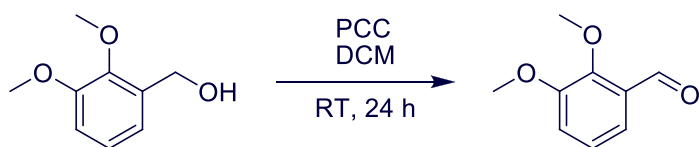
¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz) 177.8, 176.3, 163.6, 148.3, 132.5 (2 C), 127.7, 115.5 (2 C), 113.4, 112.6, 111.7, 99.8, 98.1, 56.3, 54.2, 25.8 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: calcd for C₁₉H₁₅N₃O₂: C 71.91, H 4.76, N 13.24; found: C 71.85, H 4.68, N 13.31.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, *m/z*): 318.0 (100 %), 378.9 (26.4 %) for [M+H]⁺, 340.0 (28.2 %) for [M+Na]⁺.

IR: (cm⁻¹): 2986, 2960, 2897, 2212, 1580, 1563, 1249, 1165, 832.



IV-1: *2,3-dimethoxybenzaldehyde*

(2,3-dimethoxyphenyl)methanol (2 g, 12 mmol) in 8 mL of CH₂Cl₂ was added to a solution of PCC (3.7 g, 1.5 eq) at room temperature. The solution was vigorously stirred during 24 h and then filtered through a celite pad which was washed with 100 mL of dichloromethane. After evaporation of the solvent the crude product was dissolved in EtOAc, washed with 2 x 15 mL NaCl 1 M, 10 mL of HCl 1 M, 2 x 10 mL of saturated NaHCO₃ saturated solution and finally with 2 x 10 mL of brine. After drying over Na₂SO₄ and evaporation, the product was obtained as a slightly yellow solid.

Yield: 82 % (1.61 g), yellow solid.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in CDCl₃, 500 MHz): 10.46 (s, 1 H, OH), 7.45 (dd, 1 H, *J* = 7.0 Hz, *J* = 2.5 Hz), 7.18 (dd, 1 H, *J* = 7.0 Hz, *J* = 2.5 Hz), 7.16 (t, 1 H, *J* = 7.0 Hz), 4.02 (s, 3 H), 3.94 (s, 3 H).

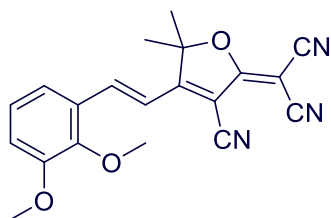
¹³C NMR (125 MHz, δ/ppm in CDCl₃): 190.3, 153.2, 152.9, 129.9, 124.3, 119.3, 118.2, 62.5, 56.2.

Melting point: 51 °C.

Elemental analysis: calcd for C₉H₁₀O₃: C 65.05, H 6.07; found: C 65.36, H 6.18.

Mass: Mass spectrum (ES, *m/z*): 189.1 for [M+Na]⁺.

IR: (cm⁻¹): 2938, 2873, 2834, 1684, 1583, 1478, 1262, 1242, 1220, 996.



2,3-diMeO-TCF: *(E)-2-(3-cyano-4-(2,3-dimethoxystyryl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene)malono-nitrile*

General procedure A was followed with **IV-1** (166 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂ + 2 % ethanol as eluent to get rid of a slightly blue by-product.

Yield: 62 % (217 mg), yellow solid.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 8.28 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.60 (d, 1 H, *J* = 7.4 Hz), 7.27 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.24 (d, 1 H, *J* = 7.4 Hz), 7.21 (t, 1 H, *J* = 7.4 Hz), 3.84 (s, 3 H), 3.81 (s, 3 H), 1.73 (s, 6 H, -CH₃).

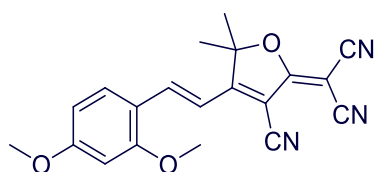
¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz) 178.0, 176.1, 153.4, 149.3, 142.0, 128.4, 125.2, 120.1, 117.2, 116.8, 113.2, 112.4, 112.0, 100.0, 98.7, 61.8, 56.5, 55.0, 25.2 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: calcd for C₂₀H₁₇N₃O₃: C 69.15, H 4.93, N 12.10; found: C 69.37, H 4.91, N 12.12.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, *m/z*): 346.0 (100 %), 347.1 (24.5 %) for [M-H]⁻.

IR: (cm⁻¹): 2981, 2970, 2902, 2225, 1567, 1536, 1272, 1105, 990.



2,4-diMeO-TCF: *(E)-2-(3-cyano-4-(2,4-dimethoxystyryl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene)malo-nitrile*

General procedure A was followed with 2,4-dimethoxybenzaldehyde (166 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂ + 2 % ethanol as eluent to get rid of a slightly

blue by-product.

Yield: 53 % (180 mg), red brownish solid.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 8.18 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.93 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz), 7.21 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 6.70 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz), 6.69 (s, 1 H), 3.93 (s, 3 H), 3.89 (s, 3 H), 1.74 (s, 6 H, -CH₃).

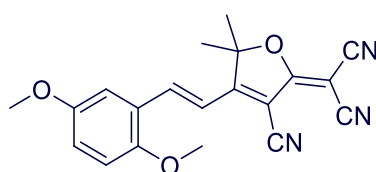
¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz): 178.0, 177.0, 165.7, 161.9, 143.9, 132.9, 116.7, 113.6, 113.4, 112.7, 112.1, 108.1, 99.4, 99.0, 96.1, 56.9, 56.5, 53.5, 25.8 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: calcd for C₂₀H₁₇N₃O₃: C 69.15, H 4.93, N 12.10; found: C 68.84, H 4.89, N 11.81.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, *m/z*): 346.1 (100 %), 347.0 (29.9 %) for [M-H].

IR: (cm⁻¹): 3023, 2944, 2850, 2224, 1611, 1516, 1427, 1375, 1256, 1206.



2,5-diMeO-TCF: *(E)-2-(3-cyano-4-(2,5-dimethoxystyryl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene)malo-nitrile*

General procedure A was followed with 2,5-dimethoxybenzaldehyde (166 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂ + 2 % ethanol as

eluent to get rid of a slightly blue by-product.

Yield: 79 % (275 mg), brown/red solid.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 8.22 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.52 (d, 1 H, *J* = 4.2 Hz), 7.35 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.14 (dd, 1 H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 4.2 Hz), 7.11 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz), 3.86 (s, 3 H), 3.79 (s, 3 H), 1.76 (s, 6 H, -CH₃).

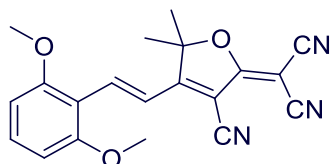
¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz) 178.0, 176.4, 154.2, 154.0, 142.9, 123.8, 120.9, 116.6, 114.4, 114.0, 113.3, 112.5, 111.8, 99.9, 98.5, 57.0, 56.4, 54.7, 25.5 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: calcd for C₂₀H₁₇N₃O₃: C 69.15, H 4.93, N 12.10; found: C 69.48, H 4.89, N 12.30.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, m/z): 346.0 (100 %), 347.0 (20.6 %) for [M-H]⁻.

IR: (cm⁻¹): 3080, 2986, 2938, 2834, 2226, 1606, 1567, 1523, 1247, 1227.



2,6-diMeO-TCF: *(E)-2-(3-cyano-4-(2,6-dimethoxystyryl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)ylidene)malo-nonitrile.*

General procedure A was followed with 2,6-dimethoxybenzaldehyde (166 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂ + 2 % ethanol as eluent to get rid of a slightly blue by-product.

Yield: 76 % (262 mg), orange solid.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 8.17 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.52 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz), 7.51 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 6.79 (d, 2 H, *J* = 8.4 Hz), 3.92 (s, 6 H, -OMe), 1.75 (s, 6 H, -CH₃).

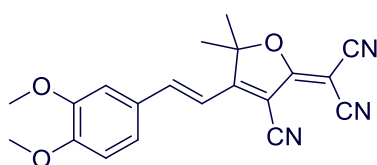
¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz) 177.8, 177.5, 161.1 (2 C), 139.5, 135.6, 117.9, 113.4, 112.6, 112.1, 111.7, 105.0 (2 C), 99.3, 98.2, 57.0 (2 C), 52.6, 26.1 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: calcd for C₂₀H₁₇N₃O₃: C 69.15, H 4.93, N 12.10; found: C 69.28, H 4.66, N 12.03.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, m/z): 346.0 (100 %), 347.1 (30.3 %) for [M-H]⁻.

IR: (cm⁻¹): 2992, 2968, 2908, 2226, 1577, 1559, 1405, 1378, 1252, 1055.



3,4-diMeO-TCF: *(E)-2-(3-cyano-4-(3,4-dimethoxystyryl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)ylidene)malo-nonitrile.*

General procedure A was followed with 3,4-dimethoxybenzaldehyde (166 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂ + 2 % ethanol as eluent to get rid of a slightly blue by-product.

Yield: 47 % (163 mg), red solid.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 7.91 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.54 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz), 7.52 (s, 1 H), 7.11 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.11 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz), 3.86 (s, 6 H), 1.80 (s, 6 H, -CH₃).

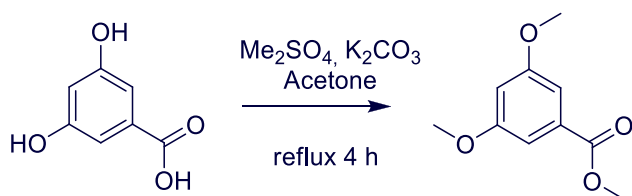
¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz): 177.9, 176.2, 153.6, 149.8, 148.8, 127.9, 125.9, 113.5 (2 C), 112.6, 112.4, 112.0, 111.7, 99.7, 97.8, 56.4, 56.4, 54.1, 25.8 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: calcd for C₂₀H₁₇N₃O₃: C 69.15, H 4.93, N 12.10; found: C 69.45, H 4.89, N 12.22.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, m/z): 346.0 (100 %), 346.9 (28.2 %) for [M-H]⁻.

IR: (cm⁻¹): 2987, 2971, 2901, 2226, 1556, 1521, 1406, 1379, 1257, 1069.



IV-2: methyl 3,5-dimethoxybenzoate

Dimethyl sulfate (11 mL, 113.4 mmol, 3.5 eq) was added at room to a solution of dihydroxybenzoic acid (5 g, 32 mmol, 1 eq) and K₂CO₃ (18 g, 4 eq) in 100 mL of acetone. The solution was stirred 4 hours at reflux, then allowed to cool to room temperature. The solid was filtered off, washed with acetone (2 x 100 mL) and the filtrate was evaporated under vacuum until it was reduced to 50 mL. The residue was diluted with NaOH solution (50 mL), stirred for 5 minutes and extracted with Et₂O (100 + 2 x 50 mL). The organic solution was washed with HCl (1 M), then with NaHCO₃ solution, dried over Na₂SO₄ and the solvents were removed under vacuum. The crude product was used for the next step without further purification.

Yield: 76 % (4.8 g), slightly yellow powder.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in CDCl₃, 500 MHz): 7.17 (s, 2 H), 6.63 (s, 1 H), 3.94 (s, 3 H), 3.81 (s, 6 H).

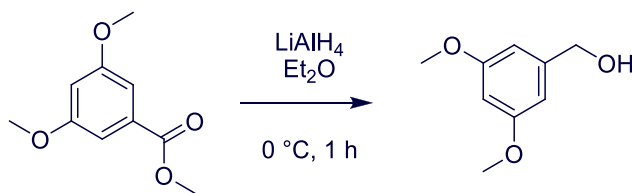
¹³C NMR (125 MHz, δ/ppm in CDCl₃): 167.0, 160.8 (2 C), 132.1, 107.2 (2 C), 105.9, 58.7, 55.7 (2 C).

Melting point: 35 °C.

Elemental analysis: calcd for C₁₀H₁₂O₄: C 61.22, H 6.16; found: C 60.93, H 6.08.

Mass: Mass spectrum (ES, m/z): 198.1 for [M+H]⁺.

IR: (cm⁻¹): 2969, 2901, 1717, 1594, 1455, 1240, 1199, 1155, 1063, 982, 758.



IV-3: (3,5-dimethoxyphenyl)methanol

LiAlH₄ (775 mg, 20 mmol) was dissolved in 80 mL of diethyl ether. Ester **IV-2** (4 g, 20 mmol) was added dropwise at 0 °C. The solution was stirred 1 h at 0 °C and quenched with Na₂SO₄ saturated solution. The solid was filtered off, washed with diethyl ether (100 mL) and the organic layer was evaporated to afford 2.4 g of pure product as a colorless oil.

Yield: 78 % (2.4 g), colorless oil.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in CDCl₃, 500 MHz): 6.52 (d, 2 H, J = 2.1 Hz), 6.38 (t, 1 H, J = 2.1 Hz), 4.63 (s, 2 H), 3.79 (s, 6 H), 1.80 (s, 1 H, -OH).

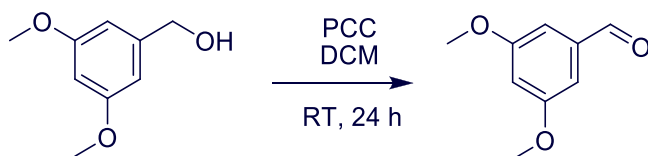
^{13}C NMR (125 MHz, δ /ppm in CDCl_3) 161.1 (2 C), 143.5, 104.7 (2 C), 99.8, 65.5, 55.5 (2 C).

Melting point: 57 °C.

Elemental analysis: calcd for $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_3$: C 64.27, H 7.19; found: C 64.39, H 7.56.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 191.1 for $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

IR: (cm^{-1}): 3388, 3342, 2992, 2902, 1596, 1455, 1427, 1294, 1203, 1147, 1007.



IV-4: 3,5-dimethoxybenzaldehyde

(2,3-dimethoxyphenyl)methanol (2 g, 12 mmol) in 8 mL of CH_2Cl_2 was added to a solution of PCC (3.7 g, 1.5 eq) in 30 mL of

CH_2Cl_2 at room temperature. The solution was vigorously stirred during 24 h and then filtered through a celite pad which was washed with 100 mL of dichloromethane. After evaporation of the solvent the crude product was dissolved in EtOAc, washed with 2 x 15 mL of NaCl 1 M, 10 mL of HCl 1 M, 2 x 10 mL of saturated NaHCO_3 saturated solution and finally with 2 x 10 mL of brine. After drying over Na_2SO_4 and evaporation, the product was obtained as a yellow oil.

Yield: 81 % (1.5 g), yellow oil.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in CDCl_3 , 500 MHz): 9.91 (s, 1 H), 7.01 (d, 2 H, $J = 2.3$ Hz), 6.70 (t, 1 H, $J = 2.3$ Hz), 3.84 (s, 6 H, $-\text{OCH}_3$).

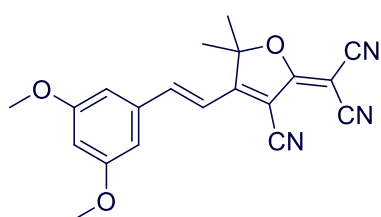
^{13}C NMR (125 MHz, δ /ppm in CDCl_3) 192.0, 161.4 (2 C), 138.5, 107.3 (2 C), 107.2, 55.8 (2 C).

Melting point: 47 °C.

Elemental analysis: calcd for $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$: C 65.05, H 6.07; found: C 64.88, H 6.22.

Mass: Mass spectrum (ES , m/z): 189.1 for $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

IR: (cm^{-1}): 3073, 2942, 2848, 1693, 1590, 1467, 1297, 1205, 1157.



3,5-diMeO-TCF: (E)-2-(3-cyano-4-(3,5-dimethoxystyryl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene)malono-nitrile

General procedure A was followed with **IV-4** (166 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH_2Cl_2 to CH_2Cl_2 + 2 % ethanol as eluent to get rid of a slightly blue by-product.

Yield: 42 % (142 mg), yellow solid.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 7.83 (d, 1 H, J = 16.4 Hz), 7.22 (d, 1 H, J = 16.4 Hz), 7.08 (d, 2 H, J = 2.2 Hz), 6.68 (t, 1 H, J = 2.2 Hz), 3.81 (s, 6 H), 1.74 (s, 6 H, $-\text{CH}_3$).

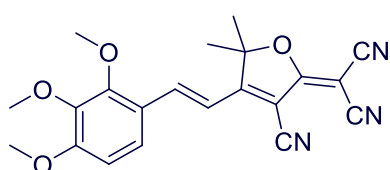
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 177.7, 175.6, 161.4 (2 C), 147.8, 136.8, 116.6 (2 C), 113.2, 112.4, 111.3, 107.7, 105.0, 100.3, 100.1, 56.2 (2 C), 55.2, 25.6 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3$: C 69.15, H 4.93, N 12.10; found: C 69.19, H 4.93, N 12.20.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 346.1 (100 %), 347.1 (21.8 %) for $[\text{M}-\text{H}]^-$.

IR: (cm^{-1}): 3074, 2981, 2897, 2208, 1584, 1541, 1453, 1340, 1321, 1155, 971.



2,3,4-triMeO-TCF: (*E*)-2-(3-cyano-5,5-dimethyl-4-(2,3,4-trimethoxystyryl)furan-2(5H)-ylidene) malononitrile

General procedure A was followed with 2,3,4-trimethoxybenzaldehyde (196 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH_2Cl_2 to CH_2Cl_2 + 2 % ethanol as eluent to get rid of a slightly blue by-product.

Yield: 64 % (240 mg), red solid.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 8.22 (d, 1 H, J = 16.4 Hz), 7.83 (d, 1 H, J = 8.4 Hz), 7.26 (d, 1 H, J = 16.4 Hz), 7.02 (d, 1 H, J = 8.4 Hz), 3.93 (s, 3 H), 3.90 (s, 3 H), 3.79 (s, 3 H), 1.75 (s, 6 H, $-\text{CH}_3$).

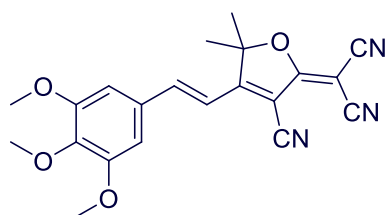
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 177.4, 176.0, 157.6, 153.7, 142.5, 141.7, 125.1, 120.8, 113.7, 112.8, 112.0, 111.5, 108.9, 99.1, 96.3, 61.6, 60.5, 56.3, 53.5, 24.8 (2 C).

Melting point: 252 °C.

Elemental analysis: calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$: C 66.83, H 5.07, N 11.13; found: C 66.72, H 5.36, N 11.28.

Mass: Mass spectrum (ES^+ , m/z): 378.1 (100 %), 379.1 (25.2 %) for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 400.1 (19.8 %), 401.1 (4.9 %) for $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

IR: (cm^{-1}): 2944, 2923, 2830, 2228, 1566, 1535, 1496, 1286, 1091, 978, 820.



3,4,5-triMeO-TCF: (*E*)-2-(3-cyano-5,5-dimethyl-4-(3,4,5-trimethoxystyryl)furan-2(5H)-ylidene) malononitrile

General procedure A was followed with 3,4,5-trimethoxybenzaldehyde (196 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH_2Cl_2 to CH_2Cl_2 + 2 % ethanol as eluent to get rid of a slightly blue by-product.

Yield: 41 % (156 mg), red solid.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 7.85 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz), 7.27 (s, 2 H), 7.18 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz), 3.87 (s, 6 H), 3.75 (s, 3 H), 1.81 (s, 6 H, $-\text{CH}_3$).

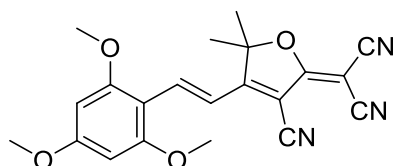
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 177.8, 175.8, 153.8 (2 C), 148.4, 142.0, 130.4, 115.2, 113.3, 112.5, 111.4, 107.9 (2 C), 99.9, 99.2, 60.9, 56.8 (2 C), 54.7, 25.8 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$: C 66.83, H 5.07, N 11.13; found: C 66.45, H 5.19, N 11.02.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 378.1 (100 %), 379.1 (25.1 %) for $[\text{M}+\text{H}]^+$, 400.1 (19.8 %), 401.1 (4.9 %) for $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

IR: (cm^{-1}): 2992, 2938, 2834, 2227, 1575, 1537, 1498, 1320, 1302, 1125.



2,4,6-triMeO-TCF: (*E*)-2-(3-cyano-5,5-dimethyl-4-(2,4,6-trimethoxystyryl)furan-2(5H)-ylidene)malonitrile

General procedure A was followed with 2,4,6-trimethoxybenzaldehyde (196 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH_2Cl_2 to $\text{CH}_2\text{Cl}_2 + 2\%$ ethanol as eluent to get rid of a slightly blue by-product.

Yield: 92 % (347 mg), violet solid.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 8.19 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz), 7.35 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz), 6.37 (s, 2 H), 3.95 (s, 6 H), 3.93 (s, 3 H), 1.74 (s, 6 H, $-\text{CH}_3$).

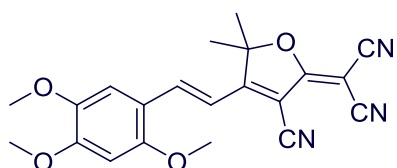
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 177.6, 177.3, 166.1, 162.4, 139.7 (2 C), 113.6 (2 C), 113.1, 112.2, 105.7, 98.1, 94.6, 91.5 (2 C), 56.5 (2 C), 56.0, 52.3, 25.8 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$: C 66.83, H 5.07, N 11.13; found: C 67.03, H 5.02, N 10.98.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 376.2 (100 %), 477.2 (21 %), 378.0 (9 %) for $[\text{M}-\text{H}]^-$.

IR: (cm^{-1}): 2932, 2225, 1614, 1572, 1542, 1509, 1323, 1257, 1208, 1124, 816.



2,4,5-triMeO-TCF: (*E*)-2-(3-cyano-5,5-dimethyl-4-(2,4,5-trimethoxystyryl)furan-2(5H)-ylidene)malonitrile

General procedure A was followed with 2,4,5-trimethoxybenzaldehyde (196 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂ + 2 % ethanol as eluent to get rid of a slightly blue by-product.

Yield: 50 % (189 mg), black solid.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 8.28 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.48 (s, 1 H), 7.16 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 6.78 (s, 1 H), 3.87 (s, 6 H), 3.93 (s, 3 H), 3.92 (s, 3 H), 3.80 (s, 3 H), 1.74 (s, 6 H, -CH₃).

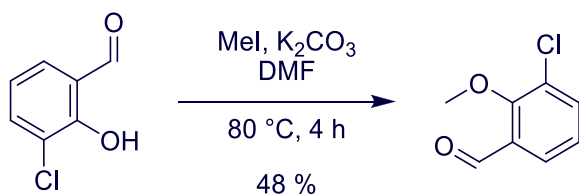
¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz) 178.2, 177.0, 157.1, 156.0, 144.1, 143.8, 115.1, 113.7, 112.9, 112.8, 112.4, 112.3, 99.3, 97.9, 95.1, 57.3, 56.9, 56.8, 53.2, 25.8 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: calcd for C₂₁H₁₉N₃O₄: C 66.83, H 5.07, N 11.13; found: C 67.01, H 5.03, N 10.89.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, *m/z*): 378.1 (100 %), 379.1 (24.8 %) for [M+H]⁺, 400.1 (20.2 %), 401.1 (4.9 %) for [M+Na]⁺.

IR: (cm⁻¹): 2992, 2970, 2897, 2225, 1566, 1503, 1309, 1250, 1206, 1107, 1010.



IV-5: 3-chloro-2-methoxybenzaldehyde

4-chloro-2-hydroxybenzaldehyde (700 mg, 5 mmol) and K₂CO₃ (4.1 g, 30 mmol, 6 eq) were dissolved in 10 mL of anhydrous DMF and the mixture was heated to 80 °C before the addition of

iodomethane (1.25 mL, 20 mmol, 4 eq). The solution was stirred at 80 °C overnight and cooled to room temperature. 10 mL of water were added and the product was extracted with 3 x 30 mL of EtOAc. The organic layer was washed with 50 mL of LiCl 10% in water then brine. After evaporation of the solvent, the yellow oil is purified by silica gel chromatography (20/1 Petroleum ether/EtOAc as eluent).

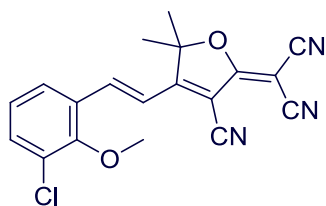
Yield: 48 % (398 mg), colorless oil.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in CDCl₃, 300 MHz): 10.39 (s, 1 H), 7.77 (dd, 1 H, *J* = 7.8 Hz, *J* = 1.8 Hz), 7.65 (dd, 1 H, *J* = 7.8 Hz, *J* = 1.8 Hz), 7.20 (t, 1 H, *J* = 7.8 Hz), 4.03 (s, 3 H).

Elemental analysis: calcd for C₈H₇O₂Cl: C 56.32, H 4.14; found: C 56.26, 4.42.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, *m/z*): 169.0 (100 %), 170.9 (34.1 %) for [M-H]⁻.

IR: (cm⁻¹): 2996, 2960, 2834, 2651, 1671, 1588, 1460, 1419, 1238, 991, 753, 712.



3-Cl-o-MeO-TCF: *(E)-2-(4-(3-chloro-2-methoxystyryl)-3-cyano-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene)malononitrile*

General procedure A was followed with **IV-5** (170 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂ + 2 % ethanol as eluent to get rid of a slightly blue by-product.

Yield: 55 % (194 mg), orange solid.

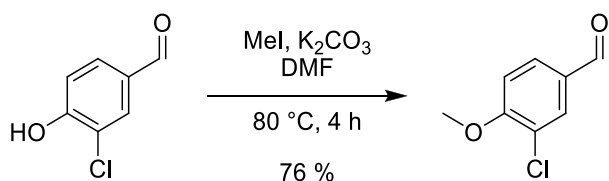
NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 8.23 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 8.07 (d, 1 H, *J* = 8.0 Hz), 7.68 (d, 1 H, *J* = 8.0 Hz), 7.36 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.32 (t, 1 H, *J* = 8.0 Hz) 3.86 (s, 3 H), 1.75 (s, 6 H, -CH₃).

¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz) 177.9, 175.6, 155.7, 140.4, 134.3, 130.2, 128.4, 128.0, 126.5, 118.1, 113.2, 112.3, 111.9, 100.2, 99.7, 62.6, 55.5, 25.1 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, *m/z*): 352.0 (100 %), 354.0 (43 %) for [M+H]⁺.

IR: (cm⁻¹): 2986, 2955, 2824, 2668, 1672, 1588, 1460, 1419, 1235, 990, 750, 712.



IV-6: *3-chloro-4-methoxybenzaldehyde*

3-chloro,4-hydroxybenzaldehyde (700 mg, 5 mmol) and K₂CO₃ (4.1 g, 30 mmol, 6 eq) were dissolved in 10 mL of anhydrous DMF and the mixture was heated to 80 °C before the addition

of iodomethane (1.25 mL, 20 mmol, 4 eq). The solution was stirred at 80 °C overnight and cooled to room temperature. 10 mL of water were added and the product was extracted with 3 x 30 mL of EtOAc. The organic layer was washed with 50 mL of LiCl 10% in water then brine. After evaporation of the solvent, the yellow oil is purified by silica gel chromatography (20/1 Petroleum ether/EtOAc as eluent).

Yield: 76 % (571 mg), pale yellow oil

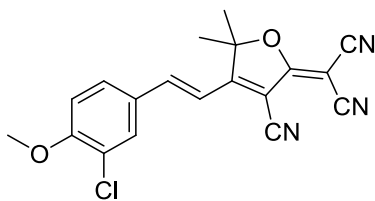
NMR ¹H NMR (δ/ppm in CDCl₃, 500 MHz): 9.86 (s, 1 H), 7.91 (d, 1 H, *J* = 2.0 Hz), 7.78 (dd, 1 H, *J* = 8.4, *J* = 2.0 Hz), 7.05 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz), 4.00 (s, 3 H).

¹³C NMR (125 MHz, δ/ppm in CDCl₃) 189.7, 159.9, 131.3, 130.6, 130.4, 123.8, 111.8, 56.6.

Melting point: 54 °C.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, *m/z*): 169.0 (100 %), 171.0 (30 %) for [M-H]⁻.

IR: (cm⁻¹): 2854, 1692, 1591, 1498, 1312, 1267, 1056, 816.



3-Cl-p-MeO-TCF: (*E*)-2-(4-(3-chloro-4-methoxystyryl)-3-cyano-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene)malononitrile

General procedure A was followed with **IV-6** (170 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂ + 2 % ethanol as eluent to get rid of a slightly blue by-product.

Yield: 67 % (236 mg), orange solid.

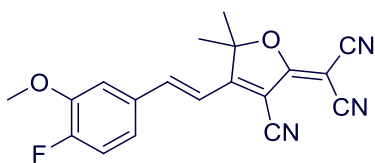
NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 8.18 (d, 1 H, *J* = 2.0 Hz), 7.91 (dd, 1 H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 2.0 Hz), 7.88 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.30 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz), 7.20 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 3.97 (s, 3 H), 1.80 (s, 6 H).

¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz) 177.1, 175.2, 157.5, 145.9, 130.8, 130.5, 128.0, 122.1, 114.2, 113.2, 112.7, 111.8, 110.8, 99.3, 98.5, 56.6, 54.0, 25.1 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, *m/z*): 350.1 (100 %), 352.1 (29 %) for [M-H]⁻.

IR: (cm⁻¹): 2219, 1571, 1552, 1497, 1264, 1019, 816.



4-F-m-MeO-TCF: (*E*)-2-(3-cyano-4-(4-fluoro-3-methoxystyryl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene)malononitrile

General procedure A was followed with 4-fluoro-3-methoxybenzaldehyde (154 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂ + 2 % ethanol as eluent to get rid of a slightly blue by-product.

Yield: 36 % (123 mg), orange solid.

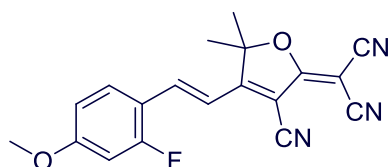
NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 7.88 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.72 (dd, 1 H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.4 Hz), 7.54-7.57 (m, 1 H), 7.36 (dd, 1 H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 10.2 Hz), 7.21 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 3.94 (s, 3 H), 1.80 (s, 6 H, -CH₃).

¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz) 177.7, 175.6, 154.4 (d, 1 C, *J*_{C-F} = 245 Hz), 148.3 (d, 1 C, *J*_{C-F} = 10 Hz), 147.0, 132.1, 123.8 (d, 1 C, *J*_{C-F} = 7.5 Hz), 117.4 (d, 1 C, *J*_{C-F} = 19 Hz), 116.0, 114.9, 113.2, 112.4, 111.3, 100.1, 100.0, 56.9, 55.1, 25.7 (2 C).

Melting point: 262 °C.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, *m/z*): 336.0 (100 %), 338.2 (16.3 %) for [M+H]⁺.

IR: (cm⁻¹): 2968, 2937, 2220, 2208, 1565, 1536, 1509, 1294, 1273, 825.



2-F-p-MeO-TCF: (*E*)-2-(3-cyano-4-(2-fluoro-4-methoxy styryl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene)malononitrile

General procedure A was followed with 2-fluoro-4-methoxybenzaldehyde (154 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂ + 2 % ethanol as eluent to get rid of a slightly blue by-product.

Yield: 55 % (184 mg), purple solid.

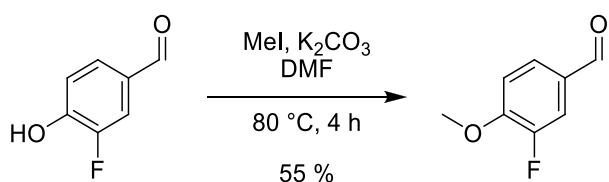
NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 8.07 (t, 1 H, *J*_{H-F} = 8.8 Hz), 8.01 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.19 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.05 (dd, 1 H, *J* = 13.2 Hz, *J* = 2.2 Hz), 6.98 (dd, 1 H, *J* = 8.8 Hz, *J* = 2.2 Hz), 3.89 (s, 3 H), 1.77 (s, 6 H, -CH₃).

¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz) 177.2, 175.3, 164.4 (d, 1 C, ³*J*_{C-F} = 12 Hz), 162.6 (d, 1 C, ¹*J*_{C-F} = 255 Hz), 139.3, 131.4 (d, 1 C, ³*J*_{C-F} = 4 Hz), 114.8 d, 1 C, ²*J*_{C-F} = 12 Hz), 114.8, 112.7, 112.2, 111.8, 111.2, 102.1 (d, 1 C, ²*J*_{C-F} = 26 Hz), 99.3, 97.8, 56.3, 54.1, 24.8 (2 C).

Melting point: > 266 °C.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, *m/z*): 336.0 (100 %) for [M+H]⁺.

IR: (cm⁻¹): 2989, 2932, 2228, 1612, 1568, 1518, 1314, 1256, 862, 814.



IV-7: 3-Fluoro-4-methoxybenzaldehyde

3-fluoro-4-hydroxybenzaldehyde (687 mg, 4.9 mmol) and K₂CO₃ (4.1 g, 30 mmol, 6 eq) were dissolved in 10 mL of anhydrous DMF and the mixture was heated to 80 °C before the addition

of iodomethane (1.25 mL, 20 mmol, 4 eq). The solution was stirred at 80 °C overnight and cooled to room temperature. 10 mL of water were added and the product was extracted with 3 x 30 mL of EtOAc. The organic layer was washed with 50 mL of LiCl 10% in water then brine. After evaporation of the solvent, the yellow oil is purified by silica gel chromatography (20/1 Petroleum ether/EtOAc as eluent).

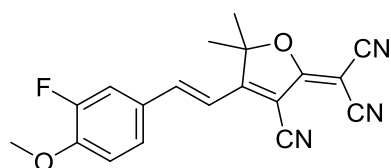
Yield: 55 % (412 mg), orange oil.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in CDCl₃, 500 MHz): 9.84 (s, 1 H), 7.63 (dd, 1 H, *J* = 8.1 Hz, *J*_{H-F} = 1.6 Hz), 7.58 (dd, 1 H, *J*_{H-F} = 11.0 Hz, *J* = 1.8 Hz), 7.07 (t, 1 H, *J* = 8.1 Hz), 3.96 (s, 3 H).

¹³C NMR (125 MHz, δ/ppm in CDCl₃) 189.9, 153.3 (d, 1 C, ²*J*_{C-F} = 2.1 Hz), 152.2 (d, 1 C, ¹*J*_{C-F} = 7.3 Hz), 130.1, 128.2, 115.6 (d, 1 C, ³*J*_{C-F} = 0.7 Hz), 112.7, 56.5.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, *m/z*): 153.0 (100 %) for [M-H]⁻.

IR: (cm⁻¹): 2937, 2843, 2739, 1686, 1605, 1513, 1276, 1117, 1018.



3-F-p-MeO-TCF: (*E*)-2-(3-cyano-4-(3-fluoro-4-methoxy styryl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene)malononitrile

General procedure A was followed with **IV-7** (154 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂ + 2 % ethanol as eluent to get rid of a slightly blue by-product.

Yield: 72 % (198 mg), red solid.

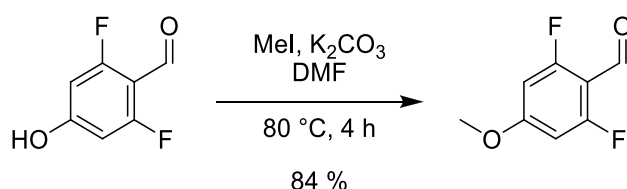
NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 7.94 (dd, 1 H, *J* = 2.0 Hz, *J*_{H-F} = 11.0 Hz), 7.84 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.69 (d, 1 H, *J* = 8.6 Hz), 7.27 (t, 1 H, *J* = 8.6 Hz), 7.12 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 3.90 (s, 3 H), 1.74 (s, 6 H).

¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz) 177.2, 175.2, 151.6 (d, 1 C, ¹*J*_{C-F} = 255 Hz), 150.6, 146.3, 128.4, 127.6 (d, 1 C, ³*J*_{C-F} = 4 Hz), 115.5 (d, 1 C, ²*J*_{C-F} = 12 Hz), 114.2, 114.0, 112.7, 111.9, 110.9 (d, 1 C, ²*J*_{C-F} = 26 Hz), 99.3, 98.3, 56.3, 54.1, 24.8 (2 C).

Melting point: 246 °C.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, *m/z*): 335.0 (100 %), 336.0 (22 %) for [M-H]⁻.

IR: (cm⁻¹): 2848, 2225, 1566, 1536, 1517, 1282, 11061019, 823.



IV-8: 2,6-difluoro-4-methoxybenzaldehyde

2,6-difluoro-4-hydroxybenzaldehyde (195 mg, 1.23 mmol) and K₂CO₃ (770 mg, 7.5 mmol, 6 eq) were dissolved in 10 mL of anhydrous DMF

and the mixture was heated to 80 °C before the addition of iodomethane (300 μL, 5 mmol, 4 eq). The solution was stirred at 80 °C overnight and cooled to room temperature. 10 mL of water were added and the product was extracted with 3 x 30 mL of EtOAc. The organic layer was washed with 50 mL of LiCl 10% in water then brine. After evaporation of the solvent, the yellow oil is purified by silica gel chromatography (20/1 Petroleum ether/EtOAc as eluent).

Yield: 84 % (178 mg), white solid.

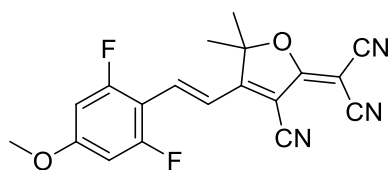
NMR ¹H NMR (δ/ppm in CDCl₃, 500 MHz): 10.13 (s, 1 H), 6.44 (d, 2 H, *J*_{H-F} = 10.3 Hz), 3.81 (s, 3 H).

¹³C NMR (125 MHz, δ/ppm in CDCl₃) 183.5 (t, 1 C, ³*J*_{C-F} = 8.0 Hz), 165.8, 165. (d, 1 C, *J* = 24.3 Hz), 164. 6 (d, 1 C, *J* = 260 Hz), 98.7 (d, 1 C, *J* = 24 Hz), 56.3.

Melting point: 72 °C.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, *m/z*): 172.0 (100 %), 173.0 (9 %) for [M+H]⁺.

IR: (cm⁻¹): 3088, 2890, 1686, 1621, 1569, 1428, 1349, 1211, 1150, 1044.



2,6-diF-p-MeO-TCF: (E)-2-(3-cyano-4-(2,6-difluoro-4-methoxystyryl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene) malononitrile

General procedure A was followed with **IV-8** (172 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂ + 2 % ethanol as eluent to get rid of a slightly blue by-product.

Yield: 77 % (206 mg), orange solid.

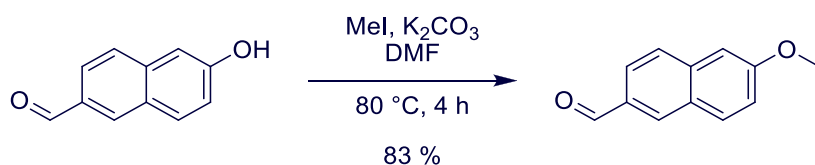
NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 7.74 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.11 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.01 (d, 2 H, *J* = 11.4 Hz), 3.90 (s, 3 H), 1.77 (s, 6 H, -CH₃).

¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz) 176.9, 174.9, 162.2 (d, 1 C, *J* = 254 Hz), 133.1, 117.7, 117.7, 112.5, 111.7, 110.9, 104.8 (d, 1 C, *J* = 20 Hz), 99.7, 99.4, 99.1, 56.8, 54.7, 25.0 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, *m/z*): 352.1 (100 %), 353.1 (26 %) for [M-H]⁻.

IR: (cm⁻¹): 2222, 1697, 1578, 1537, 1314, 1284, 1146, 824.



IV-9: 6-methoxy-2-naphthaldehyde

6-hydroxy-2-naphthaldehyde (861 mg, 5 mmol) and K₂CO₃

(4.1 g, 30 mmol, 6 eq) were dissolved in 10 mL of anhydrous DMF and the mixture was heated to 80 °C before the addition of iodomethane (1.25 mL, 20 mmol, 4 eq). The solution was stirred at 80 °C overnight and cooled to room temperature. 10 mL of water were added and the product was extracted with 3 x 30 mL of EtOAc. The organic layer was washed with 50 mL of LiCl 10% in water then brine. After evaporation of the solvent, the yellow powder is washed with petroleum ether. The product was used in the next step without further purification.

Yield: 83 % (776 mg), yellow powder.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 10.07 (s, 1 H), 8.48 (s, 1 H), 8.06 (d, 1 H, *J* = 8.8 Hz), 7.94 (d, 1 H, *J* = 8.8 Hz), 7.85 (d, 1 H, *J* = 8.8 Hz), 7.44 (s, 1 H), 7.29 (d, 1 H, *J* = 8.8 Hz), 3.92 (s, 3 H).

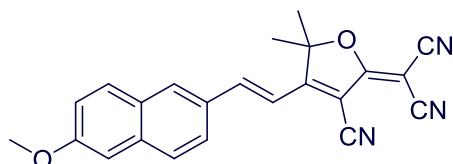
¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz) 193.1, 160.4, 138.4, 134.9, 132.5, 131.8, 128.3, 128.1, 123.6, 120.3, 107.0, 56.1.

Melting point: 84 °C.

Elemental analysis: calcd for C₁₂H₁₀O₂: C 77.40, H 5.41; found: C 77.72, H 5.03.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, m/z): 186.1 (100 %), 186.9 (21 %) for [M+H]⁺.

IR: (cm⁻¹): 2986, 2965, 2892, 1673, 1621, 1568, 1466, 1267, 1171, 1017, 860, 802.



6-MeO-Naphthyl-2-TCF: *(E)-2-(3-cyano-4-(2-(6-methoxynaphthalen-2-yl)vinyl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene)malononitrile*

General procedure A was followed with **IV-9** (186 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂ + 2 % ethanol as eluent to get rid of a slightly blue by-product.

Yield: 77 % (283 mg), purple solid.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 8.37 (s, 1 H), 8.11 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 8.04 (d, 1 H, *J* = 8.8 Hz), 7.96 (d, 1 H, *J* = 8.8 Hz), 7.92 (d, 1 H, *J* = 8.8 Hz), 7.42 (d, 1 H, *J* = 2.4 Hz), 7.28 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.25 (dd, 1 H, *J* = 8.8 Hz, *J* = 2.4 Hz) 3.92 (s, 3 H), 1.82 (s, 6 H, -CH₃).

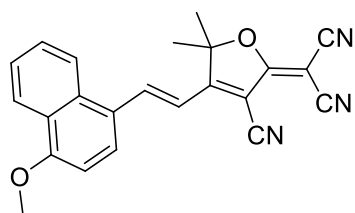
¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz) 177.8, 175.9, 160.1, 148.5, 137.1, 133.2, 131.4, 130.4, 128.7, 128.4, 125.0, 120.2, 114.9, 113.4, 112.5, 111.7, 107.2, 99.9, 98.8, 56.1, 54.6, 25.7 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: calcd for C₂₃H₁₇N₃O₂: C 75.19, H 4.66, N 11.44; found: C 75.33, H 4.28, N 11.67.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, m/z): 368.0 (100 %), 369.0 (24.8 %) for [M+H]⁺.

IR: (cm⁻¹): 2986, 892, 2228, 1562, 1531, 1370, 1172, 976.



4-MeO-Naphthyl-1-TCF: *(E)-2-(3-cyano-4-(2-(4-methoxynaphthalen-1-yl)vinyl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene)malononitrile*

General procedure A was followed with 4-methoxy-1-naphthaldehyde (172 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂ + 2 % ethanol as eluent to get rid of a slightly blue by-product.

Yield: 63 % (263 mg), black solid.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 8.84 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 8.42 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz), 8.30 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz), 8.26 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz), 7.77 (t, 1 H, *J* = 8.4 Hz), 7.66 (t, 1 H, *J* = 8.4 Hz), 7.32 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.23 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz), 4.12 (s, 3 H), 1.83 (s, 6 H, -CH₃).

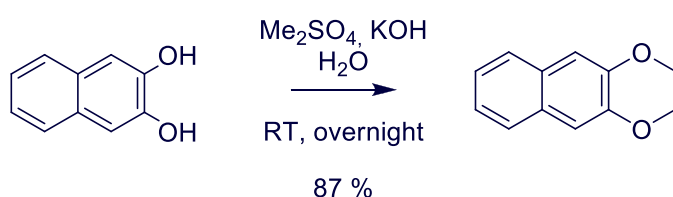
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 186.8, 177.4, 175.8, 159.1, 143.1, 132.3, 129.1, 128.6, 127.4, 126.2, 124.7, 123.1, 122.5, 122.4, 114.4, 112.8, 112.0, 105.4, 99.3, 56.3, 53.5, 25.0 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2$: C 75.19, H 4.66, N 11.44; found: C 75.04, H 4.68, N 11.39.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 368.1 (100 %), 369.1 (18 %) for $[\text{M}+\text{H}]^+$.

IR: (cm^{-1}): 2212, 1551, 1508, 1265, 1228, 1089, 962, 827, 764.



IV-10: 2,3-dimethoxynaphthalene

In a three-necked round-bottomed flask, a suspension of 2,3-dihydroxynaphthalene (10.0 g, 62.4 mmol) in water (50 mL) was cooled in an ice-bath.

Two pressure equilibrating funnels were set up and charged with dimethyl sulfate (14.4 mL, 151 mmol) and aqueous potassium hydroxide (11.1 g, 200 mmol in 34 mL of water) respectively. Both of these were added together dropwise over 10 min resulting in the suspension first dissolving and then a precipitate forming. The reaction was left overnight at room temperature. The solid was then filtered off, washed with water until the washings were neutral (5 x 200 mL), and dried.

Yield: 83 % (9.9 g), white solid.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 7.74 (m, 2 H), 7.38 (m, 2 H), 7.18 (s, 2 H), 4.06 (s, 6 H).

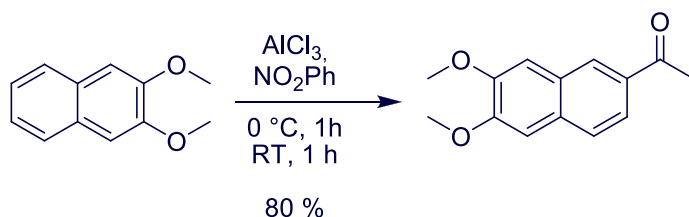
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 149.4 (2 C), 129.2 (2 C), 126.3 (2 C), 124.2 (2 C), 106.3 (2 C), 55.8 (2 C).

Melting point: 114 °C.

Elemental analysis: calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_2$: C 76.57, H 6.43; found: C 76.31, H 6.13.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 188.2 (100 %), for $[\text{M}+\text{H}]^+$.

IR: (cm^{-1}): 3062, 3020, 2832, 1698, 1596, 1508, 1451, 1251, 1152, 999, 751.



IV-11: 1-(6,7-dimethoxynaphthalen-2-yl)ethanone

2,3-dimethoxynaphthalene (9.9 g 52 mmol) and acetyl chloride (8 mL, 112 mmol) were dissolved in 50 mL of nitrobenzene and cooled in an ice bath.

Aluminium chloride (28 g, 210 mmol) was then added in portions over 10 minutes. The reaction was stirred for a further hour at 0 °C and then left 1 h at room temperature. The mixture was poured into

a mixture of ice (120 g) and 10 % HCl (150 mL). CH₂Cl₂ was then added and the two phases separated. The aqueous was further extracted with dichloromethane (3 x 100 mL) and the combined organics then washed with 1M NaOH (3 x 100 mL) and water (2 x 100 mL) and brine (2 x 100 mL), dried (anhydrous Na₂SO₄) and evaporated to give a brown oil. This was chromatographed (silica gel, CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂ + 8 % EtOAc gradient) to give the pure product.

Yield: 80 % (9.7 g), pale yellow solid.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 8.32 (d, 1 H, *J* = 1.8 Hz), 7.90 (dd, 1 H, *J* = 8.8 Hz, *J* = 1.8 Hz), 7.72 (d, 1 H, *J* = 8.8 Hz), 7.22 (s, 1 H), 7.14 (s, 1 H), 4.03 (s, 3 H), 4.02 (s, 3 H), 2.69 (s, 3 H).

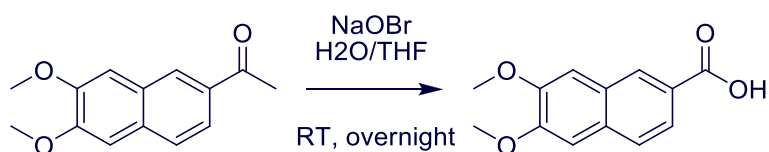
¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz) 198.0, 151.5, 150.1, 133.1, 132.0, 128.4, 128.2, 126.6, 122.7, 107.5, 106.1, 56.0, 56.0, 26.6.

Melting point: 100 °C.

Elemental analysis: calcd for C₁₄H₁₄O₃: C 73.03, H 6.13; found: C 73.25, H 6.11.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, *m/z*): 231.2 (100 %), 232.2 (11 %) for [M+H]⁺.

IR: (cm⁻¹): 3048, 2968, 2828, 1672, 1596, 1508, 1254, 1227, 1195, 851.



IV-12: 1-(6,7-dimethoxynaphthalen-2-yl)ethanone

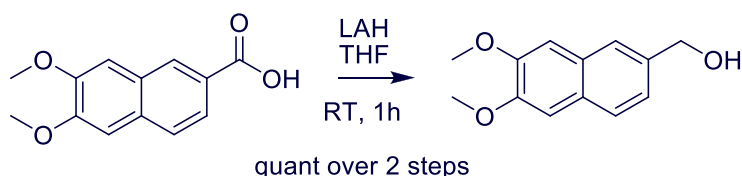
NaOH (1.7 g, 44 mmol) was dissolved in 6 mL of water and cooled in an ice bath. Bromine (0.7 mL 13 mmol) was carefully added and the solution stirred 30 min at 0 °C. **IV-11** (1g, 4.4 mmol in 4 mL of THF) was then added at 0 °C and the mixture was stirred with vigorous agitation overnight at room temperature. The phases were separated and organic phase was extracted with of NaOH 1M (10 mL). To the combined aqueous, was added Na₂S₂O₅ 10 % in water (10 mL) and acidified with HCL until the pH reached 2. The white precipitate was then filtered and dried and used without further purification in the next step.

Yield: 1123 mg, white solid.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in CDCl₃, 300 MHz): 8.57 (s, 1 H), 8.03 (d, 1 H, *J* = 8.5 Hz), 7.76 (d, 1 H, *J* = 8.5 Hz), 7.26 (s, 1 H), 7.18 (s, 1 H), 4.06 (s, 3 H), 4.05 (s, 3 H).

Melting point: 248 °C.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, *m/z*): 231.1 (100 %), 232.1 (16 %) for [M-H]⁻.



IV-13: (6,7-dimethoxynaphthalen-2-yl)methanol

LiAlH₄ (200 mg, 5 mmol) was dissolved in 20 mL of THF. Crude from the previous step was added in portions at 0 °C. The solution was stirred 1 h at 0 °C and quenched with Na₂SO₄ saturated solution. The solid was filtered off, washed with diethyl ether (100 mL) and the organic layer was evaporated to afford the pure product as a white solid.

Yield: quantitative over 2 steps (968 mg), white solid.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in CDCl₃, 500 MHz): 7.74-7.71 (m, 2 H), 7.40 (t, 1 H, *J* = 8.4 Hz), 7.17 (s, 1 H), 7.16 (s, 1 H), 4.86 (s, 2 H), 4.05 (bs, 6 H).

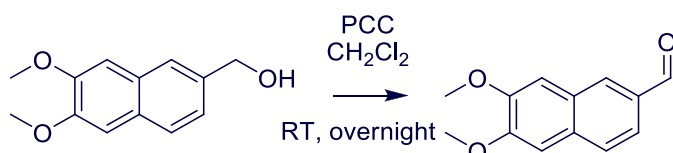
¹³C NMR (125 MHz, δ/ppm in CDCl₃) 149.8, 149.6, 136.7, 129.1, 126.8, 126.7, 124.4, 123.7, 65.7, 55.9 (2 C).

Melting point: 88 °C.

Elemental analysis: calcd for C₁₃H₁₄O₃: C 71.54, H 6.47; found: C 71.36, H 6.46.

Mass: Mass spectrum (ES, *m/z*): 219.0 (100 %), 219.9 (21.4 %) for [M+H]⁺.

IR: (cm⁻¹): 3051, 2968, 2942, 1759, 1672, 1508, 1486, 1451, 1254, 1227, 1196, 852.



IV-14: 6,7-dimethoxy-2-naphthaldehyde

IV-13 (5 g, 23 mmol) in 50 mL of CH₂Cl₂ was added to a solution of PCC (8.7 g, 1.5 eq) in CH₂Cl₂ (20 mL) at room temperature. The solution was vigorously stirred during 24 h and then filtered through a celite® pad which was washed with 3 x 100 mL of dichloromethane. After evaporation of the solvent the crude product was dissolved in EtOAc, washed with 2 x 15 mL NaCl 1 M, 10 mL of HCl 1 M, 2 x 10 mL of saturated NaHCO₃ saturated solution and finally with 2 x 10 mL of brine. After drying over Na₂SO₄ and evaporation, the crude was purified by column chromatography over silica gel using CH₂Cl₂ as eluent and the product was obtained as a white solid.

Yield: 56 % (2.8 g), white solid.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in CDCl₃, 500 MHz): 10.01 (s, 1 H), 8.19 (bs, 1 H), 7.83 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz), 7.77 (d, 2 H, *J* = 8.4 Hz), 7.25 (s, 1 H), 7.17 (s, 1 H), 4.05 (s, 3 H), 4.04 (s, 3 H).

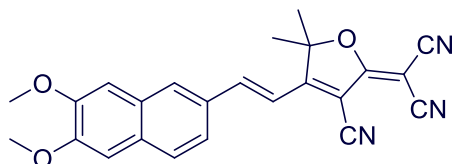
¹³C NMR (125 MHz, δ/ppm in CDCl₃) 192.2, 152.0, 150.3, 133.0, 132.8, 132.3, 128.4, 127.3, 122.0, 107.5, 106.4, 56.1, 56.0.

Melting point: 90 °C.

Elemental analysis: calcd for C₁₃H₁₂O₃: C 72.21, H 5.59; found: C 72.47, H 5.40.

Mass: Mass spectrum (ES, m/z): 216.1 for [M+H]⁺.

IR: (cm⁻¹): 2932, 2828, 2718, 1684, 1485, 1254, 1155, 994, 856.



6,7-diMeO-Naphthyl-TCF: (E)-2-(3-cyano-4-(2-(6,7-dimethoxynaphthalen-2-yl)vinyl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene)malononitrile

General procedure A was followed with **IV-14** (172 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂ + 2 % ethanol as eluent to get rid of a slightly blue by-product.

Yield: 68 % (270 mg), red solid.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 8.29 (s, 1 H), 8.11 (d, 1 H, J = 16.4 Hz), 7.91 (d, 1 H, J = 8.4 Hz), 7.86 (d, 1 H, J = 8.4 Hz), 7.45 (s, 1 H), 7.42 (s, 1 H), 7.29 (d, 1 H, J = 16.4 Hz), 3.94 (s, 3 H), 3.92 (s, 3 H), 1.83 (s, 6 H, -CH₃).

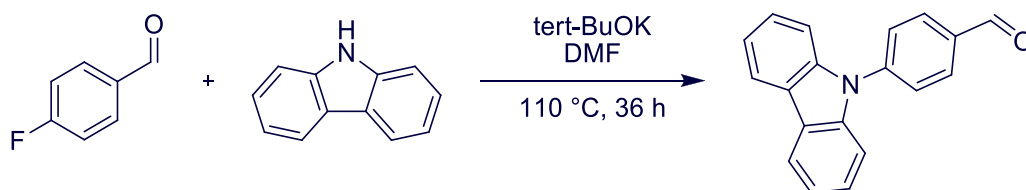
¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz) 177.2, 175.3, 151.5, 149.9, 148.1, 131.3, 130.4, 130.0, 128.6, 127.3, 122.6, 114.1, 112.8, 111.9, 111.2, 107.5, 106.7, 99.3, 97.9, 55.6, 55.5, 53.9, 25.1 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: calcd for C₂₄H₁₉N₃O₃: C 72.53, H 4.82, N 10.57; found: C 72.69, H 5.03, N 10.48.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, m/z): 396.1 (100 %), 397.1 (18 %) for [M-H]⁻.

IR: (cm⁻¹): 2968, 2942, 2218, 1556, 1485, 1370, 1220, 1161, 736.



IV-15: 4-(9H-carbazol-9-yl)benzaldehyde

Carbazole (2.1 g, 13 mmol, 1.05 eq) and tert-BuOK (1.4 g, 1.05 eq) were dissolved in anhydrous DMF (50 mL). 4-fluorobenzaldehyde (1.3 mL, 12 mmol, 1 eq) was added dropwise and the reaction was heated at 110 °C for 36 h. After cooling down to RT, water (100 mL) was added and the product was extracted with 3 x 30 mL of CH₂Cl₂, washed with LiCl 10% in water and brine and dried over Na₂SO₄. After evaporation, the crude was recrystallized from 10/1 Acetone/water to afford the pure product as yellow crystals.

Yield: 36 % (1.2 g), yellow crystals.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 10.15 (s, 1 H), 8.28 (d, 2 H, $J = 7.7$ Hz), 8.22 (d, 2 H, $J = 8.8$ Hz), 7.93 (d, 2 H, $J = 8.8$ Hz), 7.52 (d, 2 H, $J = 7.8$ Hz), 7.48 (t, 2 H, $J = 7.8$ Hz), 7.35 (d, 2 H, $J = 7.8$ Hz).

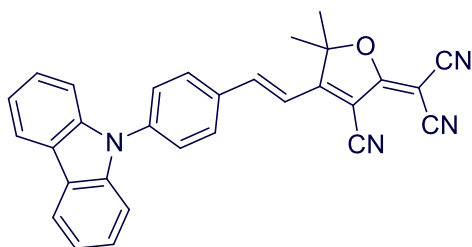
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 192.2, 142.1, 139.4 (2 C), 134.5, 131.3 (2 C), 126.7 (2 C), 126.5 (2 C), 123.2 (2 C), 120.7 (2 C), 120.6 (2 C), 109.8 (2 C).

Melting point: 158 °C.

Elemental analysis: calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{NO}$: C 84.11, H 4.83, N 5.16; found: C 83.99, H 5.05, N 5.29.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 272.2 for $[\text{M}+\text{H}]^+$.

IR: (cm^{-1}): 2822, 2733, 1701, 1594, 1450, 1224, 748.



Cbz-TCF: (E)-2-(4-(4-(9H-carbazol-9-yl)styryl)-3-cyano-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene)malononitrile

General procedure A was followed with **IV-15** (271 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH_2Cl_2 to $\text{CH}_2\text{Cl}_2 + 2\%$ ethanol as eluent to get rid of a slightly

blue by-product.

Yield: 38 % (163 mg), black solid.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 8.28 (d, 2 H, $J = 8.2$ Hz), 8.23 (d, 2 H, $J = 8.5$ Hz), 8.08 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz), 7.83 (d, 2 H, $J = 8.5$ Hz), 7.53 (d, 2 H, $J = 8.2$ Hz), 7.49 (d, 2 H, $J = 8.2$ Hz), 7.36 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz), 7.34 (t, 1 H, $J = 8.2$ Hz), 1.87 (s, 6 H, $-\text{CH}_3$).

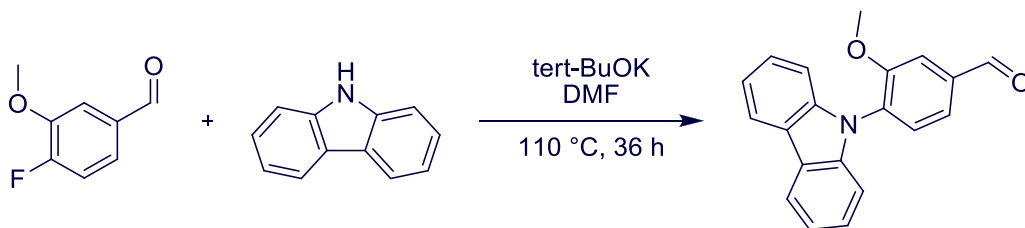
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 177.0, 175.0, 146.1, 140.0, 139.5 (2 C), 133.0, 131.2 (2 C), 126.7 (2 C), 126.4 (2 C), 123.1 (2 C), 120.6 (4 C), 115.8, 112.6, 111.8, 110.8 (2 C), 109.8, 99.7, 99.4, 54.5, 25.1 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}$: C 79.63, H 4.45, N 12.38; found: C 79.89, H 4.39, N 12.10.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 451.3 (100 %), 452.3 (31 %) for $[\text{M}-\text{H}]^-$.

IR: (cm^{-1}): 2989, 2223, 2202, 1567, 1553, 1165, 745.



IV-16: 4-(9H-carbazol-9-yl)-3-methoxybenzaldehyde

Carbazole (1.7 g, 10.5 mmol, 1.05 eq) and tert-BuOK (1.134 g, 1.05 eq) were dissolved in anhydrous DMF (50 mL). 4-fluorobenzaldehyde (1.5 g, 10mmol, 1 eq) was added dropwise and the reaction was heated at 110 °C for 36 h. After cooling down to RT, water (100 mL) was added and the product was extracted with 3 x 30 mL of CH₂Cl₂, washed with LiCl 10% in water and brine and dried over Na₂SO₄. After evaporation, the crude was recrystallized from ethanol to afford the pure product as white crystals.

Yield: 33 % (998 mg), white crystals.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 10.14 (s, 1 H), 8.22 (d, 2 H, *J* = 7.7 Hz), 7.86 (s, 1 H), 7.80 (bs, 2 H), 7.41 (t, 2 H, *J* = 7.7 Hz), 7.28 (t, 2 H, *J* = 7.7 Hz), 7.13 (d, 2 H, *J* = 7.7 Hz), 3.81 (s, 3 H).

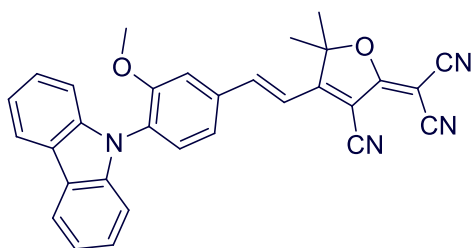
¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz) 193.0, 156.2, 140.6 (2 C), 137.6, 130.9, 130.5 (2 C), 126.7, 124.0 (2 C), 123.4, 120.9 (2 C), 120.6 (2 C), 113.3, 110.7 (2 C), 56.4.

Melting point: 194 °C.

Elemental analysis: calcd for C₂₀H₁₅NO₂: C 79.72, H 5.02, N 4.65; found: C 79.84, H 4.98, N 4.89.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, *m/z*): 302.2 (100 %), 303.1 (17 %) for [M+H]⁺.

IR: (cm⁻¹): 2973, 2937, 2817, 2733, 1698, 1595, 1450, 1226, 1151, 752, 726.



Cbz-3-MeO-TCF: (E)-2-(4-(4-(9H-carbazol-9-yl)-3-methoxystyryl)-3-cyano-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene)malononitrile

General procedure A was followed with **IV-16** (301 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂ + 2 % ethanol as eluent to get rid of a slightly

blue by-product.

Yield: 43 % (212 mg), red solid.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 8.22 (d, 2 H, *J* = 7.8 Hz), 8.05 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.89 (d, 1 H, *J* = 1.6 Hz), 7.79 (dd, 1 H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.6 Hz), 7.65 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz), 7.41 (t, 2 H, *J* = 7.8 Hz), 7.38 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.27 (t, 2 H, *J* = 7.8 Hz), 7.14 (d, 2 H, *J* = 7.8 Hz), 3.82 (s, 3 H), 1.86 (s, 6 H, -CH₃).

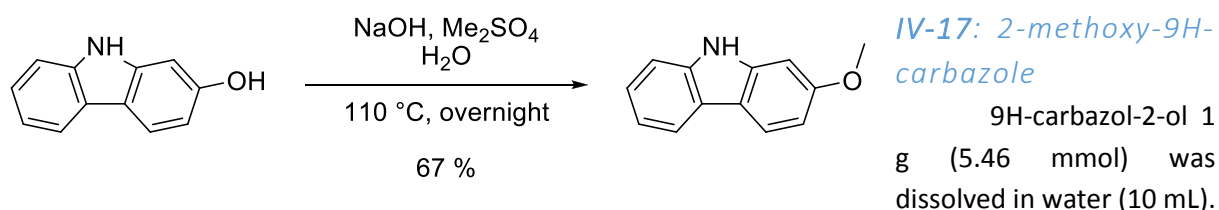
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 177.7, 175.5, 156.0, 147.0, 140.8 (2 C), 136.3, 130.3, 128.6, 126.7 (2 C), 123.3 (2 C), 122.9, 120.9 (2 C), 120.5 (2 C), 117.0, 114.7, 113.2, 112.4, 111.3, 110.7 (2 C), 100.7, 100.1, 56.6, 55.3, 25.7 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_2$: C 72.16, H 4.60, N 11.61; found: C 72.42, H 4.96, N 11.57.

Mass: Mass spectrum (ES $^-$, m/z): 481.2 (100 %), 482.2 (26 %) for $[\text{M}-\text{H}]^-$.

IR: (cm^{-1}): 2999, 2942, 2223, 1686, 1567, 1511, 1450, 1366, 1254, 1157, 858, 746.



With addition funnel, a solution of NaOH (460 mg, 11 mmol, 2eq) in 10 mL water and a second solution of dimethyl sulfate (1.2 mL, 11 mmol, 2 eq) were added over 10 minutes at the same time. The mixture was stirred at reflux overnight. After cooling down to room temperature, the precipitate was filtrated, washed with water and dried in vacuum to afford the product as a brown powder.

Yield: 66 % (720 mg), brown solid.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 11.11 (s, 1 H), 7.98 (d, 1 H, $J = 7.5$ Hz), 7.96 (d, 1 H, $J = 8.8$ Hz), 7.43 (d, 1 H, $J = 8.0$ Hz), 7.28 (t, 1 H, $J = 7.5$ Hz), 7.13 (t, 1 H, $J = 7.5$ Hz), 6.98 (d, 1 H, $J = 2.2$ Hz), 6.73 (dd, 1 H, $J = 8.8$ Hz, $J = 2.2$ Hz), 3.85 (s, 3 H).

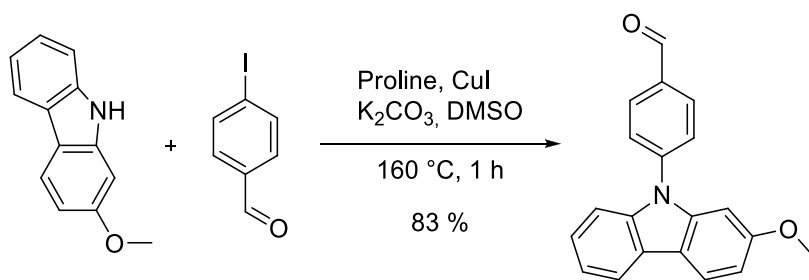
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 158.4, 141.0, 139.6, 124.0, 122.6, 120.8, 119.2, 118.4, 116.1, 110.5, 107.6, 94.4, 55.2.

Melting point: 198 °C.

Elemental analysis: calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}$: C 79.16, H 5.62, N 7.10; found: C 79.26, H 5.98, N 7.14.

Mass: Mass spectrum (APCI, m/z): 198.2 (100 %), 199.2 (11 %) for $[\text{M}+\text{H}]^+$.

IR: (cm^{-1}): 3388, 1606, 1459, 1305, 1223, 1192, 1160, 1030, 816, 726.



IV-18: 4-(2-methoxy-9H-carbazol-9-yl)benzaldehyde

Iodobenzaldehyde (140 mg, 0.6 mmol, 1.5 eq) CuI (8 mg, 0.1 eq), proline (9 mg, 0.1 eq) were dissolved in 1.5 mL of DMSO. **IV-17** (80 mg, 0.4 mmol) was then added with K₂CO₃ (112 mg, 1.1 eq). After stirring at room temperature for 30 minutes, under an argon flux, the mixture was heated at 160 °C for 1 hour. After cooling down, toluene (2 mL) was added and the precipitate was filtered off. The filtrate was evaporated and the crude was purified by column chromatography on silica gel with Petroleum ether/EtOAc 10/1 as eluent.

Yield: 83 % (101 mg), yellow solid.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 10.15 (s, 1 H), 8.21 (d, 2 H, *J* = 8.4 Hz), 8.16 (d, 1 H, *J* = 7.6 Hz), 8.15 (d, 1 H, *J* = 8.2 Hz), 7.93 (d, 2 H, *J* = 8.4 Hz), 7.46 (d, 1 H, *J* = 7.6 Hz), 7.37 (t, 1 H, *J* = 7.6 Hz), 7.30 (t, 1 H, *J* = 7.6 Hz), 6.93-6.98 (m, 2 H), 3.82 (s, 3 H).

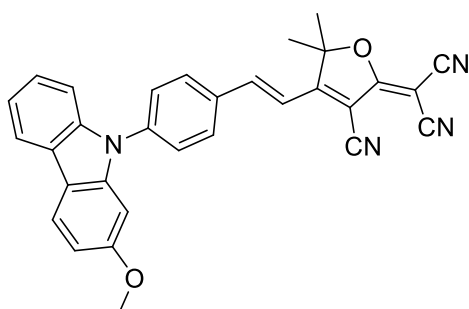
¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz) 192.2, 159.0, 142.1, 140.7, 139.5, 134.5, 131.4 (2 C), 126.6 (2 C), 125.0, 123.4, 121.5, 120.8, 119.7, 116.8, 109.6, 109.4, 93.9, 55.3.

Melting point: > 80 °C.

Elemental analysis: calcd for C₂₀H₁₅NO₂: C 79.72, H 5.02, N 4.65; found: C 80.00, H 5.21, N 4.90.

Mass: Mass spectrum (APCI, *m/z*): 302.1 (100 %), 303.1 (17 %) for [M+H]⁺.

IR: (cm⁻¹): 2926, 1695, 1596, 1457, 1436, 1199, 1161, 822.



MeO-Cbz-TCF: (E)-2-(3-cyano-4-(4-(2-methoxy-9H-carbazol-9-yl)styryl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene)malononitrile

General procedure A was followed with **IV-18** (301 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂ + 2 % ethanol as eluent to get rid of a slightly blue by-product.

Yield: 64 % (212 mg), red solid.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 8.23 (d, 2 H, *J* = 8.4 Hz), 8.15 (t, 2 H, *J* = 6.8 Hz), 8.08 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.84 (d, 2 H, *J* = 8.4 Hz), 7.46 (d, 1 H, *J* = 8.1 Hz), 7.38 (t, 1 H, *J* = 8.1 Hz), 7.37 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.29 (t, 1 H, *J* = 8.1 Hz), 6.97 (s, 1 H), 6.96 (d, 1 H, *J* = 8.1 Hz), 3.82 (s, 3 H), 1.86 (s, 6 H).

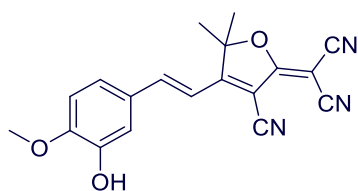
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 177.0, 175.0, 159.0, 146.1, 140.8, 140.0, 139.6, 133.0, 131.2 (2 C), 126.7 (2 C), 125.0, 123.4, 121.5, 120.7, 119.7, 116.7, 115.8, 112.6, 111.8, 110.8, 109.6, 109.4, 99.7, 99.5, 93.8, 55.3, 54.5, 25.0 (2C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_2$: C 72.16, H 4.60, N 11.61; found: C 72.12, H 4.58, N 11.69.

Mass: Mass spectrum (ES $^-$, m/z): 481.2 (100 %), 482.2 (24 %) for [M-H] $^-$.

IR: (cm^{-1}): 2832, 2228, 1698, 1597, 1458, 1437, 1197, 822.



Isovanilline-TCF: *(E)-2-(3-cyano-4-(3-hydroxy-4-methoxy styryl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene)malononitrile*

General procedure A was followed with isovanillin (152 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH_2Cl_2 to CH_2Cl_2 + 2 % ethanol as eluent to get rid of a slightly blue by-product.

Yield: 54 % (182 mg), purple solid.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 9.46 (s, 1 H, -OH), 7.85 (d, 1 H, J = 16.0 Hz), 7.37 (d, 1 H, J = 8.2 Hz), 7.35 (s, 1 H), 7.07 (d, 1 H, J = 8.2 Hz), 6.97 (d, 1 H, J = 16.2 Hz), 3.87 (s, 1 H), 1.78 (s, 6 H, - CH_3).

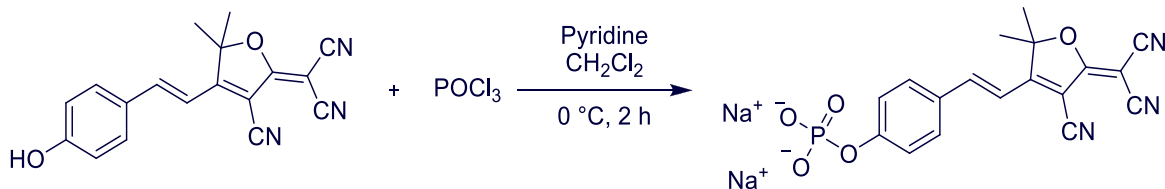
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz): 177.7, 176.2, 152.9, 148.7, 147.7, 128.0, 125.0, 114.7, 113.4, 113.1, 112.7, 112.6, 111.7, 99.7, 98.0, 56.4, 54.0, 25.8 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3$: C, 68.46; H, 4.54; N, 12.61;. Found: C, 67.90; H, 4.54; N, 12.45.

Mass: Mass spectrum (ES $^-$, m/z): 332.0 for [M-H] $^-$.

IR: (cm^{-1}): 3320, 2935, 2231, 2213, 1561, 1506, 1274, 1131.



Phos-pH-TCF : *sodium (E)-4-(2-(4-cyano-5-(dicyanomethylene)-2,2-dimethyl-2,5-dihydrofuran-3-yl)vinyl)phenyl phosphate*

At 0 °C and under Argon atmosphere, of PCl_3 (465 μL , 5 mmol) in CH_2Cl_2 (3 mL) was added dropwise to a solution of **pH-TCF** (151 mg, 0.5 mmol) in CH_2Cl_2 (3 mL) and pyridine (10 mL). The mixture

was stirred at 0 °C 2 hours and a water:acetone mixture (1:1 15 mL) was added and the solution was evaporated. The red wax was purified by column chromatography on reverse-phase C18 silica gel (elution: water + 2% acetonitrile). The product was then cation exchanged on Amberlite® and lyophilized to give the product as a brown solid.

Yield: 96 % (206 mg), brown solid.

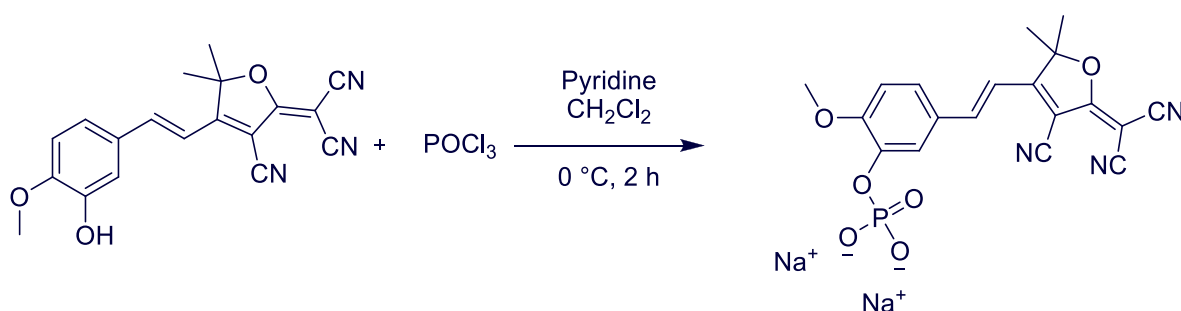
NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 7.92 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.79 (d, 2 H, *J* = 8.8 Hz), 7.27 (d, 2 H, *J* = 8.8 Hz), 7.06 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 1.78 (s, 6 H).

³¹P NMR (δ/ppm in DMSO-d₆ 200 MHz) -5.15.

Melting point: > 260 °C.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, *m/z*): 302.2 (100 %), 303.2 (26 %) for [M-OPO₃]⁻, 382.0 for [M]⁻.

IR: (cm⁻¹): 2229, 1562, 1524, 1508, 1249, 1167, 1104, 892.



Phos-Isovanilline-TCF : sodium (*E*)-5-(2-(4-cyano-5-(dicyanomethylene)-2,2-dimethyl-2,5-dihydrofuran-3-yl)vinyl)-2-methoxyphenyl phosphate

At 0 °C and under Argon atmosphere, of PCl₃ (465 μL, 5 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL) was added dropwise to a solution of **Isovanilline-TCF** (166 mg, 0.5 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL) and pyridine (10 mL). The mixture was stirred at 0 °C 2 hours and a water:acetone mixture (1:1 15 mL) was added and the solution was evaporated. The red wax was purified by column chromatography on reverse-phase C18 silica gel (elution: water + 2% acetonitrile). The product was then cation exchanged on Amberlite® and lyophilized to give the product as a red solid.

Yield: 98 % (235 mg), red solid.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 7.86 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.40-7.54 (m, 1H), 7.37 (d, 1 H, *J* = 8.6 Hz), 7.06 (d, 1 H, *J* = 8.6 Hz), 6.95 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 3.86 (s, 3 H), 1.78 (s, 6 H).

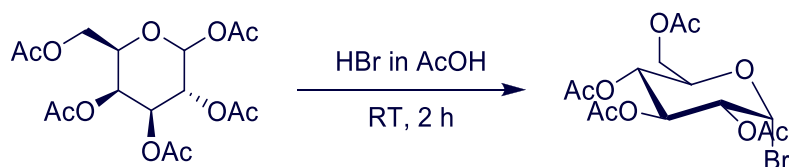
¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz): 177.2, 175.6, 152.3, 148.2, 147.1, 127.4, 124.4, 114.1, 112.8, 112.5, 112.1, 111.2, 99.1, 97.2, 55.8, 55.7, 53.3, 25.2 (2 C).

³¹P NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 200 MHz) -4.76.

Melting point: > 260 °C.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, m/z): 332.2 (100 %), 333.3 (24 %) for [M-OPO₃]⁻, 412.2 (20 %) for [M]⁻.

IR: (cm⁻¹): 2228, 1565, 1530, 1508, 1270, 1105, 912.



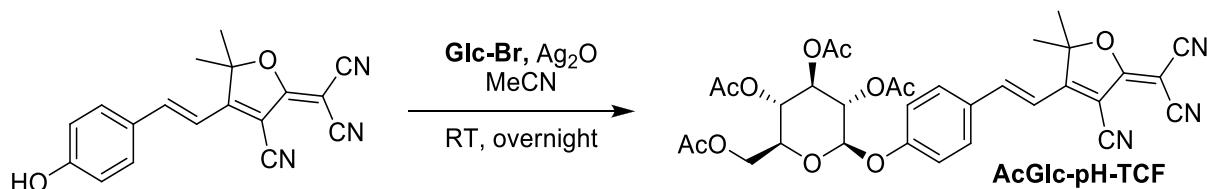
Glc-Br: (2*R*.3*R*.4*S*.5*R*.6*R*)-2-(acetoxymethyl)-6-bromotetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triyl triacetate

At 0 °C, acetic anhydride (1 mL) was added to HBr 30 % in Acetic acid (30 mL). Peracetylglucopyranose (15 g, 38 mmol) was then dissolved in the solution and the mixture was stirred at room temperature. The completion was followed by TLC (eluent 1:2 EtOAc: PE, revelation H₂SO₄ 5 % in EtOH). After 2 hours, the mixture was poured in cold water (800 mL) and the white precipitate was filtered, dissolved in CH₂Cl₂ and then washed with a saturated NaHCO₃ solution (2 x15 mL), brine (2 x 30 mL) and dried over Na₂SO₄. The solvents were removed under vacuum to afford the product as a white solid. Adapted from^[182].

Yield: 79 % (12.52 g), white crystal

NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 300 MHz): 6.61 (d, 1 H, *J* = 4.0 Hz), 5.56 (t, 1 H, *J* = 9.7 Hz), 5.16 (t, 1 H, *J* = 9.7 Hz), 4.84 (dd, 1 H, *J* = 4.0 Hz, *J* = 9.9 Hz), 4.34 (dd, 1 H, *J* = 4.2 Hz, *J* = 12.5 Hz), 4.29 (m, 1 H), 4.14 (dd, 1 H, *J* = 2.0 Hz, *J* = 12.5 Hz), 2.10 (s, 3 H), 2.09 (s, 3 H), 2.05 (s, 3 H), 2.04 (s, 3 H).

Analysis conform to the literature^[182].

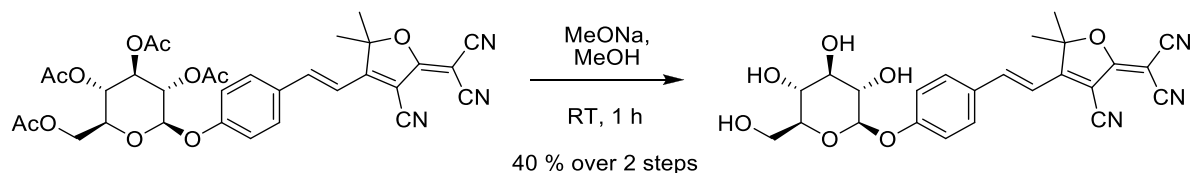


AcGlc-pH-TCF1: (*E*)-2-(3-cyano-4-(4-*O*-pentacetylglucopyrano)-5,5-dimethylfuran-2(5*H*)-ylidene) malononitrile

pH-TCF (100 mg, 0.33 mmol) was dissolved under argon atmosphere in anhydrous acetonitrile (12 mL). At 0 °C, **Glc-Br** (204 mg, 0.495 mmol, 1.5 eq) and Ag₂O (76 mg, 1 eq) were added and the solution stirred at room temperature overnight. The mixture was filtered over a plug of celite®, the solvent were evaporated under vacuum ad the crude oil purified over a silica gel chromatography with

CH₂Cl₂ + 1 % of MeOH as eluent. The product was not really pure but was used in the next step without further purification.

Yield: 99 % (217 mg), orange oil



Glc-pH-TCF : (E)-2-(3-cyano-4-(4-β-glucopyrano)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene) malononitrile

The previous crude was dissolved in MeOH (30 mL). NaH (70 mg) in MeOH (5 mL) was then slowly added and the mixture was allowed to react 1 hour at room temperature. The solution was quenched with acetic acid (100 μL) and the mixture was evaporated. The crude was purified by a silica gel chromatography with CH₂Cl₂ + 10 % of MeOH as solvent to afford the pure product after evaporation.

Yield: 42 % (42 mg), red powder.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 7.94 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.91 (d, 2 H, *J* = 8.4 Hz), 7.16 (d, 2 H, *J* = 8.4 Hz), 7.13 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 5.41 (d, 1 H, *J* = 4.2 Hz), 5.15 (d, 1 H, *J* = 4.2 Hz), 5.08 (d, 1 H, *J* = 4.2 Hz), 5.04 (d, 1 H, *J* = 7.4 Hz), 4.60 (t, 1 H, *J* = 4.2 Hz), 3.70 (dd, 1 H, *J* = 5.4 Hz, *J* = 11.2 Hz), 3.48 (quint, 1 H, *J* = 6.8 Hz), 3.40 (m, 1 H), 3.29 (m, 1 H), 3.19 (m, 1 H), 1.80 (s, 6 H).

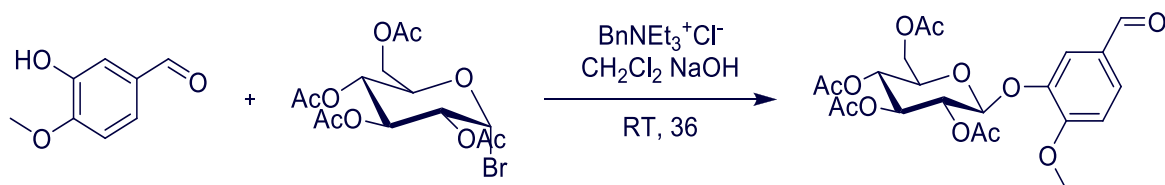
¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz): 177.2, 175.5, 160.7, 147.3, 131.5 (2 C), 128.1, 116.8 (2 C), 113.3, 112.7, 111.9, 111.0, 99.7, 99.2, 97.9, 77.1, 76.5, 73.1, 69.5, 60.5, 53.7, 25.1 (2 C).

Melting point: 222 °C.

Elemental analysis: Calcd for C₂₄H₂₃N₃O₇: C 61.93, H 4.98, N 9.03. Found: C 62.06, H, 5.28, 8.90.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, *m/z*): 464.0 for [M-H]⁻, 302.2 for [pH-TCF]⁻.

IR: (cm⁻¹): 3370, 3286, 2223, 1558, 1535, 1244, 1070.



AcGlc-Isovanillin: 3-β-peracetylglucopyranoso-4-methoxybenzaldehyde

BnEt₃N⁺Cl⁻ (545 mg, 2.4 mmol, 0.25 eq) was dissolved in 1/1 CHCl₃/H₂O (10 mL) and isovanilline (1.5 g, 10 mmol) was added followed by a solution of NaOH (450 mg, 11 mmol, 1.1 eq) in 10 mL of water. The mixture was vigorously stirred 10 min à 40 °C before the addition of **Glc-Br** (4.1 g, 1 mmol, 1 eq) in Chloroform (10 mL). The solution was allowed to react for 24 hrs at 40 °C. After return to room temperature, the two layers were separated and the organic one was washed with NaOH 1M (3 x 20 mL), brine (2 x 15 mL) and dried over Na₂SO₄. After evaporation, the crude oil was crystallized from ethanol to afford the pure product as white needles.

Yield: 23 % (1.1 g), white needles

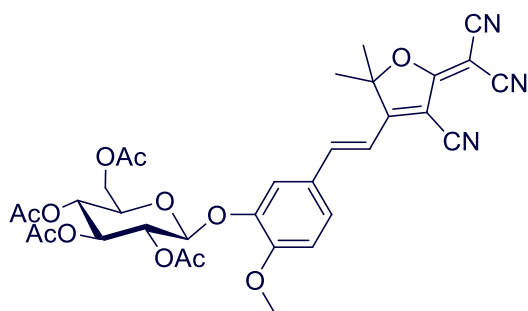
NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 9.86 (s, 1 H), 7.72 (dd, 1 H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 2.2 Hz), 7.61 (d, 1 H, *J* = 2.2 Hz), 7.26 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz), 5.49 (d, 1 H, *J* = 8.1 Hz), 5.41 (t, 1 H, *J* = 9.7 Hz), 5.09 (dd, 1 H, *J* = 8.1 Hz, *J* = 9.7 Hz), 4.24-4.27 (m, 1 H), 4.17-4.24 (m, 1 H), 4.07 (d, 1 H, *J* = 12.1 Hz), 3.36 (s, 3 H), 2.05 (s, 3 H), 2.03 (s, 3 H), 2.02 (s, 3 H), 1.98 (s, 3 H).

¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz) 191.1, 170.0, 169.5, 169.3, 168.9, 155.0, 146.0, 129.5, 128.8, 116.0, 112.4, 98.5, 71.7, 70.9, 70.6, 68.1, 61.8, 56.2, 21.0, 20.4, 20.36, 20.31, 20.29.

Melting point: 134 °C.

Elemental analysis: Calcd for C₂₂H₂₆O₁₂: C 54.77, H 5.43; Found: C 54.89, H 5.28.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, *m/z*): 482.1 (100 %), 483.2 (31 %) for [M+H]⁺.



AcGlc-Isoval-TCF: (E)-2-(3-cyano-4-(3-β-peracetylglucopyranoso-4-methoxystyryl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene) malononitrile

General procedure A was followed with **AcGlc-Isovanillin** (482 mg). The crude was recrystallized in Ethanol.

Yield: 75 % (502 mg), red solid.

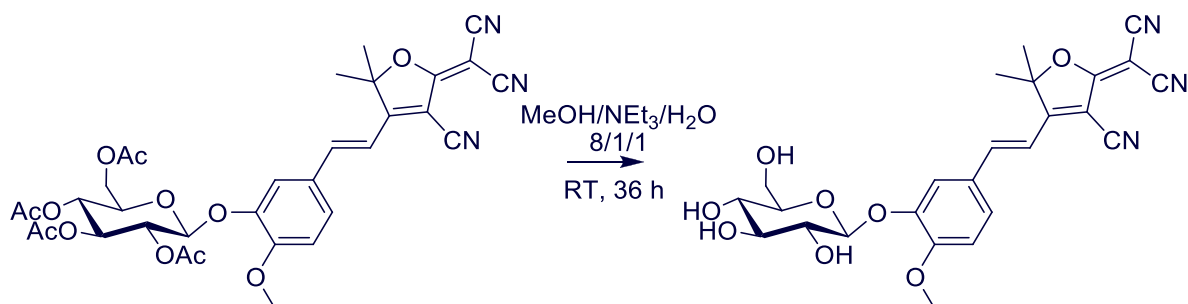
NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 7.89 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.70 (dd, 1 H, *J* = 8.8 Hz, *J* = 2.0 Hz), 7.61 (d, 1 H, *J* = 2.0 Hz), 7.21 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz), 7.07 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 5.50 (d, 1 H, *J* = 8.1 Hz), 5.39 (d, 1 H, *J* = 9.5 Hz), 5.08 (t, 1 H, *J* = 8.1 Hz), 5.03 (t, 1 H, *J* = 9.6 Hz), 4.19-4.25 (m, 2 H), 4.09 (d, 1 H, *J* = 9.6 Hz), 3.88 (s, 3 H), 2.05 (s, 3 H), 2.01 (s, 3 H), 1.98 (s, 3 H), 1.96 (s, 3 H), 1.81 (s, 6 H).

¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz) 177.1, 175.2, 169.9, 169.5, 169.2, 169.0, 153.9, 147.0, 145.5, 128.1, 127.1, 118.1, 113.3, 113.1, 112.7, 111.9, 110.9, 99.1, 98.5, 98.2, 71.8, 70.8, 70.6, 67.9, 61.4, 57.2, 53.9, 25.2 (2 C), 20.4, 20.3 (2 C), 20.2.

Melting point: 227 °C.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, *m/z*): 663.1 (100 %); 664.1 (17 %) for [M-H]⁻.

IR: (cm⁻¹): 2828, 2223, 1744, 1698, 1597, 1458, 1435, 1208, 1038, 822.



Glc-Isoval-TCF: (E)-2-(3-cyano-4-(3- β -glucopyranoso-4-methoxystyryl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene) malononitrile

AcGlc-Isoval-TCF (166 mg, 0.25 mmol) was dissolved in a mixture MeOH/NEt₃/H₂O (8/1/1, 40 mL) and stirred at room temperature. After completion of the reaction monitored with TLC (CH₂Cl₂ with 5 % MeOH), the solvents were removed under vacuum. The red powder was purified by column chromatography on silica gel (CH₂Cl₂ + 5 % MeOH) to afford the pure product.

Yield: 67 % (82 mg) red powder.

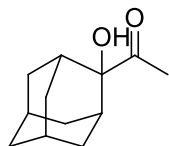
NMR ¹H NMR (δ /ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 7.91 (d, 1 H, J = 16.4 Hz), 7.63 (d, 1 H, J = 2.0 Hz), 7.54 (dd, 1 H, J = 8.8 Hz, J = 2.0 Hz), 7.15 (d, 1 H, J = 28.4 Hz), 7.00 (d, 1 H, J = 16.4 Hz), 5.05 (d, 1 H, J = 7.7 Hz), 3.88 (s, 3 H), 3.69 (dd, 1 H, J = 11.8 Hz, J = 2.0 Hz), 3.48 (dd, 1 H, J = 11.8 Hz, J = 6.0 Hz), 3.39-3.43 (m, 1 H), 3.30 (d, 2 H, J = 8.4 Hz), 3.19 (t, 1 H, J = 9.0 Hz), 1.79 (s, 3 H), 1.77 (s, 3 H).

¹³C NMR (δ /ppm in DMSO-d₆, 125 MHz) 177.3, 175.4, 153.1, 147.7, 146.7, 127.0, 126.3, 114.8, 112.9, 112.8, 112.4, 112.0, 111.1, 100.0, 99.1, 97.1, 77.1, 77.0, 73.1, 69.6, 60.5, 55.9, 53.6, 25.1 (2 C).

Melting point: 158 °C.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, m/z): 494.4 (100 %), 495.2 (32 %) for [M-H]⁻.

IR: (cm⁻¹): 3388, 2828, 2223, 1698, 1597, 1509, 1458, 1437, 1264, 1199, 1036, 822.



V-2a: 1-(1-adamantyl)ethanone

General procedure C was followed with adamantanone (4.5 g). The product was used in the next step without further purification.

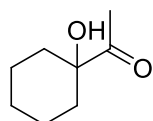
Yield: 52 % (2.9 g), white solid.

NMR ¹H NMR (δ /ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 2.22 (s, 3 H), 2.14-2.19 (m, 4 H), 1.73-1.80 (m, 5 H), 1.62-1.73 (m, 5 H), 1.61 (bs, 1 H).

Melting point: 82 °C.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, m/z): 193.0 for [M-H]⁻.

IR: (cm⁻¹): 3317, 2911, 2854, 1700, 1596, 1575.



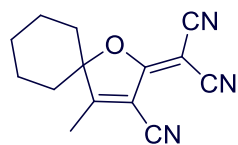
V-2b: 1-(1-hydroxycyclohexyl)ethanone

General procedure C was followed with cyclohexanone (3 g). The yellow oil was distilled under vacuum (0.4 mbar, 50 °C) to afford the pure product as a colorless liquid.

Yield: 63 % (3.2 g), colorless liquid.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 300 MHz): 3.57 (s, 1 H), 2.26 (s, 3 H), 1.45-1.76 (m, 10 H).

Mass: Mass spectrum (ES⁻, m/z): 142.1 for [M-H]⁻.



V-3b: 2-(3-cyano-4-methyl-1-oxaspiro[4,5]dec-3-en-2-ylidene) malononitrile

General procedure B was followed with 3.2 g of **V-2b** (22.7 mmol) and malononitrile (1.5 g, 45 mmol).

Yield: 64 % (3.49 g), white solid.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 2.36 (s, 3 H), 1.86 (t, 2 H, *J* = 13.0 Hz), 1.67 (m, 5 H), 1.50 (q, 2 H, *J* = 13.0 Hz), 1.30 (q, 1 H, *J* = 13.0 Hz).

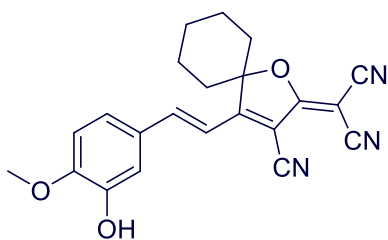
¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz) 186.0, 177.9, 112.7, 112.2, 110.6, 104.3, 103.0, 55.4, 31.9 (2 C), 23.8, 21.8 (2 C), 15.1.

Melting point: 236 °C.

Elemental analysis: Calcd for C₁₄H₁₃N₃O: C 70.28, H 5.48, N 17.56 Found: C 70.49, H 5.12, N 17.67.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, m/z): 240.1 (100 %), 241.1 (23 %) for [M+H]⁺.

IR: (cm⁻¹): 2921, 2226, 1702, 1582, 1458, 1437, 1197, 911, 823.



V-4b : (E)-2-(3-cyano-4-(3-hydroxy-4-methoxystyryl)-1-oxaspiro[4,5]dec-3-en-2-ylidene)malononitrile

General procedure A was followed with **V-3b** (239 mg) and **isovanilline** (152 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂ + 2 % ethanol as eluent to get rid of a slightly blue by-product.

Yield: 64 % (120 mg), red solid.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 9.44 (s, 1 H), 7.95 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.36-7.39 (m, 2 H), 7.09 (d, 1 H, *J* = 8.8 Hz), 7.00 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 3.89 (s, 3 H), 2.13 (bt, 2 H, *J* = 9.0 Hz), 1.85 (d, 2 H, *J* = 13 Hz), 1.72-1.80 (m, 3 H), 1.48-1.60 (m, 3 H).

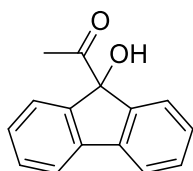
¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz) 177.3, 175.2, 152.3, 147.8, 147.0, 127.4, 124.3, 114.2, 112.9, 112.7, 112.1, 111.5, 100.5 (2 C), 96.7, 55.8, 53.5, 32.9 (2 C), 22.9, 21.5 (2 C).

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: Calcd for C₂₃H₁₉N₃O₃: C 70.76, H 5.13, N 11.25. Found: C 70.88, 5.08, N 11.22.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, *m/z*): 372.1 (100 %), 373.2 (13 %) for [M-H]⁻.

IR: (cm⁻¹): 3317, 2937, 2228, 1692, 1575, 1458, 1437, 1267, 1197, 1131, 810.



V-2c: 1-(9-hydroxy-9H-fluoren-9-yl)ethanone

General procedure C was followed from fluorenone (5.4 g). The yellow solid was dissolved in a minimum amount of EtOAc and precipitated from Petroleum Ether. The slightly yellow powder was filtered off and washed with petroleum ether.

Yield: 72 % (4.9 g), slightly yellow powder.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 7.77 (d, 2 H, *J* = 8.0 Hz), 7.47-7.50 (m, 2 H), 7.35-7.37 (m, 4 H), 5.14 (s, 1 H), 1.69 (s, 3 H).

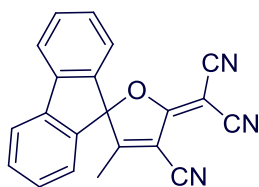
¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz). 207.1, 144.5 (2 C), 141.6 (2 C), 130.0 (2 C), 128.6 (2 C), 124.0 (2 C), 120.7 (2 C), 88.4, 22.5.

Melting point: > 107 °C.

Elemental analysis: Calcd for C₁₅H₁₂O₂: C, 80.34; H, 5.39. Found: C, 79.87; H, 5.45.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, *m/z*): 223.1 (100 %), 224.1 (15 %) for [M-H]⁻.

IR: (cm⁻¹): 3442, 2970, 2900, 1702, 1449, 1177, 1063, 766, 751.



V-3c: 2-(4'-cyano-3'-methyl-5'H-spiro[fluorene-9,2'-furan]-5'-ylidene)malononitrile

General procedure B was followed with 4.9 g of **V-3c** (22 mmol) and malononitrile (1.5 g, 45 mmol).

Yield: 55 % (3.8 g), white solid.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 7.97 (d, 2 H, $J = 7.24$ Hz), 7.65 (d, 2 H, $J = 7.24$ Hz), 7.61 (t, 2 H, $J = 7.24$ Hz), 7.43 (t, 2 H, $J = 7.24$ Hz), 1.86 (s, 3 H).

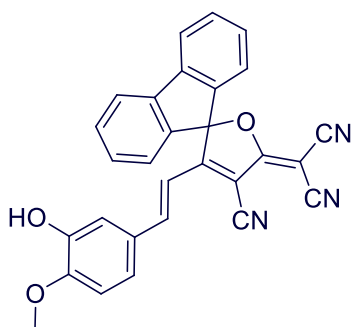
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 179.0, 178.0, 141.4 (2 C), 137.5 (2C), 132.9 (2 C), 129.9 (2 C), 126.1 (2 C), 122.2 (2 C), 112.5, 111.9, 110.5, 108.7, 105.0, 57.8, 13.9.

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}$: C, 78.49; H, 3.45; N, 13.08. Found: C, 78.53; H, 3.59; N, 13.54.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 323.1 (100 %), 324.1 (27 %) for $[\text{M}+\text{H}]^+$.

IR: (cm^{-1}): 2987, 2900, 1697, 1596, 1451, 1158, 1057, 765, 733.



V-4c: (E)-2-(4'-cyano-3'-(3-hydroxy-4-methoxystyryl)-5'H-spiro[fluorene-9,2'-furan]-5'-ylidene)malononitrile

General procedure A was followed with **V-3c** (321 mg) and **isovanilline** (152 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH_2Cl_2 to $\text{CH}_2\text{Cl}_2 + 2\%$ ethanol as eluent to get rid of a slightly blue by-product.

Yield: 51 % (231 mg), red solid.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 9.42 (s, 1 H), 7.05 (d, 2 H, $J = 7.2$ Hz), 7.67 (d, 2 H, $J = 7.2$ Hz), 7.63 (t, 2 H, $J = 7.2$ Hz), 7.41 (t, 2 H, $J = 7.2$ Hz), 6.86 (d, 1 H, $J = 8.6$ Hz), 6.78 (s, 1 H), 6.77 (d, 1 H, $J = 15.8$ Hz), 6.68 (d, 1 H, $J = 8.6$ Hz), 6.42 (d, 1 H, $J = 15.8$ Hz), 3.76 (s, 3 H).

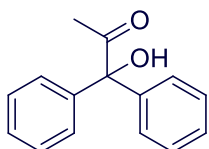
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 178.7, 168.7, 153.0, 147.7, 147.6, 140.7 (2 C), 140.3 (2 C), 132.9, 130.1 (2 C), 126.9, 126.2 (2 C), 124.1 (2 C), 122.4, 114.3, 113.0, 112.8 (2 C), 112.6, 112.4, 102.7, 102.0, 56.5, 56.4.

Melting point: > 260 °C.

Elemental analysis: Calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_3$: C, 76.47; H, 3.76; N, 9.23. Found: C, 75.75; H, 3.79; N, 9.46.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 454.1 (100 %), 455.1 (20 %) for $[\text{M}-\text{H}]^-$.

IR: (cm^{-1}): 2971, 2900, 2223, 1560, 1532, 1509, 1269, 1123, 768, 736.



V-2d: 1-hydroxy-1,1-diphenylpropan-2-one

General procedure C was followed benzophenone (5.3 g). The product was used in the next step without further purification.

Yield: 70 % (4.8 g), pale yellow oil.

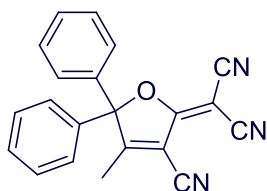
NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 300 MHz): 7.35-7.41 (m, 10 H), 4.84 (s, 1 H), 2.29 (s, 3 H).

Melting point: 49 °C.

Elemental analysis: Calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_2$: C 79.62, H 6.24. Found: C 79.90, 6.12.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 225.1 (100 %), 226.1 (21 %) for $[\text{M}-\text{H}]^-$.

IR: (cm^{-1}): 3338, 2986, 2938, 1684, 1583, 1479, 1384, 1262, 1067, 996, 749.



V-3d: 2-(3-cyano-4-methyl-5,5-diphenylfuran-2(5H)-ylidene) malononitrile

General procedure B was followed with **V-2d** (22 mmol) and malononitrile (1.5 g, 50 mmol). The 1st precipitate was an impurity and was filtered off. The filtrate was evaporated to give a pale red solid that was washed with petroleum ether.

Yield: 26 % (450 mg), pale red solid.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 7.50-7.58 (m, 5 H), 7.35 (m, 1 H), 7.30-7.34 (m, 3 H), 7.27 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz), 2.41 (s, 3 H).

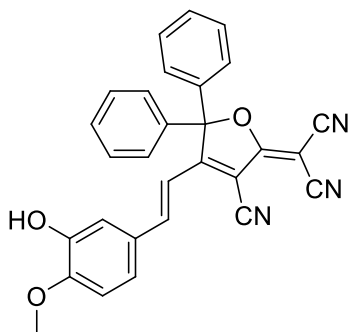
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 180.2, 176.3, 150.9, 141.8, 134.8 (2 C), 130.2 (2 C), 129.2 (2 C), 128.2, 127.6 (2 C), 126.7, 111.6, 110.9, 109.6, 106.4, 105.3, 57.4, 15.9.

Melting point: 225 °C.

Elemental analysis: Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$: C 78.00, H 4.05, N 13.00. Found: C 78.25, H 3.90, N 13.09.

Mass: Mass spectrum (ES^+ , m/z): 324.1 (100 %), 325.1 (22 %) for $[\text{M}+\text{H}]^+$.

IR: (cm^{-1}): 2987, 2900, 2223, 1591, 1360, 1157, 1076, 760, 693.



V-4d: *(E)-2-(3-cyano-4-(3-hydroxy-4-methoxystyryl)-5,5-diphenylfuran-2(5H)-ylidene)malononitrile*

General procedure A was followed with **V-3d** (323 mg) and **isovanilline** (152 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂ + 2 % ethanol as eluent to get rid of a slightly blue by-product.

Yield: 59 % (272 mg), red solid.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 7.51-7.55 (m, 6 H), 7.51 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.44-7.46 (m, 4 H), 7.16 (d, 1 H, *J* = 1.8 Hz), 7.12 (dd, 1 H, *J* = 8.4 Hz, *J* = 1.8 Hz), 6.99 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 6.98 (d, 1 H, *J* = 8.4 Hz), 3.84 (s, 3 H).

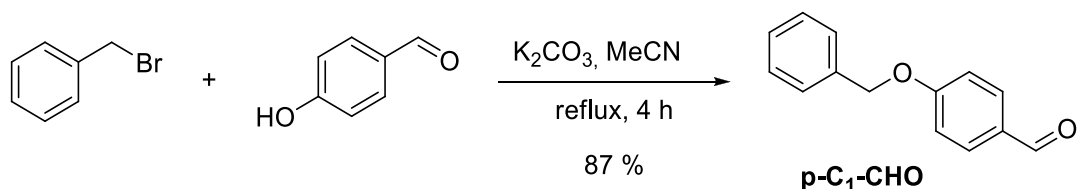
¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz) 176.4, 171.0, 152.7, 149.1, 147.1 (2 C), 135.8, 130.1 (2 C), 129.2, 129.1 (4 C), 128.2 (4 C), 127.6, 126.8, 124.6, 113.9, 113.8, 112.3, 112.2, 111.5, 111.1, 103.3, 98.7, 55.8, 55.6.

Melting point: 246 °C.

Elemental analysis: Calcd for C₂₉H₁₉N₃O₃: C 76.14, H 4.19, N 9.19. Found: C 76.55, H 4.28, N 9.03.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, *m/z*): 457.1 (100 %), 458.2 (29 %) for [M-H]⁻.

IR: (cm⁻¹): 2987, 2900, 2223, 1591, 1265, 1075, 760, 697.



p-C₁-CHO: *4-(benzyloxy)benzaldehyde*

Benzylbromide (767 mg, 4.5 mmol), and 4-hydroxybenzaldehyde (626, 1.1 eq), were dissolved in acetonitrile (20 mL). K₂CO₃ (1.2 g, 9 mmol, 2 eq) was added and the mixture was refluxed for 4 hours. The solid was then filtered off and the filtrate was evaporated. The crude was purified with a silica gel column chromatography with 1/4 EtOAc/Petroleum ether.

Yield: 87 % (831 mg), white solid.

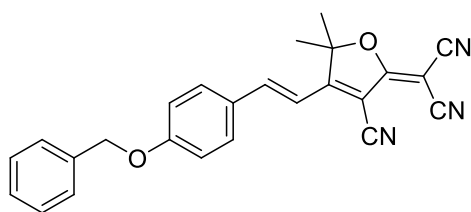
NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 9.88 (s, 1 H), 7.89 (d, 2 H, *J* = 8.8 Hz), 7.48 (d, 2 H, *J* = 7.4 Hz), 7.41 (t, 2 H, *J* = 7.4 Hz), 7.36 (t, 1 H, *J* = 7.4 Hz), 7.21 (d, 2 H, *J* = 8.8 Hz), 5.24 (s, 2 H).

¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz) 191.2, 163.2, 136.2, 131.7 (2 C), 129.7, 128.4 (2 C), 128.0, 127.8 (2 C), 115.2 (2 C), 69.6.

Melting point: 196 °C.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, m/z): 213.1 (100 %), 214.1 (22 %) for [M+H]⁺.

IR: (cm⁻¹): 2963, 2916, 1685, 1594, 1573, 1508, 1257, 1160, 1056.



p-C₁-TCF: (E)-2-(4-(4-(benzyloxy)styryl)-3-cyano-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene)malononitrile

General procedure A was followed with **p-C₁-CHO** (212 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂ + 2 % ethanol as eluent to get rid of a slightly blue by-product.

Yield: 61 % (240 mg), red solid.

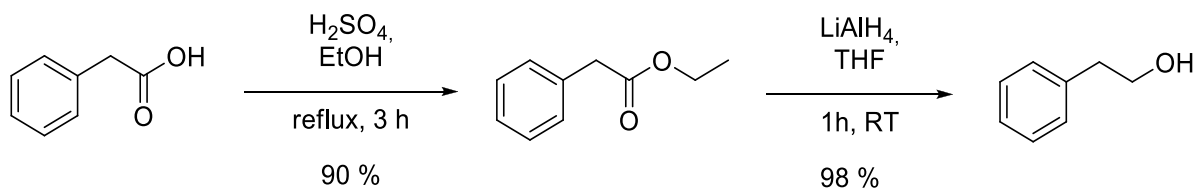
NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 7.94 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.93 (d, 2 H, *J* = 8.8 Hz), 7.48 (d, 2 H, *J* = 7.2 Hz), 7.42 (t, 2 H, *J* = 7.2 Hz), 7.36 (t, 1 H, *J* = 7.2 Hz), 7.18 (d, 2 H, *J* = 8.8 Hz), 7.11 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 5.24 (s, 2 H), 1.80 (s, 6 H).

¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz) 177.2, 175.6, 162.0, 147.5, 136.3 (2 C), 131.8 (2 C), 128.4, 128.0 (2 C), 127.8, 127.3, 115.7 (2 C), 112.9, 112.8, 111.9, 111.0, 99.1, 97.5, 69.6, 53.6, 25.2 (2 C).

Melting point: 226 °C.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, m/z): 392.1 (100 %), 393.1 (26 %) for [M-H]⁻.

IR: (cm⁻¹): 2987, 2902, 2223, 1557, 1527, 1378, 1247, 1163.



V-5a: 2-phenylethanol

Phenylacetic acid (5 g, 36.8 mmol) was dissolved in anhydrous ethanol (120 mL). Sulfuric acid (6 mL) was added and the mixture was refluxed for 2 hours. Ethanol was evaporated, water (25 mL) was added and the product was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 50 mL). After evaporation, the ester (3 g, 18.3 mmol) was dissolved in anhydrous THF (50 mL). A 0 °C, LiAlH₄ (700 mg, 18.3 mmol) was carefully added and the mixture was stirred 1 hour at 0 °C and then quenched with 0.7 mL of water, 1.4 mL of NaOH 1M and 2.1 mL of water. After 10 minutes, the solution was filtered and the solid was washed with NaOH 1M (3 x 50 mL). The aqueous phase was acidified, extracted with EtOAc (3 x 100 mL), The

organic phases were combined, washed with brine (2 x 50 mL) and dried over Na₂SO₄. After filtration and evaporation of the solvent, the product was used in the next step without further purification.

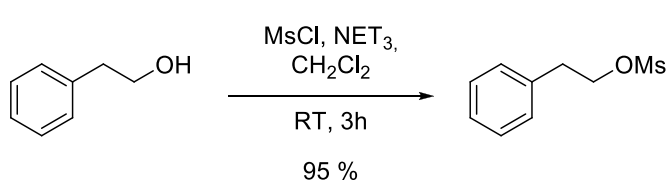
Yield: 88 % (2.02 g), orange liquid.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in CDCl₃, 500 MHz): 7.38 (t, 2 H, *J* = 7.0 Hz), 7.30 (t, 1 H, *J* = 7.0 Hz), 7.29 (d, 2 H, *J* = 7.0 Hz), 3.89 (t, 2 H, *J* = 6.6 Hz), 2.91 (t, 2 H, *J* = 6.6 Hz).

¹³C NMR (125 MHz, δ/ppm in CDCl₃) 138.6, 129.1 (2 C), 128.6 (2 C), 126.5, 63.7, 39.1.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, *m/z*): 121.0 for [M-H]⁻.

IR: (cm⁻¹): 3343, 2942, 2874, 1504, 1447, 1042, 744.



V-6a: phenethyl methane sulfonate

V-5a (312 mg, 2.56 mmol) was dissolved in CH₂Cl₂ (6 mL) and NET₃ (380 μL, 1.1 eq). At 0 °C, mesylchloride (240 μL, 3.07 mmol, 1.2 eq) was added and the solution

was stirred for 1.5 hour. Water (20 mL) was then added and the layer separated. The aqueous phase was extracted with 2 x 15 mL of CH₂Cl₂. The organic phases were combined, washed with brine (2 x 15 mL), dried over Na₂SO₄. The solid was filtered off and the solvent evaporated to give the pure product.

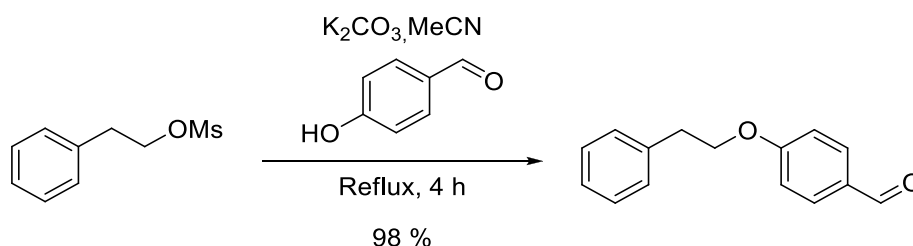
Yield: 95 % (450 mg), yellow oil.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in CDCl₃, 500 MHz): 7.36-7.40, (m, 2 H), 7.27-7.32 (m, 3 H), 4.47 (t, 2 H, *J* = 7.0 Hz), 3.10 (t, 2 H, *J* = 7.0 Hz), 2.88 (s, 3 H).

¹³C NMR (125 MHz, δ/ppm in CDCl₃) 136.4, 129.1 (2 C), 128.8 (2 C), 127.1, 70.5, 37.3, 35.7.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, *m/z*): 200.0 (100 %), 201.0 (5 %) for [M+H]⁺.

IR: (cm⁻¹): 3025, 1452, 1348, 1168, 952, 699.



p-C₂-CHO: 4-phenethoxybenzaldehyde

4-hydroxybenzaldehyde (380 mg, 1.8 mmol, 1.1 eq) and **V-6a** (309 mg, 1.6 mmol) were dissolved in 15 mL of acetonitrile. K_2CO_3 (428 mg, 2 eq) was added and the mixture was refluxed for 4 hours. The precipitate was filtered off and the filtrate was evaporated. The crude oil was purified over silica gel chromatography with EtOAc/Petroleum ether 1/4.

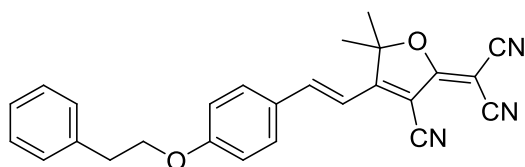
Yield: 69 % (243 mg), colorless oil

NMR 1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 9.72 (s, 1 H), 7.66 (d, 2 H, $J = 8.8$ Hz), 7.16-7.19 (m, 2 H), 7.09-7.14 (m, 3 H), 6.83 (d, 2 H, $J = 8.8$ Hz), 4.10 (t, 2 H, $J = 7.0$ Hz), 2.97 (t, 2 H, $J = 7.0$ Hz).

^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 190.8, 163.9, 137.7, 132.0 (2 C), 130.0 (2 C), 129.0, 128.6 (2 C), 126.8 (2 C), 114.9, 69.0, 35.6.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 226.1 for $[M]^+$.

IR: (cm^{-1}): 2932, 2733, 1684, 1597, 1508, 1249, 1157, 829.



p-C₂-TCF: (E)-2-(3-cyano-5,5-dimethyl-4-(4-phenethoxystyryl)furan-2(5H)-ylidene)malononitrile

General procedure A was followed with **p-C₂-CHO** (224 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH_2Cl_2 to $CH_2Cl_2 + 2\%$ ethanol as eluent to get rid of a slightly blue by-product.

Yield: 62 % (245 mg), red solid.

NMR 1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 7.92 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz), 7.90 (d, 2 H, $J = 8.4$ Hz), 7.31-7.36 (m, 4 H), 7.24 (t, 1 H, $J = 7.8$ Hz), 7.08-7.12 (m, 3 H), 4.32 (t, 2 H, $J = 6.8$ Hz), 3.08 (t, 2 H, $J = 6.8$ Hz), 1.79 (s, 6 H).

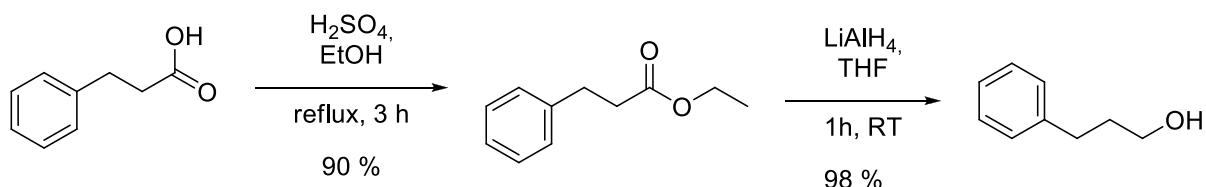
^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 177.2, 175.6, 162.1, 147.6, 138.0, 131.8 (2 C), 128.9 (2 C), 128.3 (2 C), 127.1, 126.3, 115.4 (2 C), 112.8, 112.7, 112.0, 111.1, 99.1, 97.4, 68.6, 53.5, 34.7, 25.2.

Melting point: 210 °C.

Elemental analysis: Calcd for $C_{29}H_{17}N_3O_3$: C, 76.47; H, 3.76; N, 9.23. Found: C, 75.75; H, 3.79; N, 9.46.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 406.2 (100 %), 407.2 (28 %) for $[M-H]^-$.

IR: (cm^{-1}): 2987, 2906, 2218, 1558, 1529, 1309, 1249, 1164.



V-5b: 3-phenylpropanol

Phenylpropionic acid (10 g, 66.6 mmol) was dissolved in anhydrous ethanol (120 mL). Sulfuric acid (6 mL) was added and the mixture was refluxed for 2 hours. Ethanol was evaporated, water (25 mL) was added and the product was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 50 mL). After evaporation, the ester (4 g, 25 mmol) was dissolved in anhydrous THF (50 mL). At 0 °C, LiAlH_4 (1.5 g, 40 mmol) was carefully added and the mixture was stirred 1 hour at 0 °C and then quenched with 0.7 mL of water, 1.4 mL of NaOH 1M and 2.1 mL of water. After 10 minutes, the solution was filtered and the solid was washed with NaOH 1M (3 x 50 mL). The aqueous phase was acidified, extracted with EtOAc (3 x 100 mL), The organic phases were combined, washed with brine (2 x 50 mL) and dried over Na_2SO_4 . After filtration and evaporation of the solvent, the product was used in the next step without further purification.

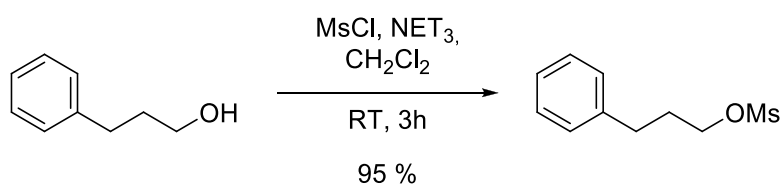
Yield: 92 % (3.01 g), colorless liquid.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in CDCl_3 , 500 MHz): 7.29 (t, 2 H, $J = 8.1$ Hz), 7.18-7.21 (m, 3 H), 3.69 (t, 2 H, $J = 6.6$ Hz), 2.71 (t, 2 H, $J = 6.6$ Hz), 1.91 (quint, 2 H, $J = 6.6$ Hz).

^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO-d_6 , 125 MHz) 141.8, 128.5 (2 C), 128.4 (2 C), 125.9, 62.3, 34.2, 32.1.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 135.0 for $[\text{M-H}]^-$.

IR: (cm^{-1}): 3338, 2937, 2858, 1493, 1455, 1029, 697.



V-6b: 3-phenylpropyl methanesulfonate

V-6a (2.5 g, 18.4 mmol) was dissolved in CH_2Cl_2 (30 mL) and NEt_3 (3 mL, 1.1 eq). At 0 °C,

mesylchloride (1.7 mL, 20 mmol, 1.2 eq) was added and the solution was stirred for 1.5 hour. Water (20 mL) was then added and the layer separated. The aqueous phase was extracted with 2 x 15 mL of CH_2Cl_2 . The organic phases were combined, washed with brine (2 x 15 mL), dried over Na_2SO_4 . The solid was filtered off and the solvent evaporated to give the pure product.

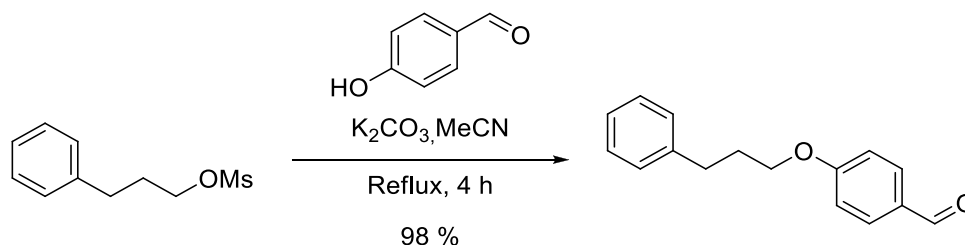
Yield: 95 % (3.74 g), orange oil.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in CDCl_3 , 500 MHz): 7.31 (t, 2 H, $J = 7.4$ Hz), 7.18-7.24 (m, 3 H), 4.23 (t, 2 H, $J = 6.4$ Hz), 2.99 (s, 3 H), 2.76 (t, 2 H, $J = 6.4$ Hz), 2.08 (quint, 2 H, $J = 6.4$ Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, δ /ppm in CDCl_3) 140.3, 128.6 (2 C), 128.5 (2 C), 126.3, 69.1, 37.4, 31.5, 30.6.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, m/z): 214.1 (100 %), 215.1 (12 %) for [M+H]⁺.

IR: (cm⁻¹): 3030, 2942, 1348, 1169, 924, 699.



p-C₃-CHO: 4-(3-phenylpropoxy)benzaldehyde

4-hydroxybenzaldehyde (428 mg, 2 mmol, 1.1 eq) and **V-6b** (377 mg, 1.8 mmol) were dissolved in 15 mL of acetonitrile. K₂CO₃ (428 mg, 2 eq) was added and the mixture was refluxed for 4 hours. The precipitate was filtered off and the filtrate was evaporated. The crude oil was purified over silica gel chromatography with EtOAc/Petroleum ether 1/4.

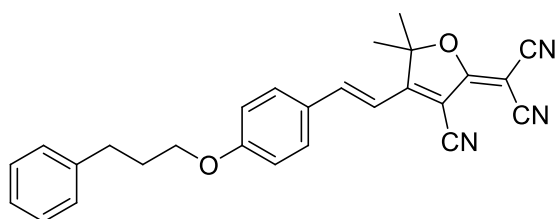
Yield: 98 % (478 mg), colorless oil

NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 9.87 (s, 1 H), 7.87 (d, 2 H, *J* = 8.4 Hz), 7.29 (t, 2 H, *J* = 7.4 Hz), 7.24 (d, 2 H, *J* = 7.4 Hz), 7.19 (t, 1 H, *J* = 7.4 Hz), 7.12 (d, 2 H, *J* = 8.4 Hz), 4.08 (t, 2 H, *J* = 6.2 Hz), 2.75 (t, 2 H, *J* = 6.2 Hz), 2.05 (quint, 2 H, *J* = 6.2 Hz).

¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz) 191.2, 163.5, 141.1, 131.8 (2 C), 129.5, 128.3 (2 C), 128.2 (2 C), 125.8, 114.8 (2 C), 67.2, 31.3, 30.1.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, m/z): 240.1 for [M]⁺.

IR: (cm⁻¹): 3025, 2932, 1685, 1597, 1508, 1252, 1157 831.



p-C₃-TCF: (*E*)-2-(3-cyano-5,5-dimethyl-4-(4-(3-phenylpropoxy)styryl)furan-2(5H)-ylidene)malononitrile

General procedure A was followed with **p**-C₃-CHO (238 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂ + 2 % ethanol as eluent to get rid of a slightly blue by-product.

Yield: 61 % (256 mg), red solid.

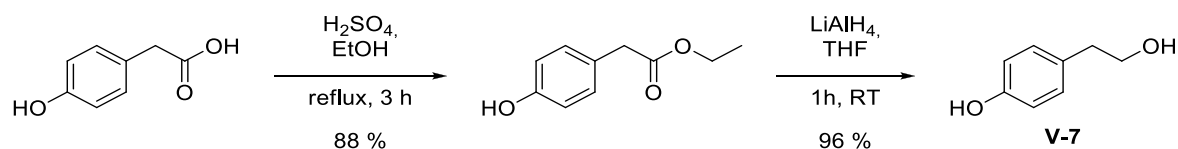
NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 7.90-7.96 (m, 3 H), 7.31 (t, 2 H, $J = 7.4$ Hz), 7.25 (d, 2 H, $J = 7.4$ Hz), 7.20 (t, 1 H, $J = 7.4$ Hz), 7.08-6.13 (m, 3 H), 4.10 (t, 2 H, $J = 6.2$ Hz), 2.77 (t, 2 H, $J = 6.2$ Hz), 2.06 (quint, 2 H, $J = 6.2$ Hz), 1.80 (s, 6 H).

^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 177.2, 175.6, 162.3, 147.6, 141.2, 131.9 (2 C), 128.35 (2 C), 128.33 (2 C), 127.0, 125.8, 115.3 (2 C), 112.8, 112.7, 112.0, 111.1, 99.1, 97.4, 67.2, 53.5, 31.3, 30.1, 25.2 (2 C).

Melting point: 192 °C.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 424.2 (100 %), 425.2 (22 %) for $[\text{M}-\text{H}]^-$.

IR: (cm^{-1}): 2218, 1578, 1559, 1536, 1261, 1172, 1047.



V-7: 4-(2-hydroxyethyl)phenol

p-Hydroxy-phenylpropionic acid (8 g, 52.6 mmol) was dissolved in anhydrous ethanol (120 mL). Sulfuric acid (6 mL) was added and the mixture was refluxed for 2 hours. Ethanol was evaporated, water (25 mL) was added and the product was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 50 mL). After evaporation, the ester (4 g, 21.7 mmol) was dissolved in anhydrous THF (50 mL). A 0 °C, LiAlH_4 (2 g, 50 mmol) was carefully added and the mixture was stirred 1 hour at 0 °C and then quenched with 2 mL of water, 4 mL of NaOH 1M and 6 mL of water. After 10 minutes, the solution was filtered and the solid was washed with NaOH 1M (3 x 50 mL). The aqueous phase was acidified, extracted with EtOAc (3 x 100 mL), The organic phases were combined, washed with brine (2 x 50 mL) and dried over Na_2SO_4 . After filtration and evaporation of the solvent, the product was used in the next step without further purification.

Yield: 82 % (2.44 g), white solid.

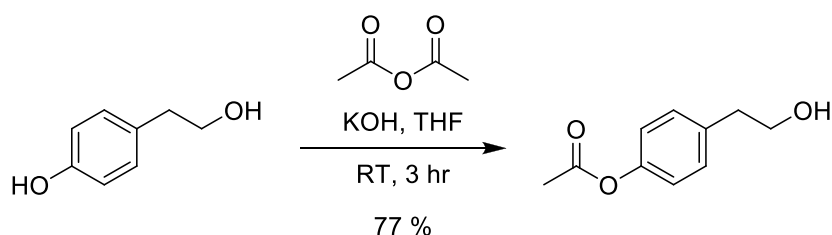
NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 9.11 (s, 1 H, -OH), 6.99 (d, 2 H, $J = 8.4$ Hz), 6.66 (d, 2 H, $J = 8.4$ Hz), 4.56 (t, 1 H, $J = 5.6$ Hz), 3.52 (dt, 2 H, $J = 7.4$ Hz, $J = 5.6$ Hz), 2.60 (t, 2 H, $J = 7.4$ Hz).

^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 155.4, 129.6 (2 C), 129.4, 114.9 (2 C), 62.6, 38.2.

Melting point: 88 °C.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 137.1 (100 %), 138.1 (26 %) for $[\text{M}-\text{H}]^-$.

IR: (cm^{-1}): 3390, 3125, 3020, 2926, 2880, 1598, 1508, 1225, 1048, 815.



V-8: 4-(2-hydroxyethyl)phenyl acetate

V-7 (1.6 g, 11.6 mmol) was dissolved in anhydrous THF (15 mL) and KOH (650 mg, 1 eq) in water (1.8 mL)

was added. The solution was stirred 30 minutes and acetic acid (1.6 mL) was added dropwise. After two hours at room temperature, water (15 mL) and diethyl ether (15 mL) were added, and the layer separated. The organic phase was washed with 2 x 15 mL of saturated Na_2CO_3 , dried over Na_2SO_4 filtere and the solvent was evaporated under vacuum. The crude was purified over a silica gel chromatography with EtOAc/Petroleum ether 1/3 as eluent.

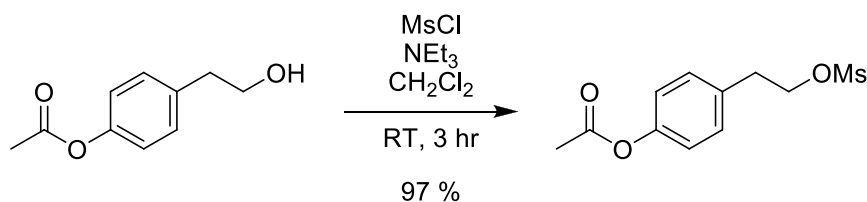
Yield: 64 % (1.35 g), pale yellow oil.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in CDCl_3 , 500 MHz): 7.21 (d, 2 H, $J = 8.2$ Hz), 7.00 (d, 2 H, $J = 8.2$ Hz), 3.81 (q, 2 H, $J = 6.4$ Hz), 2.82 (t, 2 H, $J = 6.4$ Hz), 2.27 (s, 3 H).

^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 169.7, 149.2, 136.2, 130.0 (2 C), 121.6 (2C), 63.6, 38.6, 21.6.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 179.1 (100 %), 180.1 (33 %) for $[\text{M}-\text{H}]^-$.

IR: (cm^{-1}): 3379, 2942, 2869, 1752, 1507, 1190, 1016.



V-9: 4-(2-(methylsulfonyloxy)ethyl)phenyl acetate

V-8 (1.15 g, 6.4 mmol) was dissolved in

CH_2Cl_2 (10 mL) and NEt_3 (1 mL, 1.1 eq). At 0 °C, mesylchloride (575 μL , 7.5 mmol, 1.2 eq) was added and the solution was stirred for 1.5 hour. Water (20 mL) was then added and the layer separated. The aqueous phase was extracted with 2 x 15 mL of CH_2Cl_2 . The organic phases were combined, washed with brine (2 x 15 mL), dried over Na_2SO_4 . The solid was filtered off and the solvent evaporated to give the pure product.

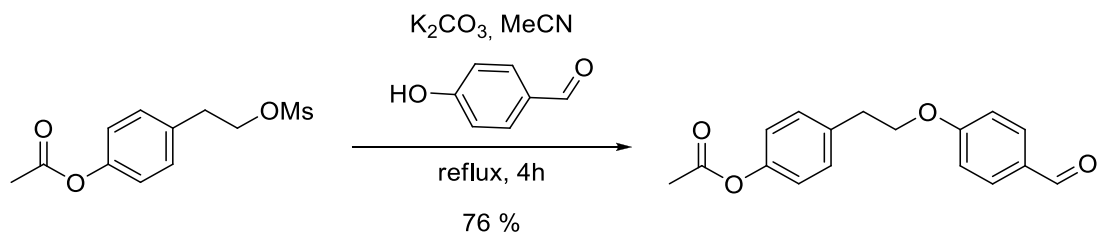
Yield: 97 % (1.61 g), yellow oil.

NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 500 MHz): 7.22 (d, 2 H, $J = 8.4$ Hz), 7.02 (d, 2 H, $J = 8.4$ Hz), 4.38 (t, 2 H, $J = 7.0$ Hz), 3.03 (t, 2 H, $J = 7.0$ Hz), 2.84 (s, 3 H), 2.27 (s, 3 H).

^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO- d_6 , 125 MHz) 169.5, 149.7, 133.9, 130.0 (2C), 121.9 (2C), 70.1, 37.4, 35.0, 21.1.

Mass: Mass spectrum (ES^+ , m/z): 259.1 (100 %), 260.1 (18 %) for $[\text{M}+\text{H}]^+$.

IR: (cm⁻¹): 2987, 2900, 2220, 1508, 1380, 1240, 1055.



V-10: 4-(2-(4-formylphenoxy)ethyl)phenyl acetate

4-hydroxybenzaldehyde (530 mg, 4.4 mmol, 1.1 eq) and **V-9** (1 g, 3.8 mmol) were dissolved in 25 mL of acetonitrile. K₂CO₃ (1050 mg, 2 eq) was added and the mixture was refluxed for 4 hours. The precipitate was filtered off and the filtrate was evaporated. The crude oil was purified over silica gel chromatography with EtOAc/Petroleum ether 1/4.

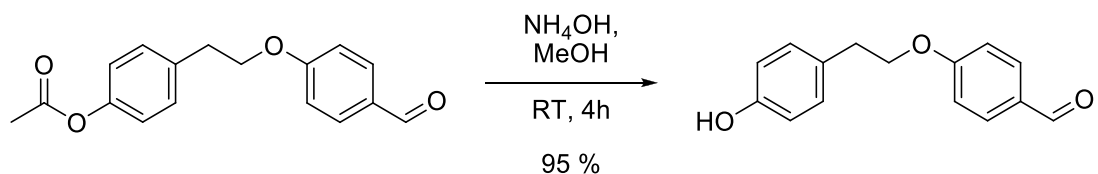
Yield: 76 % (820 mg), colorless oil.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 9.93 (s, 1H), 7.87 (d, 2 H, *J* = 8.8 Hz), 7.34 (d, 2 H, *J* = 8.8 Hz), 7.09 (d, 2 H, *J* = 8.4 Hz), 7.03 (d, 2 H, *J* = 8.4 Hz), 4.29 (t, 2 H, *J* = 7.0 Hz), 3.17 (t, 2 H, *J* = 7.0 Hz), 2.35 (s, 3 H).

¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz) 190.9, 169.6, 163.8, 149.4, 135.3, 132.0 (2 C), 130.0 (2 C), 121.7 (2 C), 115.9, 114.8 (2 C), 68.8, 35.0, 21.1.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, *m/z*): 284.1 for [M]⁺.

IR: (cm⁻¹): 2942, 1754, 1683, 1597, 1507, 1252, 1190, 1156, 1014.



HO-p-C₂-CHO: 4-(4-hydroxyphenethoxy)benzaldehyde

V-10 (600 mg, 2.11 mmol) was dissolved in MeOH (25 mL). 20 % NH₃ in water (4 mL) was added and the mixture stirred at room temperature for 4 hours. The methanol was then evaporated and the aqueous phase was acidified. The product was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 20 mL). The combined organic phases were dried over N₂SO₄ filtered and the solvents were evaporated under vacuum.

Yield: 95 % (481 mg), yellow solid.

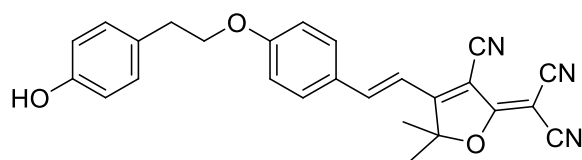
NMR ^1H NMR (δ /ppm in CDCl_3 , 500 MHz): 9.92 (s, 1H), 7.87 (d, 2 H, $J = 8.4$ Hz), 7.20 (d, 2 H, $J = 8.4$ Hz), 7.03 (d, 2 H, $J = 8.8$ Hz), 6.85 (d, 2 H, $J = 8.8$ Hz), 4.26 (t, 2 H, $J = 7.0$ Hz), 3.11 (t, 2 H, $J = 7.0$ Hz).

^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO-d_6 , 125 MHz) 191.0, 164.0, 154.4, 132.1 (2 C), 130.2 (2 C), 130.1, 115.5, 115.4 (2 C), 114.9 (2 C), 69.3, 34.7.

Melting point: 104 °C.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 241.1 (100 %), 242.1 (21 %) for $[\text{M-H}]^-$.

IR: (cm^{-1}): 3301, 2223, 1666, 1561, 1536, 1244, 1017.



HO-p-C₂-TCF: *(E)-2-(3-cyano-4-(4-(4-hydroxyphenethoxy)styryl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene)malononitrile*

General procedure A was followed with **HO-p-C₂-CHO** (242 mg). The product was purified by silica-gel chromatography with CH_2Cl_2 to CH_2Cl_2 + 2 % ethanol as eluent.

Yield: 49 % (217 mg), red solid.

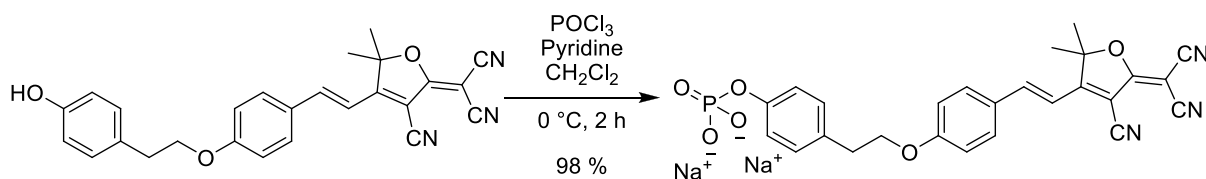
NMR ^1H NMR (δ /ppm in DMSO-d_6 , 500 MHz): 9.22 (s, 1 H), 7.93 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz), 7.89 (d, 2 H, $J = 8.8$ Hz), 7.12 (d, 2 H, $J = 8.8$ Hz), 7.12 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz), 7.08 (d, 2 H, $J = 8.8$ Hz), 6.71 (d, 2 H, $J = 8.8$ Hz), 4.23 (t, 2 H, $J = 7.0$ Hz), 2.95 (t, 2 H, $J = 7.0$ Hz), 1.79 (s, 6 H).

^{13}C NMR (δ /ppm in DMSO-d_6 , 125 MHz) 177.2, 175.6, 162.2, 155.8, 147.6, 131.8 (2 C), 129.8 (2 C), 127.8, 127.0, 115.3 (2 C), 115.1 (2 C), 112.8, 112.7, 112.0, 111.1, 99.1, 97.4, 69.0, 53.5, 33.9, 25.2 (2 C).

Melting point: 250 °C.

Mass: Mass spectrum (ES^- , m/z): 422.2 (100 %), 421.2 (17 %) for $[\text{M-H}]^-$.

IR: (cm^{-1}): 3249, 2942, 2223, 1666, 1596, 1536, 1509, 1243, 1159, 1018, 832.



Phos-p-C₂-TCF: sodium (E)-4-(2-(4-(2-(4-cyano-5-(dicyanomethylene)-2,2-dimethyl-2,5-dihydrofuran-3-yl)vinyl)phenoxy)ethyl)phenyl phosphate

At 0 °C and under Argon atmosphere, of PCl₃ (135 μL, 1.45 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL) was added dropwise to a solution of **HO-p-C₂-TCF** (44 mg, 0.01 mmol) in CH₂Cl₂ (1 mL) and pyridine (3 mL). The mixture was stirred at 0 °C 2 hours and a water:acetone mixture (1:1 15 mL) was added and the solution was evaporated. The red wax was purified by column chromatography on reverse-phase C18 silica gel (elution: water + 2% acetonitrile). The product was then cation exchanged on Amberlite® and lyophilized to give the product as a brown solid.

Yield: 70 % (36 mg), red solid.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 7.91 (d, 1 H, *J* = 16.4 Hz), 7.87 (d, 2 H, *J* = 8.0 Hz), 7.13 (d, 2 H, *J* = 8.0 Hz), 7.05-7.09 (m, 5 H), 4.24 (t, 2 H, *J* = 5.6 Hz), 2.97 (t, 2 H, *J* = 5.6 Hz), 1.76 (s, 6 H).

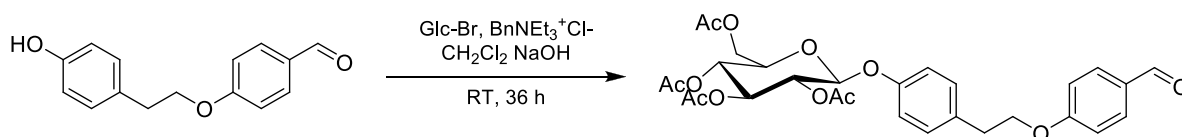
¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz) 177.2, 175.8, 162.2, 153.1, 147.7, 131.9 (2 C), 130.2, 129.1 (2 C), 127.0, 119.8 (2 C), 115.4 (2 C), 113.8, 112.9, 112.7, 111.1, 99.1, 97.3, 68.9, 53.5, 34.0, 25.2 (2 C).

³¹P NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 200 MHz) -5,28.

Melting point: > 260 °C.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, *m/z*): 502.2 (100 %), 503.0 (39 %) for [M-H]⁻.

IR: (cm⁻¹): 2989, 2900, 2228, 1744, 1577, 1537, 1508, 1228, 1171, 1074.



AcGlc-p-C₂-CHO: 4-(4-peracetyl-β-glucopyranosylphenethoxy)-benzaldehyde

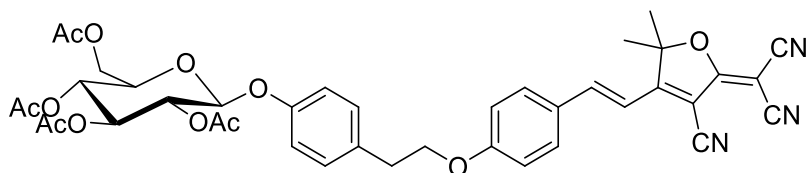
BnEt₃N⁺Cl⁻ (110 mg, 0.6 mmol, 0.25 eq) was dissolved in 1/1 CHCl₃/H₂O (10 mL) and **AcGlc-p-C₂-CHO** (600 mg, 2.5 mmol) was added followed by a solution of NaOH (120 mg, 2.8 mmol, 1.1 eq) in 10 mL of water. The mixture was vigorously stirred 10 min à 40 °C before the addition of **Glc-Br** (1 g, 2.5 mmol, 1 eq) in Chloroform (10 mL). The solution was allowed to react for 24 hrs at 40 °C. After return to room temperature, the two layers were separated and the organic one was washed with NaOH 1M (3 x 20 mL), brine (2 x 15 mL) and dried over Na₂SO₄. After evaporation, the crude oil was crystallized from ethanol to afford the pure product as white needles. The product was entirely used in the next step without characterization.

Yield: 56 % (810 mg), white needles.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 9.86 (s, 1 H), 7.84 (d, 2 H, *J* = 8.7 Hz), 7.12 (d, 2 *J* = 8.7 Hz), 7.11 (d, 2 H, *J* = 8.7 Hz), 6.88 (d, 2 H, *J* = 4.0 Hz), 6.70 (d, 2 H, *J* = 8.7 Hz), 5.38 (t, 1 H, *J* = 9.7 Hz),

5.18 (t, 2 H, $J = 9.7$ Hz), 5.04 (d, 1 H, $J = 4.0$ Hz), 5.00 (d, 1 H, $J = 4.0$ Hz), 4.24 (t, 2 H, $J = 7.0$ Hz), 2.94 (t, 2 H, $J = 7.0$ Hz),

Mass: Mass spectrum (ES⁻, m/z): 571.2 (100 %), 572.2 (30 %) for [M-H]⁻.



AcGlc-p-C₂-TCF: (*E*)-2-(3-cyano-4-(4-(4-(4-peracety-β-glucopyranosyl-phenethoxy)styryl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene)malononitrile

General procedure A was followed with **AcGlc-p-C₂-CHO** (541 mg, 0.5 mmol). The product was purified by silica-gel chromatography with CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂ + 2 % ethanol as eluent.

Yield: 56 % (426 mg), orange solid.

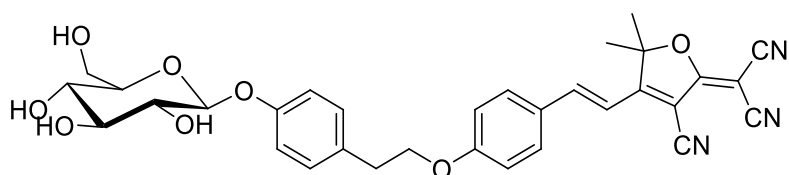
NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 7.93 (d, 1 H, $J = 17.0$ Hz), 7.90 (d, 2 H, $J = 8.8$ Hz), 7.30 (d, 2 H, $J = 8.6$ Hz), 7.08 (m, 3 H), 6.95 (d, 2 H, $J = 8.6$ Hz), 5.52 (d, 1 H, $J = 8.1$ Hz), 5.41 (t, 1 H, $J = 9.5$ Hz), 5.05 (t, 1 H, $J = 8.1$ Hz), 5.00 (t, 1 H, $J = 9.5$ Hz), 4.28 (t, 2 H, $J = 6.8$ Hz), 4.19-4.23 (m, 2 H), 4.07 (d, 1 H, $J = 9.6$ Hz), 3.03 (t, 2 H, $J = 6.8$ Hz), 2.03 (s, 3 H), 2.02 (s, 6 H), 1.98 (s, 3 H), 1.79 (s, 6 H).

¹³C NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 125 MHz) 177.2, 175.6, 169.9, 169.5, 169.2, 169.0, 162.1, 155.0, 147.6, 132.5, 131.8 (2 C), 130.1 (2 C), 127.1, 116.3 (2 C), 115.3 (2 C), 112.8, 112.7, 112.0, 111.1, 99.1, 97.4, 07.2, 71.9, 70.7 (2 C), 68.6, 68.0, 61.6, 53.5, 33.8, 25.2 (2 C), 20.5, 20.4, 20.3, 20.2.

Melting point: 218 °C.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, m/z): 752.0 (100 %), 753.2 (44 %), 754.2 (18 %) for [M-H]⁻.

IR: (cm⁻¹): 2978, 2895, 2234, 1742, 1557, 1524, 1377, 1228, 1067, 1039.



Glc-p-C₂-TCF: (*E*)-2-(3-cyano-4-(4-(4-(4-β-glucopyranosyl-phenethoxy)styryl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene)malononitrile

AcGlc-p-C₂-TCF (100 mg 0.13 mmol) was dissolved in a mixture MeOH/NEt₃/H₂O (8/1/1, 20 mL) and stirred at room temperature. After completion of the reaction monitored with TLC (CH₂Cl₂ with 5

% MeOH), the solvents were removed under vacuum. The red powder was purified with silica-gel chromatography (CH₂Cl₂ + 5 % MeOH) to afford the pure product.

Yield: 78 % (64 mg), red solid.

NMR ¹H NMR (δ/ppm in DMSO-d₆, 500 MHz): 7.92 (d, 1 H, *J* = 17.0 Hz), 7.89 (d, 2 H, *J* = 8.8 Hz), 7.26 (d, 2 H, *J* = 8.6 Hz), 7.10 (m, 3 Hz), 6.98 (d, 2 H, *J* = 8.6 Hz), 5.28 (d, 1 H, *J* = 8.1 Hz), 5.07 (t, 1 H, *J* = 9.5 Hz), 5.00 (t, 1 H, *J* = 8.1 Hz), 4.83 (t, 1 H, *J* = 9.5 Hz), 4.55 (t, 2 H, *J* = 6.8 Hz), 4.26 (m, 2 H), 4.15 (d, 1 H, *J* = 9.6 Hz), 3.02 (t, 2 H, *J* = 6.8 Hz), 1.79 (s, 6 H).

Melting point: 122 °C.

Mass: Mass spectrum (ES⁻, *m/z*): 584.2 (100 %), 585.2 (18 %) for [M-H]⁻, 392.0 (26 % for [M-H]²⁻).

IR: (cm⁻¹): 3343, 2984, 2890, 2222, 1754, 1560, 1531, 1508, 1228, 1170, 1067.

VI.3 Spectroscopy

3.A. pH probes

3.A.i pKa determination and UV experiments

For each compound, 10⁻³ M stock solutions in DMSO were prepared and kept in the dark in the fridge. 0.1 M NaCl - 0.1 M HEPES buffer solutions were prepared by dissolving HEPES (11.9 g) and NaCl (2.9 g) in distilled water (500 mL) and adjusting the pH of the solution to a given value with either 1 M HCl (for pH=2 to 7.4) or 1 M NaOH (for pH 7.6 to 10).

Titration solution were prepared by mixing 20 μL of compound **II-2a-2j** stock solution, 500 μL DMSO to ensure total solubility and 2.0 mL of the buffered solution at a given pH to obtain a final concentration of 8x10⁻⁶ M. The absorption spectrum of each batch was then recorded. The variation of the absorbance *A* at the wavelength of the maximum of absorption of the phenolate was plotted as a function of pH. The sigmoid curve obtained was fitted with Nonlinear curve fit procedure of Origin 8.1 Pro[®] software according to equation (II-1). The only adjustable parameter in equation (II-1) was pKa. The same experiment was done recording the emission of fluorescence. The excitation wavelength was set at the wavelength of the isobestic point obtained in the absorption titration.

$$pH = pKa + \log \frac{A - A_{acide}}{A_{base} - A} \quad (II-1)$$

For reversibility, a solution of compound **II-2a** (2500 μL, 10 μM) in water was brought to pH=10 by adding 0.1 M NaOH (2.5 μL). The absorption spectrum was recorded. The solution was then acidified to pH=4 by adding 0.1 M HCl (5 μL) while recording the absorption spectrum. The pH was changed in cycle from pH=4 to pH=10 and reversibly from pH=10 to pH=4, by adding in turn 0.1 M NaOH (5 μL) and 0.1 M HCl (5 μL). For each pH, the absorption spectrum was recorded.

3.A.ii QY measurement

In solution, quantum yields (Φ_F) were determined by a comparative method involving the use of characterized standards of known Φ_F values. Both the standard and the sample must be excited at the same wavelength (λ_{exc}) and if possible, with a quantum yield and an emission range as close as possible. A list of fluorescence standard can be found in Boens *et al.* (Anal. Chem. **2007**, 79(5) 2137).

A diluted solution of standard in the appropriate solvent and of the sample were prepared and the absorbance (A_{ref} and A_s) of each was measured at λ_{exc} . Fluorescence spectra were recorded exciting both cuvettes at λ_{exc} and with the same instrument configuration (slits, integration time, increment). The integrated fluorescence intensity (F_{ref} and F_s) were calculated. This was repeated for five solutions with increasing or decreasing concentrations. In order to minimize re-absorption effects, the absorbance was kept below 0.1 for the excitation wavelength and above.

A graph of the integrated fluorescence intensity F vs absorbance A gave a straight line defined by a slope (S_{ref} and S_s for the reference and the sample respectively). This slope is a tool to calculate the sample quantum yield according to the following equation:

$$\phi_{F_s} = \phi_{F_{ref}} \left(\frac{S_s}{S_{ref}} \right) \left(\frac{n_s}{n_{ref}} \right)^2$$

where n is the refractive index of the solvent.

For the phenol, coumarin 153 in methanol ($\Phi_f = 0.45$) was used as a reference, for the phenolates, cresyl violet in methanol ($\Phi_f = 0.54$) was used.

3.B. Solid state and suspension fluorescence

3.B.i Solid state quantum yield

Solid state quantum yields were measured according to Porrès *et al.*^[183] with an integrating sphere collecting all the emission (2π steradians covered with spectralon®): Horiba Jobin Yvon, F-3018. The sphere was corrected for both excitation and emission with standard. For each sample, 6 measurement were made, all spectra recorded with the same excitation and emission monochromatic bandpass (slits opening) to give six integrated intensities needed for the determination of quantum Yield with the equation developed by de Mello *et al.*^[184]:

$$\Phi_F = \frac{E_{in} - (1-\alpha)E_{out} - E_{empty}}{L_{empty}\alpha ND} \text{ where } \alpha = \frac{L_{out} - L_{in}}{L_{out}} \quad \text{IV-1}$$

- E_{in} and E_{out} are the integrated fluorescence as a result of direct excitation of the film (sample IN) and secondary excitation (OUT) (see Figure VI-1).
- E_{empty} is the integrated fluorescence without any sample (the background of the sphere).
- L_{empty} is the integrated excitation profile with the empty sphere
- α is the absorbance of the sample which is obtained by measuring the integrated excitation bands, i.e, the emission signal measured across the excitation wavelength. Once again, two positions are used: in and out. In the IN configuration, absorption is due to direct and indirect excitation, whereas in OUT position, only the secondary excitation is recorded.

ND is the value of the neutral density filter used to reduce the intensity without changing the excitation profile. In our case, ND = 0.5 %.

For our compound, the secondary excitation was negligible. We then have $E_{out} = 0$ and $L_{out} = L_{empty}$. Eq IV-1 becomes:

$$\Phi_F = \frac{E_{in} - E_{empty}}{(L_{empty} - L_{in})ND} \text{ and } \alpha = \frac{L_{empty} - L_{in}}{L_{empty}} \quad \text{IV-2}$$

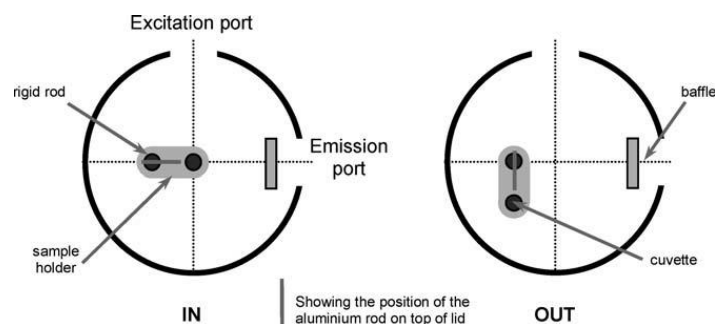


Figure VI-1. Sample holder and positions used in the experiments for the determination of Φ_f . from Porrès et al.^[183]

3.B.ii AIE experiment

Stock solutions (1 mM) of the desired compound were prepared in THF. For each water fraction, 100 μL of this solution were diluted in a 2 mL volumetric cuvette, in the amount of THF given in the table below, and water was then added to reach 2 mL. The mixture was sonicated for 30 s, and allowed to rest for 2 min before the measurement.

f_w	0 %	25 %	50 %	60 %	70 %	75 %	80 %	85 %	90 %	95 %
$V_{\text{stock}} (\mu\text{L})$	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
$V_{\text{THF}} (\mu\text{L})$	1900	1400	900	700	500	400	300	200	100	0
$V_{\text{H}_2\text{O}} (\mu\text{L})$	0	500	1000	1200	1400	1500	1600	1700	1800	1900

3.C. Hydrogen peroxide detection

3.C.i Kinetic

A solution of 10 μM of probe (P-TCF or III-2), 5 mM of ose (when needed) and 5 mM of H_2O_2 in 2 mL of HEPES buffer at appropriate pH (5 or 7.4) was vortexed for 15 s and then monitored by UV/Vis or Fluorescence spectroscopy scanning every 30 s, the first scan occurring 30 s after the addition of H_2O_2 using the Kinetic mode of the fluorimeter or the UV/VIS apparatus.

3.C.ii Selectivity

Selectivity for the **P-TCF** probe was measured by fluorescence. 10 μM of probe and 1 mM of H_2O_2 or 5 mM of other ROS in 2 mL of HEPES buffer at pH 5 were vortexed and the intensity was measured at the following time points: 1, 5, 10, 20, 40 and 60 minutes. The reaction with different ROS was prepared as follows:

$^t\text{BuOOH}$: A 70% $t\text{BuOOH}$ in H_2O solution was diluted 10-fold and 12.9 μL was added to 1987 μL of 50 μM probe in HEPES (final concentration was 5 mM).

ClO^- : 12 μL of a commercial 6.15 % NaOCl solution was added to 1988 μL of 50 μM of probe (final concentration was 5 mM).

HO^\cdot : 2 mL of a 50 μM **P-TCF** solution in HEPES buffer at pH 7.4 was degassed for ~5 min by bubbling Argon. 8 mg ammonium iron(II) sulfate (10 mM) was added and the solution was degassed for an additional 30 min by bubbling argon. 10 μL of 1M H_2O_2 were then added for a final concentration of 5 mM. The mixture was kept under argon and stirred by the bubbling.

$^t\text{BuO}^\cdot$: The same experiment was carried on except that H_2O_2 was replaced by 12.9 μL of a 10-fold diluted 70% $t\text{BuOOH}$ in H_2O .

O_2^\cdot : 35.5 mg or 7.1 mg of KO_2 were added to 20 mL of a solution of 50 μM **P-TCF** in HEPES buffer at pH 7.4 with a final concentration of 5 mM and 1 mM respectively. 2 mL of the solution were used for the fluorescence measurement.

3.C.iii Sensitivity

A solution of 10 μM of probe (**P-TCF**), and different concentrations of H_2O_2 in 2 mL of HEPES buffer at appropriate pH (5 or 7.4) was vortexed for 15 s and then monitored by Fluorescence spectroscopy after 5 or 30 minutes of reaction.

3.D. Kinetic studies of enzymatic probes

For the phosphatase detection, a solution of 50 μM of probe and different concentrations of enzyme in 2 mL of TRIS-HCl buffer at pH 8 was vortexed for 15 s and then monitored by UV/Vis or fluorescence spectroscopy every 30 s, the first point occurring 30 s after the addition of enzyme. For the glucosidase, the same experiment was carried in a PBS buffer at pH 7.4.

VI.4 Confocal imaging

Hela (ATCC-CL-2) cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, Life technologies, Courtaboeuf, France) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Life technologies) and maintained at 37°C with 5% CO_2 atmosphere. Cells were seeded on Labetch (10000 per chamber) 12 hours before experiment. Four hours before imaging, medium was removed and replaced by DMEM without red phenol (Life technologies) buffered at the appropriate pH (ie. 7.4, 7.2, 7.0 or 6.8). The selected probe (1 μM) was added 1 minute before imaging and fluorescence images were acquired without washing.

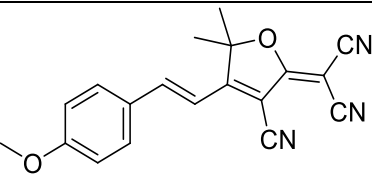
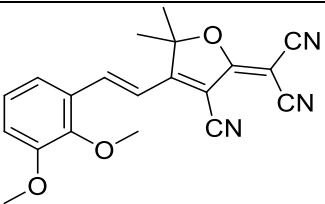
pH measurement was performed with a Zeiss LSM510 8 confocal microscope and an argon laser at 488 nm for excitation of compound **II-2a** and at 514 nm for excitation of compound **II-2g**. Light was reflected by a dichroic mirror (HFT488/561 for **II-2a** and 458/514 for **II-2g**), and directed toward the sample with an A-Plan 40×Zeiss objective (NA=0.65). The emitted fluorescence was collected by the objective, passed through the dichroic mirror, a long-pass filter (490nm for **II-2a** and **II-2g**) and an emission band-pass filter defining the “green” (500-550 nm for **2a** and 535-590 nm for **2g**) and red channel (600-650 nm for **2a** and 650-710 nm for **2g**) before the detector. Each fluorescence image is an average of four pictures and was recorded with the LSM5 software.

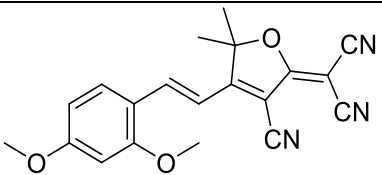
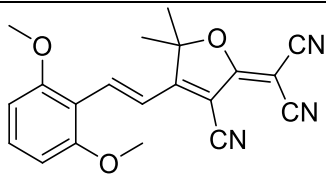
Annexes

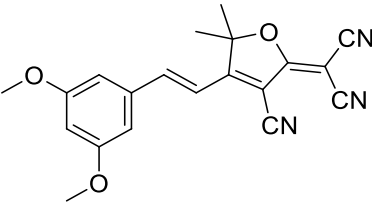
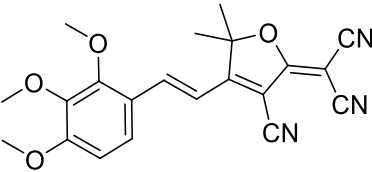
Crystallographic data

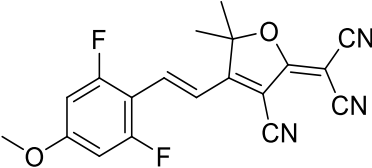
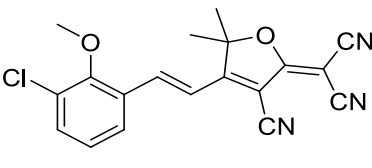
Crystals suitable for X-ray crystallography diffraction were grown by slow diffusion of diisopropyl ether vapor in concentrated solution of compound in chloroform. Processing of the data was performed by the KappaCCD analysis softwares. The lattice constants were refined by least-square refinement. No absorption correction was applied to the data sets.

Each system was attributed according to the observed systematic extinctions and the structures have been solved in the appropriate space group by Erwann Jeanneau at the Centre de diffractométrie Henri Longchambon at Villeurbanne. The structure was solved by direct method with the SIR97 program combined to Fourier difference syntheses and refined against F with reflections with $[I/\sigma(I) > 2]$ with the crystal program for all compounds. All diatomic displacements parameters for non-hydrogen atoms have been refined with anisotropic terms. After anisotropic refinement, all the hydrogen atoms are found with a Fourier difference. The following tables summarize the crystallographic data and refinements for all compounds.

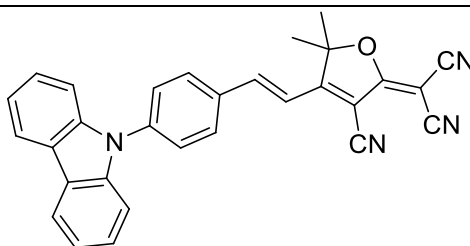
	p-MeO-TCF	2,3-diMeO-TCF
		
Formula	C ₁₉ H ₁₅ N ₃ O ₂	C ₂₀ H ₁₇ N ₃ O ₃
Cryst. Syst.	Monoclinic	Monoclinic
Space group	<i>P2₁/m</i> (N° 11)	<i>P2₁/c</i> (N° 14)
<i>a</i> (Å)	10.0110(9)	8.0071(5)
<i>b</i> (Å)	6.9999(6)	15.2752(8)
<i>c</i> (Å)	11.5760(10)	14.9890(10)
α (°)	90	90
β (°)	101.360(10)	102.870(6)
γ (°)	90	90
<i>V</i> (Å ³)	795.307	1785.14
<i>Z</i>	2	4
<i>T</i>	100	150
<i>D</i> _{calcd} (gc.m ⁻³)	1.325	1.292
μ (mm ⁻¹)	0.72	0.73
θ range (°)	3.9-66.3	4.1-67.0
total no. data	8943	19637
no. unique data	1533	3163
no. params refined	150	236
<i>R</i> ₁	0.045	0.046
<i>wR</i> ₂	0.106	0.086
<i>GoF</i>	0.94	1.01

	2.4-diMeO-TCF	2.6-diMeO-TCF
		
Formula	C ₂₀ H ₁₇ N ₃ O ₃	C ₂₀ H ₁₇ N ₃ O ₃
Cryst. Syst.	Orthorhombic	Monoclinic
Space group	<i>Pbca</i> (N°61)	<i>P2₁/c</i> (N° 14)
<i>a</i> (Å)	13.854(2)	10.397(2)
<i>b</i> (Å)	15.110(2)	9.8280(10)
<i>c</i> (Å)	16.697(3)	17.179(2)
α (°)	90	90
β (°)	90	94.990(10)
γ (°)	90	90
<i>V</i> (Å ³)	3495.25	1748.7(4)
<i>Z</i>	8	4
<i>T</i>	150	150
<i>D</i> _{calcd} (gc.m ⁻³)	1.320	1.319
μ (mm ⁻¹)	0.74	0.74
θ range (°)	4.9-67.0	4.2-66.8
total no. data	16513	13075
no. unique data	3110	3103
no. params refined	236	236
<i>R</i> ₁	0.062	0.066
<i>wR</i> ₂	0.111	0.204
<i>GoF</i>	1.03	1.00

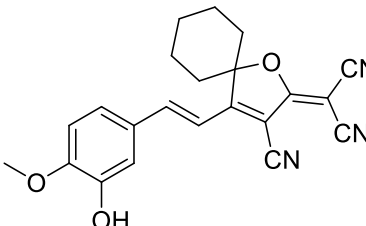
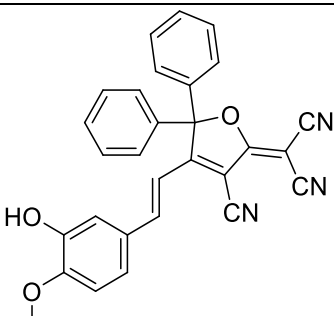
	3.5-diMeO-TCF	2.3.4-triMeO-TCF
		
Formula	C ₂₀ H ₁₇ N ₃ O ₃	C ₂₁ H ₁₉ N ₃ O ₄
Cryst. Syst.	Orthorhombic	Monoclinic
Space group	<i>Pnma</i> (N° 62)	<i>P2₁/n</i> (14)
<i>a</i> (Å)	17.1210(10)	15.229(2)
<i>b</i> (Å)	6.9428(5)	7.5088(7)
<i>c</i> (Å)	15.4460(10)	16.6390(10)
α (°)	90	90
β (°)	90	92.397(7)
γ (°)	90	90
<i>V</i> (Å ³)	1836.03	1901.03
<i>Z</i>	4	4
<i>T</i>	150	150
<i>D</i> _{calc} (g·cm ⁻³)	1.257	1.319
μ (mm ⁻¹)	0.71	0.77
θ range (°)	5.1-67.0	2.8-66.9
total no. data	11309	17984
no. unique data	1772	3353
no. params refined	162	253
<i>R</i> ₁	0.039	0.069
<i>wR</i> ₂	0.113	0.141
GoF	1.01	1.07

	2,6-diF-p-MeO-TCF	3-Cl-o-MeO-TCF
		
Formula	C ₁₉ H ₁₃ F ₂ N ₃ O ₂	C ₁₉ H ₁₄ ClN ₃ O ₂
Cryst. Syst.	orthorhombic	monoclinic
Space group	<i>Pnma</i>	<i>P2₁/n</i>
<i>a</i> (Å)	18.829(2)	8.655(10)
<i>b</i> (Å)	6.6790(9)	7.007(8)
<i>c</i> (Å)	13.475(2)	14.162(2)
α (°)	90	90
β (°)	90	98.46(10)
γ (°)	90	90
<i>V</i> (Å ³)	1694.6(4)	849.54(4)
<i>Z</i>	4	2
<i>T</i>	150	150
<i>D</i> _{calc} (g·cm ⁻³)	1.385	1.375
μ (mm ⁻¹)	0.71	1.54
θ range (°)	3.4-29.0	3.2-70.1
total no. data	21797	9489
no. unique data	2427	2951
no. params refined	160	228
<i>R</i> ₁	0.092	0.095
<i>wR</i> ₂	0.100	0.167
GoF	1.11	0.9764

Cbz-TCF



Formula	C ₃₀ H ₂₀ N ₄ O
Cryst. Syst.	monoclinic
Space group	<i>P2₁/n</i>
<i>a</i> (Å)	10.037(8)
<i>b</i> (Å)	7.064(8)
<i>c</i> (Å)	16.579(2)
α (°)	90
β (°)	98.01(8)
γ (°)	90
<i>V</i> (Å ³)	1164.2(2)
<i>Z</i>	2
<i>T</i>	150
<i>D</i> _{calcd} (gc.m ⁻³)	1.291
μ (mm ⁻¹)	1.54
θ range (°)	4.44-67.70
total no. data	9260
no. unique data	3369
no. params refined	318
<i>R</i> ₁	0.067
<i>wR</i> ₂	0.1372
<i>GoF</i>	1.076

	V-4b	V-4d
		
Formula	C ₂₂ H ₁₉ N ₃ O ₃	C ₂₉ H ₁₉ N ₃ O ₃
Cryst. Syst.	triclinic	triclinic
Space group	<i>P</i> ₁	<i>P</i> ₁
<i>a</i> (Å)	6.826(10)	8.926(2)
<i>b</i> (Å)	10.194(10)	10.272(2)
<i>c</i> (Å)	14.523(10)	14.338(2)
α (°)	71.120(10)	108.590(10)
β (°)	85.210(10)	97.10(2)
γ (°)	89.080(10)	107.64(2)
<i>V</i> (Å ³)	952.80(19)	1151.6(4)
<i>Z</i>	2	2
<i>T</i>	150	150
<i>D</i> _{calcd} (gc.m ⁻³)	1.301	1.319
μ (mm ⁻¹)	1.54	1.54
θ range (°)	4.58-67.40	3.35-67.32
total no. data	13391	11147
no. unique data	3336	4001
no. params refined	254	316
<i>R</i> ₁	0.096	0.098
<i>wR</i> ₂	0.2049	0.080
<i>GoF</i>	1.0424	0.974

Publications

Fluorescent push–pull pH-responsive probes for ratiometric detection of intracellular pH†

Cite this: *Org. Biomol. Chem.*, 2014, **12**, 3641

Martin Ipuy,^a Cyrielle Billon,^b Guillaume Micouin,^a Jacques Samarut,^b Chantal Andraud^a and Yann Bretonnière*^a

A family of fluorescent push–pull pH-responsive probes based on 2-dicyanomethylidene-3-cyano-4,5,5-trimethyl-2,5-dihydrofuran as a strong electron acceptor group is described. Small structural variations allow obtaining pK_a ranging from 4.8 to 8.6, underlining the role of the substituent in modulating the acidic properties. Remarkable changes in the optical properties (in particular the fluorescence intensity ratios) were observed as a function of pH. The most interesting probes with pK_a close to neutrality were used for ratiometric imaging of intracellular pH.

Received 20th January 2014,
Accepted 31st March 2014

DOI: 10.1039/c4ob00147h

www.rsc.org/obc

Introduction

Phenolic compounds are amongst the most important classes of dyes characterized by acidity of the hydroxy group. The pK_a of phenol is 9.98, but when electron-withdrawing groups that can stabilize the phenoxide ion are present, a substantial change in acidity of the OH group can be noted.¹ For example, the ionization constants of *o*- and *p*-nitrophenol are several hundred times greater than those of phenol with pK_a of 7.23 and 7.15 respectively. Moreover, the hydroxy group OH is a weak electron donating group whereas the deprotonated O[−] is a much stronger donating group with a negative charge that can delocalize along a conjugated path. As a consequence, the phenol and the corresponding phenolate ion display very different optical properties in absorption and emission, with the latter being usually much more emissive. This unique feature has been intensively exploited in the design of fluorescent indicators for intracellular pH.² Most of the pH indicators developed so far (Fig. 1), such as 1,4-DHPN (1,4-dihydroxyphthalonitrile),³ HPTS (1-hydroxypyrene-3,6,8-trisulfonate),⁴ BCECF (2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein),⁵ or the long-wavelength fluorescent SNAFL (seminaphthofluoresceins),⁶ SNAFR (seminaphthofluorones),⁷ and SNARF (seminaphthorhodafuors),⁸ are phenol derivatives spanning the physiological pH from different organelles

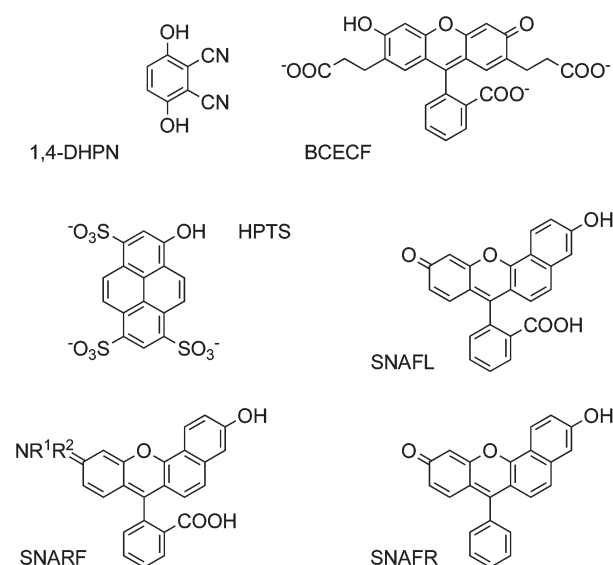


Fig. 1 Examples of commonly used phenol-based pH sensitive fluorophores.

(4.50–6.00 range) to the cytosol (6.80–7.40 range) and covering a wide range of absorption and emission wavelengths. These indicators are often used as ratiometric (or dual) excitation or emission pH indicators because the absorption or emission profile of the fluorophore changes significantly with the pH. Given the importance of modulating the pK_a of phenol derivatives, finding new simple fluorescent structures containing a phenol group is of prime interest.

2-Dicyanomethylidene-3-cyano-4,5,5-trimethyl-2,5-dihydrofuran (TCF) is a strong electron-withdrawing group that has been extensively used in the design of highly active nonlinear

^aLaboratoire de Chimie de l'ENS de Lyon, CNRS UMR 5182, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Lyon I, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon cedex 07, France. E-mail: yann.bretonniere@ens-lyon.fr; Fax: +33-4-7272-8860; Tel: +33-4-7272-8399

^bInstitut de Génomique Fonctionnelle de Lyon, Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, INRA, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon cedex 07, France

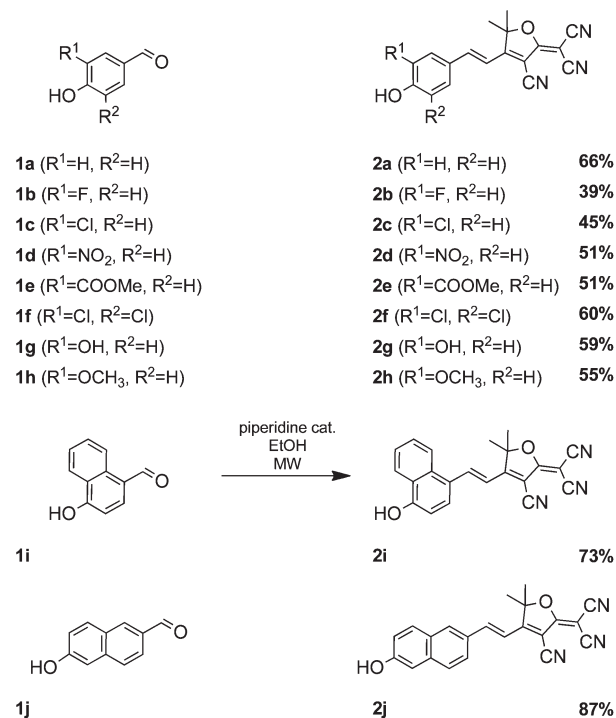
† Electronic supplementary information (ESI) available: Includes additional figures, full spectroscopic properties of compounds 2a–2j and complete NMR data for compounds 2a–2j. See DOI: 10.1039/c4ob00147h

optical materials.⁹ In comparison, only very few examples described its use in the design of red fluorescent probes for bioimaging, only in combination with *N,N*-dialkylanilino groups as electron-donating groups.¹⁰ Strong absorption, relatively high fluorescence quantum yield, and sensitivity of their fluorescence to the local environment make them interesting for single molecule imaging,^{10a,e} pH,¹¹ thiol^{10d} or K⁺ sensors.^{10f} TCF dyes containing other electron-donating groups such as methoxy have seldom been described. And yet, besides their highly environment sensitive optical properties, they have been shown to be more photostable than their *N,N*-dialkylanilino equivalents.¹² In this article we report the design, synthesis and study of the physical and optical properties of a new series of simple push-pull dipolar phenol derivatives **2a–2j** (Scheme 1) containing the 2-dicyanomethylidene-3-cyano-4,5,5-trimethyl-2,5-dihydrofuran (TCF) ring. These pH responsive dyes are fluorescent in both the acidic (neutral) and the basic (anionic) form and behave as selective fluorescent pH receptors in aqueous solutions.

Results and discussion

The synthesis of **2a–g** (Scheme 1) involved a simple Knoevenagel condensation between TCF and the corresponding aldehyde. This reaction was performed by controlled microwave irradiation in ethanol and in the presence of piperidine as a catalyst. The synthesis of TCF derivatives by microwave heating is well established and has been shown to give a better yield than traditional heating.¹³ Using this simple procedure allowed recovering the compounds by simple filtration from the reaction mixture in average to good yields (39 to 87%).

Table 1 contains the spectroscopic data for compounds **2a–2i**. The absorption spectra of **2a–2j** in DMSO–water mixtures (1/5 v/v) at low pH where only the phenol forms are present display a broad band characteristic of a charge transfer transition. Absorption maxima ranged from 414 nm for **2d** to 512 nm for **2i**. When compared to the simplest compound **2a**, introducing an electron-withdrawing group in the *ortho* posi-



Scheme 1 Synthesis of compounds **2a–2j**.

tion with respect to that of the phenol induced a hypsochromic shift in the absorption maxima (up to 34 nm for the nitro group in **2d**). However, elongation of the conjugated path (**2i–2j**) or introduction of the electron-donating group in the *ortho* position (**2g–2h**) was characterized by a bathochromic shift in the absorption maximum wavelength (up to 64 nm for compound **2i**).

The dramatic changes in the absorption spectra (Fig. 2a and 3a) observed when the pH is increased accounted for the formation of the phenoxide at higher pH (Scheme 2). The band centred around 460 nm gradually decreased and a new narrow absorption peak appeared whose maximum was

Table 1 Spectroscopic properties of compounds **2a–2j**

	Neutral form				Phenoxide			
	$\lambda_{\text{abs}} (\epsilon)^a$ nm (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	λ_{em}^a nm	$\Delta\lambda^c$ nm	Φ^d ($\epsilon\Phi$)	$\lambda_{\text{abs}} (\epsilon)^b$ nm (L mol ⁻¹ cm ⁻¹)	λ_{em}^b	$\Delta\lambda^c$ nm	Φ^e ($\epsilon\Phi$)
2a	448 (48 500)	563	115	0.011 (530)	588 (181 000)	614	26	0.002 (360)
2b	436 (39 400)	565	129	0.017 (670)	586 (238 000)	618	32	0.004 (950)
2c	438 (44 000)	560	122	0.015 (660)	584 (234 000)	619	35	0.007 (1640)
2d	414 (60 000)	542	128	0.015 (900)	537 (203 000)	614	77	0.053 (10 760)
2e	428 (43 200)	550	122	0.005 (215)	570 (201 000)	611	41	0.012 (2410)
2f	423 (31 600)	—	—	—	574 (254 000)	626	52	0.012 (3050)
2g	465 (56 600)	595	130	0.01 (570)	605 (165 000)	650	45	<0.005 (<825)
2h	462 (60 800)	598	136	0.05 (3040)	610 (134 000)	644	34	<0.002 (<270)
2i	512 (52 300)	634	122	0.035 (1830)	632 (101 000)	655	23	0.003 (300)
2j	465 (51 500)	648	183	0.099 (5100)	—	—	—	—

^a In water at pH = 2. ^b In water at pH = 10. λ_{exc} was set at the wavelength of the isosbestic point of the absorption-based pH titration. ^c Stokes shift. ^d Measured in DMSO using Coumarin 153 in methanol ($\Phi = 0.54$) as the reference. ^e Measured in DMSO using cresyl violet in methanol ($\Phi = 0.57$) as the reference.

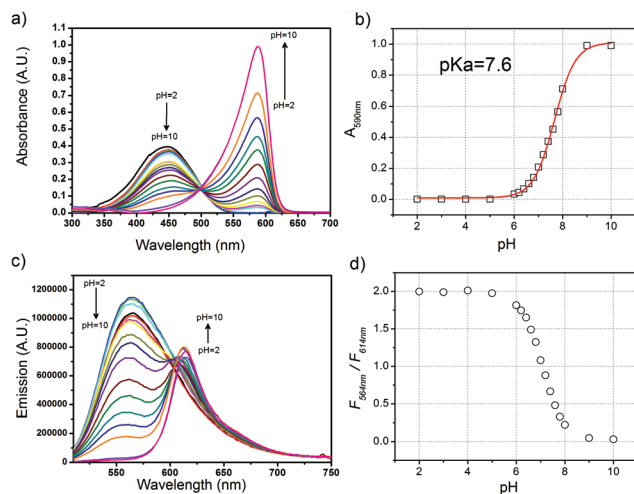


Fig. 2 (a) Absorption spectra of **2a** at different pH values in HEPES buffer. (b) Changes of the absorbance at 590 nm ($A_{590\text{ nm}}$) over the pH range 2–10 with non-linear least-square fit of the experimental data. (c) Emission spectra of **2a** at different pH in HEPES buffer ($\lambda_{\text{exc}} = 500\text{ nm}$). (d) Emission intensity ratio changes ($F_{554\text{ nm}}/F_{614\text{ nm}}$) over the pH range 2–10.

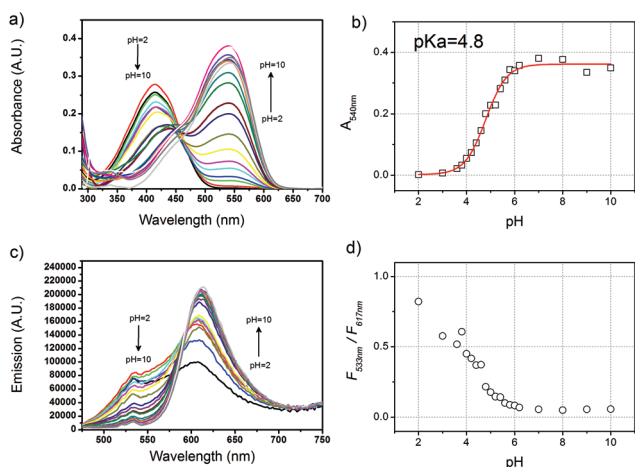
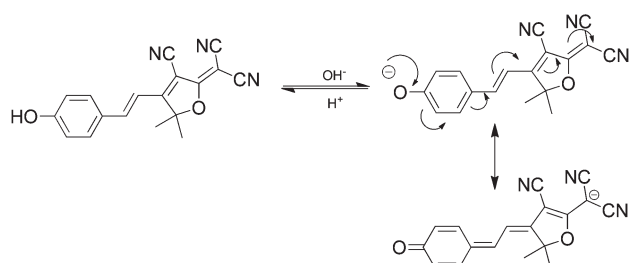


Fig. 3 (a) Absorption spectra of **2d** at different pH in HEPES buffer. (b) Changes of the absorbance at 540 nm ($A_{540\text{ nm}}$) over the pH range 2–10 with non-linear least-square fit of the experimental data. (c) Emission spectra of **2d** at different pH in HEPES buffer ($\lambda_{\text{exc}} = 455\text{ nm}$). (d) Emission intensity ratio change ($F_{533\text{ nm}}/F_{617\text{ nm}}$) over the pH range 2–10.



Scheme 2 pH modulated switching of **2a**.

considerably red-shifted compared to the neutral form. The absorption maxima now ranged from 537 nm for **2d**, 588 nm for the simplest compound **2a** up to 632 nm for **2i** with a naphthalene ring. The two bands interconverted with an isobestic point. The influence of the substituent on the absorption of the phenoxides was less pronounced than that for the neutral forms. Based on the absorption of **2a** only small hypsochromic shifts were observed. It has to be noted that for all compounds the molar absorption coefficient of the deprotonated form was much higher (around 5 times) than the protonated form (Table 1). The switch between the phenol and the phenoxide (Scheme 2) was fully reversible. The absorption of the phenol re-appeared upon re-acidification of the solution and no noticeable changes in the absorption of **2a** could be observed after 10 cycles between pH = 4 and pH = 10. $^1\text{H NMR}$ experiments confirmed the reversibility of the proton exchange (see ESI†).

Recording the absorption at various pH values enabled determining the pK_a values of all compounds by fitting by non-linear regression the sigmoid response of absorption value vs. pH according to eqn (1):

$$A = \frac{K_a \times A_F + 10^{-\text{pH}} \times A_0}{K_a + 10^{-\text{pH}}} \quad (1)$$

where A_F and A_0 are respectively the final (high pH) and the initial (low pH) absorption. The pK_a values obtained (Table 2) varied from 4.2 for **2f** to 8.9 for **2j**, spanning the intracellular pH range. As expected, installation of the electro-withdrawing group *ortho* to the hydroxy group induced a decrease of the pK_a value,¹⁴ the nitro substituted compound **2d** being almost 1000 times more acidic than the parent **2a**. Surprisingly, introduction of the OR (OH and OCH_3) electro-donating group *ortho* to the hydroxy group also induced a small decrease in the pK_a probably due to the inductive withdrawing effect of the O atom. Indeed a good correlation was found when plotting the pK_a value of all phenyl compounds (*i.e.* **2a–2h**, Fig. 4) vs. the Hammett σ_m value (Table 2) characteristic of the inductive effect of the substituent.¹⁵ The deviation observed for com-

Table 2 Hammett σ_m constant, pK_a and the excited state pK_a^* of compounds **2a–2j**

	Substituent group	σ_m^a	pK_a^b	pK_a^{*c}
2a	H	0	7.6	0.5
2b	F	0.34	6.4	-1.3
2c	Cl	0.37	6.0	-1.8
2d	NO_2	0.71	4.8	-3.3
2e	COOMe	0.37	7.2	-0.8
2f	Cl, Cl	0.74	4.2	—
2g	OH	0.12	6.9	0.2
2h	OCH_3	0.12	7.1	0.3
2i	—	—	5.3	0.9
2j	—	—	8.9	—

^a Substituent inductive value taken from ref. 15. ^b Values obtained from eqn (1) by non-linear least-square fitting of experimental data. ^c Values calculated according to eqn (2) and the experimental data from Table 1.

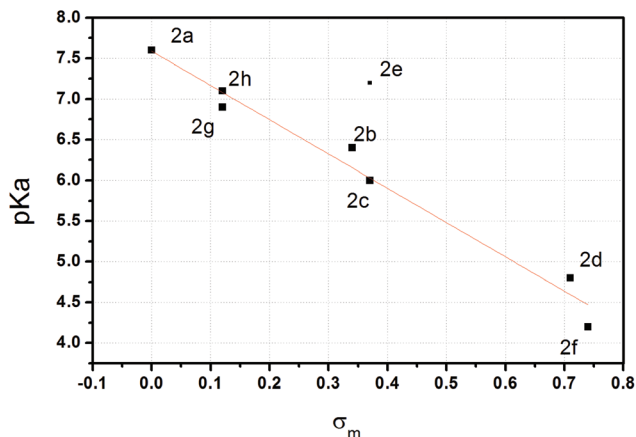


Fig. 4 Plot of pK_a as a function of σ_m for phenyl compounds **2a–2h** showing good correlation between the pK_a value and the inductive effect of the substituent. The solid line is the linear fit ($r = 0.971$).

Compound **2e** bearing an ester group can be explained by the presence of a five member hydrogen bonding between the OH group and the C=O bond of the ester that stabilizes the phenol and decreases its acidity.

The fluorescence properties of all compounds were also studied in water: first at low pH, where only the neutral form was present, and then the pH was increased. Significant differences were observed, depending on the nature of the substituent group. For the four compounds having the highest pK_a (**2a**, **2g**, **2h** and **2j**), as well as **2i**, low pH excitation at the wavelength of the isosbestic point of the absorption-based pH titration gave rise to a single emission (Fig. 2c, and SI-5 to SI-8†) attributed to the phenol. This emission was characterized by a large band with a red shift in the maxima and a large Stokes' shift increasing from 115 nm for **2a** up to 183 nm for **2j** with the presence of an *ortho*-electron-donating group. When the pH was increased, the emission of the phenoxide appeared as a narrow band with a small Stokes' shift. The only exception was **2j** for which the phenoxide was hardly fluorescent. The introduction of an electron donating group *ortho* to the phenol induced a considerable red shift in the emission of the phenoxide (up to 40 nm for **2g**).

For the other compounds with lower pK_a (*i.e.* **2b–2f**), excitation of the neutral form at low pH resulted in dual emission of phenol and phenoxide (Fig. 3c, and SI-1 to SI-4†). The emission of the phenol was also characterized by a large band and a large Stokes' shift, whereas the emission of the phenoxide ion was narrow and displayed a smaller Stokes' shift. The presence of an electron-withdrawing group *ortho* to the phenol induced a blue shift in the emission maxima of the phenol compared to **2a**, but a small increase in the Stokes' shift.

Contrary to what was recently reported for other phenol based fluorophores,¹⁶ for which two inflexion points corresponding to the ground state pK_a and the excited state pK_a (pK_a^*) were observed, for all compounds **2a–2j** a plot of the maximum intensities *vs.* pH displayed only one inflexion point (data not shown). Fitting gave pK_a values close to what was

obtained by fitting the absorption data. This is surprising because estimation of the excited state pK_a (pK_a^* , Table 2) using the Förster cycle equation¹⁷ (2):

$$pK_a - pK_a^* = \frac{hc(\tilde{\nu}_{Abs}^{ArOH} - \tilde{\nu}_{Abs}^{ArO^-} + \tilde{\nu}_{Em}^{ArOH} - \tilde{\nu}_{Em}^{ArO^-})}{2(2.303kT)} \quad (2)$$

where the terms $\tilde{\nu}$ represent the energy of the electronic transitions for the species ArOH and ArO[−] respectively, obtained from the maxima of the absorption and emission spectra at low and high pH given in Table 1, clearly differentiated strong photoacids (with $pK_a^* < 0$ for **2b–2e**) and weaker photoacids ($pK_a^* > 0$ for **2a**, **2g–2i**).

For all compounds, with the notable exception of **2d**, the fluorescence quantum yield of the neutral form was higher than that of the anionic form. The fluorescence quantum yields are rather low (the maximum is for **2j** with 9.9%), but the overall brilliance $\epsilon\Phi$ of these objects reaches 500 to 4000 L mol^{−1} cm^{−1}. Moreover, the study of the variation of fluorescence or fluorescence intensity ratios as a function of pH showed a good response around physiological pH, especially for probes **2a**, **2g** and **2h**. With an excitation at the wavelength of the isosbestic point, large ratio increases of the fluorescence intensity ratios R ($R_{pH=2}/R_{pH=8} = 70$ for the best compound **2a**) were determined between the two extreme pH values. As shown in Fig. 2d and 3d, the highest variation occurs around pH = 7, indicating that these dyes are well suited for imaging of intracellular pH with a ratiometric response in emission.

To determine whether these new dyes can be used in intracellular pH imaging, preliminary experiments were carried out with probes **2a** and **2g** using laser confocal scanning microscopy. These probes were excited at 488 nm or 514 nm respectively with an argon ion laser and showed well separated emissions from the protonated and deprotonated forms of the fluorophores for ratiometric emission experiments. Specifically, HeLa cells were incubated with 1 μ M compound **2a** (*resp.* **2g**) for 5 minutes. Good quality images were obtained upon excitation at 488 nm (*resp.* 514 nm) revealing that the two probes enter the cells immediately after loading (Fig. 5). Bright-field transmission measurements after dye incubation confirmed that the cells were viable. At physiological pH (pH = 7.4), the fluorescence could be detected in the green (500/550 nm for **2a** and 535/590 nm for **2g**) and the red (600/650 nm for **2a** and 650/710 nm for **2g** *resp.*) emission chan-

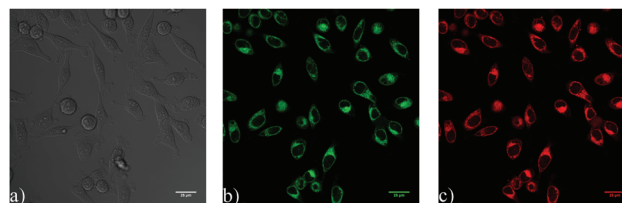


Fig. 5 Confocal images of HeLa cells incubated at pH = 7.4 and with 1 μ M **2a** for 5 minutes at 37 $^{\circ}$ C ($\lambda_{exc} = 488$ nm): (a) bright field; (b) green emission channel (500–550 nm); (c) red emission channel (600–650 nm); scale bar: 25 μ m.

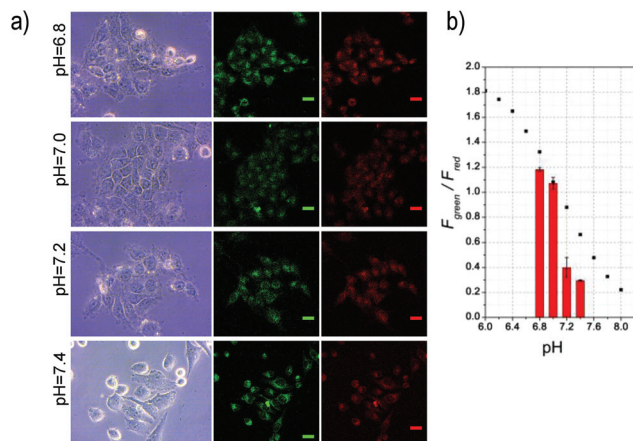


Fig. 6 (a) Confocal images of HeLa cells incubated at different pH and with 1 μM **2a** for 5 minutes at 37 °C ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$). From left to right: bright field, green emission channel (500–550 nm), red emission channel (600–650 nm); scale bar: 25 μm . (b) Evolution of the emission ratio $R = F_{\text{green}}/F_{\text{red}}$ as a function of pH. The black squares represent the emission ratio $F_{554 \text{ nm}}/F_{614 \text{ nm}}$ obtained from the titration (Fig. 1d).

nels, proving that the two forms exist in agreement with the measured $\text{p}K_{\text{a}}$. We then applied **2a** and **2g** to HeLa cells grown at different pH values (6.8 to 7.4) to observe the changes in fluorescence on the two channels. Bright-field transmission images confirmed the viability of cells after incubation even at lower pH (Fig. 6). Different areas of interest (ROI) were defined. The fluorescence intensity in the two channels in those ROI was measured to give the values of F_{green} and F_{red} . Similarly, fluorescence intensity ratios $R = F_{\text{green}}/F_{\text{red}}$ of 4 for **2a** and 2.7 for **2g** were obtained between pH = 6.8 and pH = 7.4 (Fig. 6b and SI-9†) closely matching the values obtained in solution (Fig. 2 and SI-5†). The data showed that these new probes strongly depend on pH and could distinguish near-neutral minor pH fluctuations in cells.

Conclusions

In conclusion, we developed a family of fluorescent push–pull pH-responsive probes based on TCF as a strong electron acceptor group. Small structural variations allowed fine tuning of the $\text{p}K_{\text{a}}$ between 4.8 and 8.9. In aqueous solution, the fluorescence showed remarkable changes in ratiometric response to small pH variations around neutrality with large emission shifts. The simple structure of these fluorophores allows further chemical functionalization for the targeting of specific subcellular compartments. Compound **2h**, in particular, having a $\text{p}K_{\text{a}}$ of 7.1 and a methoxy group that can easily be modified, looks rather interesting in that view.

Experimental section

Commercially available materials were used as received. Analytical thin-layer chromatography (TLC) was carried out on

a Merck 60 F₂₅₄ precoated silica gel plate (0.2 mm thickness). Visualization was performed using a UV lamp. Microwave syntheses were conducted in a 20 mL sealed tube on a Biotage Initiator 2.5 single-mode reactor using external IR temperature control. TCF (2-dicyanomethylidene-3-cyano-4,5,5-trimethyl-2,5-dihydrofuran) was synthesized according to a literature procedure.¹⁸ Melting points were recorded on a differential scanning calorimeter operating between 30 and 400 °C. NMR spectra were recorded at ambient temperature on a standard spectrometer operating at 500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C. Chemical shifts are given in parts per million (δ/ppm) and are reported relative to tetramethylsilane (¹H, ¹³C) using the residual solvent peaks as the internal standard. ¹H NMR splitting patterns are designated as singlet (s), doublet (d), triplet (t), quartet (q), dd (doublet of doublets) or m (multiplets). Infrared spectra (IR) were recorded on a FT-IR spectrophotometer and are reported as wavelength numbers (ν/cm^{-1}). Low resolution mass spectra were taken on a LC-MS instrument and high resolution mass spectra (HRMS) were recorded on an IF-TOF spectrometer.

Spectroscopy

Absorption spectra (UV-Vis) were recorded on a dual beam Jasco 670 spectrometer. Data are reported as absorption maximum wavelength ($\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$) and molar extinction coefficient at the absorption maximum wavelength ($\epsilon/L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Fluorescence spectra were performed on a Horiba Jobin-Yvon Fluorolog-3® spectrofluorimeter equipped with a red-sensitive Hamamatsu R928 photomultiplier tube. Spectra were reference corrected for both the excitation source light intensity variation (lamp and grating) and the emission spectral response (detector and grating).

Fluorescence quantum yields Φ were measured in diluted water solutions. Coumarin-153 in methanol ($\Phi = 0.54$)¹⁹ or Cresyl Violet in methanol ($\Phi = 0.57$)¹⁹ were used as the reference for the emission range 500–700 nm and 575–750 nm respectively. The sample and the reference are excited at the same wavelength (λ_{exc}). The quantum yield relative to the reference is given by eqn (3):

$$\Phi^{\text{S}} = \Phi^{\text{Ref}} \frac{S^{\text{S}}}{S^{\text{Ref}}} \times \left(\frac{n_{\text{d}}^{\text{S}}}{n_{\text{d}}^{\text{Ref}}} \right)^2 \quad (3)$$

where S is the slope obtained by plotting the integrated area under the fluorescence emission spectrum vs. the absorbance at λ_{exc} and n_{d} is the refractive index of the solvents. Super-scripts Ref and S correspond to the reference and the sample respectively. For each experiment 5 points were recorded, all corresponding to an absorbance at λ_{exc} below 0.1.

General procedure for the Knoevenagel reaction

The aldehyde **1** (1 mmol) and TCF (1.15 mmol, 230 mg) were dissolved in 10 mL of anhydrous ethanol in a 20 mL microwave vial. 2 drops of piperidine were added. The vial was sealed with a pressure septum and the mixture was irradiated by focused microwaves at 100 °C for 15 minutes by controlling

the temperature. After cooling, the precipitate was filtered off and washed with ethanol and cyclohexane to give the pure desired product.

2a. Yield: 66% (200 mg), orange solid. m.p. >260 °C. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ /ppm 10.57 (s, 1 H, OH), 7.86 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz), 7.77 (d, 2 H, $J = 8.4$ Hz), 6.98 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz), 6.86 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz), 1.74 (s, 6 H, $-\text{CH}_3$). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ /ppm 177.9, 176.5, 162.9, 148.9, 132.9 (2 C), 126.3, 117.0 (2 C), 113.5, 112.7, 112.3, 111.8, 99.6, 97.3, 53.8, 25.9 (2 C). Elemental analysis calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2$: C 71.28, H 4.32, N 13.85; found: C 71.92, H 4.46, N 13.88. MS (ES^-): m/z 302.0 for $[\text{M} - \text{H}]^-$. IR (KBr): ν/cm^{-1} 3366, 2224, 1554, 1524, 1380, 1281, 1211, 1162.

2b. Yield: 39% (125 mg), brown solid. m.p. >260 °C. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ /ppm 11.02 (s, 1 H, $-\text{OH}$), 7.89 (dd, 1 H, $J = 12.6$ Hz, $J = 1.5$ Hz), 7.85 (d, 1 H, $J = 16.3$ Hz), 7.58 (dd, 1 H, $J = 8.4$ Hz, $J = 1.5$ Hz), 7.08 (d, 1 H, $J = 16.3$ Hz), 7.05 (t, 1 H, $J = 8.4$ Hz), 1.77 (s, 6 H). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ /ppm 177.8, 175.9, 151.5 (d, 1 C, $J_{\text{C-F}} = 240$ Hz), 150.5 (d, 1 C, $J_{\text{C-F}} = 15$ Hz), 147.5, 128.8, 126.8 (d, 1 C, $J_{\text{C-F}} = 7$ Hz), 118.8 (d, 1 C, $J_{\text{C-F}} = 5$ Hz), 117.3 (d, 1 C, $J_{\text{C-F}} = 18$ Hz), 113.7, 113.4, 112.6, 111.7, 99.7, 97.9, 54.2, 25.8 (2 C). Elemental analysis calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{FN}_3\text{O}_2$: C, 67.29; H, 3.76; N, 13.08; found: C 67.28; H 4.10; N 13.00. MS (ES^-): m/z 320.0 (100%), 321.0 (20.6%) for $[\text{M} - \text{H}]^-$. IR (KBr): ν/cm^{-1} 3420, 2222, 1563, 1531, 1516, 1300, 1282, 1180, 1165, 1101.

2c. Yield: 45% (150 mg), orange solid. m.p. >260 °C. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ /ppm 11.28 (s, 1 H, $-\text{OH}$), 8.03 (d, 1 H, $J = 1.5$ Hz), 7.80 (d, 1 H, $J = 16.0$ Hz), 7.70 (dd, 1 H, $J = 8.4$ Hz, $J = 1.5$ Hz), 7.05 (d, 1 H, $J = 16.0$ Hz), 7.03 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz), 1.74 (s, 6 H, $-\text{CH}_3$). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ /ppm 177.8, 176.1, 157.7, 147.2, 132.2, 130.8, 127.4, 121.5, 117.7, 113.8, 113.4, 112.6, 111.6, 99.8, 98.4, 54.4, 25.8 (2 C). Elemental analysis calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{ClN}_3\text{O}_2$: C 64.01, H 3.58, N 12.44; found: C 64.18, H 3.69, N 12.11. MS (ES^-): m/z 336.0 (100%), 337.0 (19%), 338.0 (30%) for $[\text{M} - \text{H}]^-$. IR (KBr): ν/cm^{-1} 3307, 2237, 2225, 1556, 1513, 1414, 1385, 1298, 1278.

2d. Yield: 51% (178 mg), brown solid. m.p. >260 °C. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ /ppm 11.96 (s, 1 H, $-\text{OH}$), 8.50 (d, 1 H, $J = 1.8$ Hz), 8.08 (dd, 1 H, $J = 9.0$ Hz, $J = 1.8$ Hz), 7.86 (d, 1 H, $J = 16.6$ Hz), 7.16 (d, 1 H, $J = 9.0$ Hz), 7.12 (d, 1 H, $J = 16.6$ Hz), 1.76 (s, 6 H, $-\text{CH}_3$). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ /ppm 177.6, 175.6, 155.9, 146.1, 138.2, 135.2, 128.3, 126.1, 120.6, 115.0, 113.3, 112.5, 111.3, 99.9, 99.6, 54.7, 25.8. Elemental analysis calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_4$: C 62.07, H 3.47, N 16.09; found: C 61.92, H 3.62, N 16.11. MS (ES^-): m/z 347.0 for $[\text{M} - \text{H}]^-$. IR (KBr): ν/cm^{-1} 3257, 2233, 1579, 1544, 1531, 1311, 1168.

2e. Yield: 51% (184 mg), red solid. m.p. >260 °C. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ /ppm 11.12 (s, 1 H, $-\text{OH}$), 8.29 (d, 1 H, $J = 2.3$ Hz), 8.15 (dd, 1 H, $J = 8.4$ Hz, $J = 2.3$ Hz), 7.94 (d, 1 H, $J = 16.5$ Hz), 7.12 (d, 1 H, $J = 16.5$ Hz), 7.11 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz), 3.92 (s, 3 H, $-\text{O}-\text{CH}_3$), 1.80 (s, 6 H, $-\text{CH}_3$). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ /ppm 177.7, 176.1, 168.4, 163.2, 147.2, 135.1, 134.5, 126.6, 119.4, 114.1, 115.6, 113.3, 112.5, 111.5, 99.9, 99.1, 54.5, 53.2, 25.8 (2 C). Elemental analysis calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4$:

C 66.48, H 4.18, N 11.63; found: C 65.95, H 4.23, N 11.71. MS (ES^-): m/z 360.1 for $[\text{M} - \text{H}]^-$. IR (KBr): ν/cm^{-1} 3448, 3235, 2231, 2215, 1685, 1575, 1529, 1319, 1216.

2f. Yield: 60% (223 mg), orange solid. m.p. >260 °C. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ /ppm 8.08 (s, 2 H), 7.76 (d, 1 H, $J = 16.6$ Hz), 7.21 (d, 1 H, $J = 16.6$ Hz), 1.77 (s, 6 H, $-\text{CH}_3$). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ /ppm 177.7, 175.5, 145.5, 130.5 (2 C), 127.9, 123.4 (2 C), 115.4, 113.3, 112.8, 112.5, 111.3, 101.9, 99.8, 54.8, 25.7 (2 C). Elemental analysis calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_2$: C 58.08, H 2.98, N 11.29; found: C 57.92; H 3.45; N 11.22. MS (ES^-): m/z 370.0 (100%), 371.0 (19%), 372.0 (67%) for $[\text{M} - \text{H}]^-$. IR (KBr): ν/cm^{-1} 3364, 2233, 2212, 1573, 1561, 1525, 1411, 1286.

2g. Yield: 59% (188 mg), dark red solid. m.p. >260 °C. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ /ppm 10.26 (s, 1 H), 9.46 (s, 1 H), 7.83 (d, 1 H, $J = 16.2$ Hz), 7.31 (d, 1 H, $J = 2.0$ Hz), 7.28 (dd, 1 H, $J = 8.0$ Hz, $J = 2.0$ Hz), 6.90 (d, 1 H, $J = 16.2$ Hz), 6.86 (d, 1 H, $J = 8.0$ Hz), 1.77 (s, 6 H, $-\text{CH}_3$). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ /ppm 177.8, 176.3, 152.1, 149.3, 146.7, 126.8, 125.4, 116.8, 115.6, 113.6, 112.7, 112.1, 111.9, 99.5, 97.0, 53.5, 25.9 (2 C). Elemental analysis calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3$: C 67.71, H 4.10, N 13.16; found: C 67.60, H 4.11, N 13.15. MS (ES^-): m/z 318.0 $[\text{M} - \text{H}]^-$. IR (KBr): ν/cm^{-1} 3444, 3324, 2242, 2224, 1572, 1519, 1444, 1287, 1192, 1149.

2h. Yield: 55% (183 mg), brown solid. m.p. >260 °C. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ /ppm 10.30 (s, 1 H), 7.88 (d, 1 H, $J = 16.2$ Hz), 7.50 (s, 1 H), 7.42 (d, 1 H, $J = 8.2$ Hz), 7.04 (d, 1 H, $J = 16.2$ Hz), 6.90 (d, 1 H, $J = 8.2$ Hz), 3.87 (s, 1 H, $-\text{OCH}_3$), 1.79 (s, 6 H, $-\text{CH}_3$). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ /ppm 177.9, 176.4, 152.7, 149.4, 148.8, 126.8, 126.1, 116.7, 113.5, 113.3, 112.7, 112.5, 111.8, 99.6, 96.9, 56.4, 53.7, 25.9 (2 C). Elemental analysis calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3$: C 68.46, H 4.54, N 12.61; found: C 68.81, H 4.66, N 12.65. MS (ES^-): m/z 332.1 for $[\text{M} - \text{H}]^-$. IR (KBr): ν/cm^{-1} 3405, 2224, 1568, 1506, 1437, 1301, 1287.

2i. Yield: 73% (258 mg), violet solid. m.p. >260 °C. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ /ppm 11.56 (s, 1 H, $-\text{OH}$), 8.84 (d, 1 H, $J = 15.8$ Hz), 8.34 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz), 8.26 (d, 1 H, $J = 7.8$ Hz), 8.22 (d, 1 H, $J = 7.8$ Hz), 7.72 (t, 1 H, $J = 7.8$ Hz), 7.58 (t, 1 H, $J = 7.8$ Hz), 7.22 (d, 1 H, $J = 15.8$ Hz), 7.07 (d, 1 H, $J = 8.4$ Hz), 1.80 (s, 6 H, $-\text{CH}_3$). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ /ppm 178.1, 176.3, 160.3, 144.0, 133.8, 130.5, 129.4, 126.2, 125.1, 123.8, 122.8, 122.0, 113.7, 113.3, 112.9, 112.8, 110.2, 99.6, 95.3, 53.4, 25.7 (2 C). Elemental analysis calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$: C 74.68, H 4.28, N 11.89; found: C 73.62, H 4.41, N 11.97. MS (ES^-): m/z 352.1 for $[\text{M} - \text{H}]^-$. IR (KBr): ν/cm^{-1} 3280, 2228, 2209, 1540, 1510, 1377, 1354, 1262, 1218, 1189.

2j. Yield: 87% (307 mg), brown solid. m.p. >260 °C. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ /ppm 10.27 (s, 1 H, $-\text{OH}$), 8.27 (s, 1 H), 8.05 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz), 7.92 (d, 1 H, $J = 8.6$ Hz), 7.86 (d, 1 H, $J = 8.7$ Hz), 7.75 (d, 1 H, $J = 8.6$ Hz), 7.21 (d, 1 H, $J = 16.4$ Hz), 7.15 (d, 1 H, $J = 2.5$ Hz), 7.13 (dd, 1 H, $J = 8.7$ Hz, $J = 2.5$ Hz), 1.78 (s, 6 H, $-\text{CH}_3$). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6): δ /ppm 177.8, 176.0, 158.8, 148.8, 137.4, 133.7, 131.8, 129.6, 127.9, 127.8, 124.6, 120.3, 114.4, 113.4, 112.6, 111.8, 109.9, 99.9, 98.3, 54.2, 25.7 (2 C). Elemental analysis calcd for

C₂₂H₁₅N₃O₂: C 74.68, H 4.28, N 11.89; found: C 73.92, H 4.30, N 11.73. MS (ES⁻): *m/z* 352.1 for [M - H]⁻. IR (KBr): ν/cm^{-1} 3357, 2225, 1560, 1525, 1478, 1375, 1294, 1160.

Determination of pK_a by spectrophotometric pH titration

10⁻³ M stock solutions in DMSO of compounds **2a–2j** were prepared and kept in the dark in the fridge. 0.1 M NaCl–0.1 M HEPES buffer solutions were prepared by adjusting the pH to a given value with either 1 M HCl (for pH = 2 to 7.4) or 1 M NaOH (for pH 7.6 to 10). Titration solutions were prepared by mixing 20 μL of compound **2a–2j** stock solution, 500 μL DMSO to ensure total solubility and 2.0 mL of the buffered solution to obtain a final concentration of 8×10^{-6} M. The absorption spectrum of each batch was then recorded.

The variation of the absorbance *A* at the wavelength of the maximum absorption of the phenolate ($A_{\text{max}}^{\text{ArO}^-}$) was plotted as a function of pH. The sigmoid curve obtained was fitted using a least square nonlinear regression analysis according to eqn (1). The only adjustable parameter in eqn (1) was *K*_a.

The same experiment was done recording the emission of fluorescence. The excitation wavelength was set at the wavelength of the isosbestic point obtained in the absorption titration. Full titration data (absorption and emission) are given in Fig. 2, 3 and Fig. SI-1 to SI-8.†

Cellular confocal imaging at various pH values

Fluorescence imaging was performed using a Zeiss LSM510 confocal microscope and an argon laser at 488 nm for the excitation of compound **2a** and at 514 nm for the excitation of compound **2g**.

Light was reflected by a dichroic mirror (HFT488/561 for **2a** and 458/514 for **2g**), and directed toward the sample using an A-Plan 40 \times Zeiss objective (NA = 0.65). The emitted fluorescence was collected by the objective, passed through the dichroic mirror, a long-pass filter (490 nm for **2a** and **2g**) and an emission band-pass filter defining the “green” (500–550 nm for **2a** and 535–590 nm for **2g**) and “red” channels (600–650 nm for **2a** and 650–710 nm for **2g**) before the detector. Each fluorescence image is the average of four pictures and was recorded with the LSM5 software.

Cell culture. HeLa (ATCC-CL-2) cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, Life Technologies, Courtaboeuf, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Life Technologies) and maintained at 37 °C with a 5% CO₂ atmosphere. Cells were seeded on Labtech (10 000 per chamber) 12 hours before experiment. Four hours before imaging, the medium was removed and replaced by DMEM without phenol red (Life Technologies) at an appropriate pH (*i.e.* 7.4, 7.2, 7 or 6.8). Probe **2a** or **2g** (1 μM) was added 1 minute before imaging, and fluorescence images were acquired without washing.

Notes and references

- M. D. Liptak, K. C. Gross, P. G. Seybold, S. Feldgus and G. C. Shields, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 6421–6427.
- J. Han and K. Burgess, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 2709–2728.
- I. Kurtz and R. S. Balaban, *Biophys. J.*, 1985, **48**, 499–508.
- Z. Zhujun and W. R. Seitz, *Anal. Chim. Acta*, 1984, **160**, 47–55.
- T. I. Rink, R. Y. Tsien and T. Pozzan, *J. Cell Biol.*, 1982, **95**, 189–196.
- J. E. Whitaker, R. P. Haugland and F. G. Prendergast, *Anal. Biochem.*, 1991, **194**, 330–344.
- Y. Yang, M. Lowry, X. Xu, J. O. Escobedo, M. Sibrian-Vazquez, L. Wong, C. M. Schowalter, T. J. Jensen, F. R. Fronczek, I. M. Warner and R. M. Strongin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, **105**, 8829–8834.
- E. Nakata, Y. Nazumi, Y. Yukimachi, Y. Uto, H. Maezawa, T. Hashimoto, Y. Okamoto and H. Hori, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011, **21**, 1663–1666.
- C. Zhang, L. R. Dalton, M.-C. Oh, H. Zhang and W. H. Steier, *Chem. Mater.*, 2001, **13**, 3043–3050.
- (a) K. A. Willets, O. Ostroverkhova, M. He, R. J. Twieg and W. E. Moerner, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 1174–1175; (b) S. Y. Nishimura, S. J. Lord, L. O. Klein, K. A. Willets, M. He, Z. Lu, R. J. Twieg and W. E. Moerner, *J. Phys. Chem. B*, 2006, **110**, 8151–8157; (c) S. J. Lord, N. R. Conley, H.-I. D. Lee, R. Samuel, N. Liu, R. J. Twieg and W. E. Moerner, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 9204–9205; (d) J. Bouffard, Y. Kim, Timothy M. Swager, R. Weissleder and S. A. Hilderbrand, *Org. Lett.*, 2008, **10**, 37–40; (e) S. J. Lord, N. R. Conley, H.-I. D. Lee, S. Y. Nishimura, A. K. Pomerantz, K. A. Willets, Z. Lu, H. Wang, N. Liu, R. Samuel, R. Weber, A. Semyonov, M. He, R. J. Twieg and W. E. Moerner, *ChemPhysChem*, 2009, **10**, 55–65; (f) X. Zhou, F. Su, Y. Tian, C. Youngbull, R. H. Johnson and D. R. Meldrum, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 18530–18533.
- (a) Y. Jin, Y. Tian, W. Zhang, S.-H. Jang, A. K.-Y. Jen and D. R. Meldrum, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **398**, 1375–1384; (b) Y.-A. Son, S.-Y. Gwon, S.-Y. Lee and S.-H. Kim, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2010, **75**, 225–229.
- E. Font-Sanchis, R. E. Galian, F. J. Céspedes-Guirao, Á. Sastre-Santos, L. R. Domingo, F. Fernández-Lázaro and J. Pérez-Prieto, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2010, **12**, 7768–7771.
- (a) D. Villemin and L. Liao, *Synth. Commun.*, 2001, **31**, 1771–1780; (b) S. Liu, M. A. Haller, H. Ma, L. R. Dalton, S.-H. Jang and A. K.-Y. Jen, *Adv. Mater.*, 2003, **15**, 603–607.
- M. Baruah, W. Qin, N. Basarić, W. M. De Borggraeve and N. Boens, *J. Org. Chem.*, 2005, **70**, 4152–4157.
- C. Hansch, A. Leo and R. W. Taft, *Chem. Rev.*, 1991, **91**, 165–195.
- M. S. Baranov, K. A. Lukyanov, A. O. Borissova, J. Shamir, D. Kosenkov, L. V. Slipchenko, L. M. Tolbert, I. V. Yampolsky and K. M. Solntsev, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 6025–6032.

- 17 A. Weller, *Z. Elektrochem.*, 1952, **56**, 662–668.
- 18 G. Koeckelberghs, S. Sioncke, T. Verbiest, A. Persoons and C. Samyn, *Polymer*, 2003, **44**, 3785–3794.
- 19 (a) N. Boens, W. Qin, N. Basarić, J. Hofkens, M. Ameloot, J. Pouget, J.-P. Lefèvre, B. Valeur, E. Gratton, M. vandeVen, N. D. J. Silva, Y. Engelborghs, K. Willaert, A. Sillen, A. J. W. G. Visser, A. van Hoek, J. R. Lakowicz, H. Malak, I. Gryczynski, A. G. Szabo, D. T. Krajcarski, N. Tamai and A. Miura, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 2137–2149; (b) K. Rurack and M. Spieles, *Anal. Chem.*, 2011, **83**, 1232–1242.