



Développement de nouveaux chromophores dipolaires pour l'imagerie de fluorescence et l'imagerie photoacoustique

Maxime Rémond

► To cite this version:

Maxime Rémond. Développement de nouveaux chromophores dipolaires pour l'imagerie de fluorescence et l'imagerie photoacoustique. Chimie organique. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSEN062 . tel-02918166

HAL Id: tel-02918166

<https://theses.hal.science/tel-02918166>

Submitted on 20 Aug 2020

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.



Numéro National de Thèse : 2018LYSEN062

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée par

l'Ecole Normale Supérieure de Lyon

Ecole Doctorale N° 206

École Doctorale de Chimie (CHIMIE, PROCÉDÉS, ENVIRONNEMENT)

Discipline : CHIMIE

Soutenue publiquement le 31/10/2018, par :

Maxime RÉMOND

Développement de nouveaux chromophores dipolaires pour l'imagerie de fluorescence et l'imagerie photoacoustique

Design and synthesis of new dipolar chromophores for fluorescence imaging and photoacoustic imaging

Devant le jury composé de :

Mme Elena ISHOW, Professeure des universités, Université de Nantes

M. Cyrille SABOT, Chargé de recherche, Université de Rouen

M. Andrey KLYMCHENKO, Directeur de recherche Université de Strasbourg

M. Boudewijn VAN DER SANDEN, Chargé de recherche INSERM, Grenoble

Mme Chantal ANDRAUD, Directrice de recherche, ENS de Lyon

M. Yann BRETONNIERE, Chargé de recherche, ENS de Lyon

Rapporteure

Rapporteur

Examineur

Membre Invité

Directrice de thèse

Co-encadrant de thèse

Table des matières

Remerciements	4
Abréviations	6
Introduction générale	9
Chapitre I. Introduction à l'imagerie optique	11
A. Principes d'absorption et de fluorescence	11
1. Absorption	11
2. Luminescence	17
3. Fluorophores à transfert de charge	18
4. Fluorescence à l'état solide	24
5. Fluorescence solide dans la littérature et au laboratoire	34
B. Dipôles pour l'imagerie de fluorescence	45
1. Fenêtre de transparence biologique	45
2. Intérêt de l'excitation biphotonique pour l'imagerie de fluorescence	47
3. Intérêt des dipôles pour l'imagerie de fluorescence	49
C. Dipôles pour l'imagerie photoacoustique	50
1. Phénomène photoacoustique	50
2. Agents de contraste exogènes pour l'imagerie photoacoustique	56
D. Objectifs de cette thèse	75
Chapitre II. Synthèse de nouveaux fluorophores émissifs à l'état solide dans la fenêtre biologique	77
A. Un groupement triphénylphosphine comme donneur	77
1. L'utilisation de phosphore dans la littérature	77
2. Synthèse des chromophores	83
3. Propriétés spectroscopiques	86
4. Rationalisation des propriétés	91
5. Stabilité	98
6. Bilan	98
B. Un nouveau groupement électroaccepteur	99
1. Nouveaux accepteurs et nouveaux chromophores	99

2. Propriétés optiques en solution	109
3. Fluorescence à l'état solide	119
4. Et le sulfoxyde ?	129
5. Bilan	137
C. Extension du pont conjugué	138
1. Quelques exemples de ponts conjugués dans la littérature	138
2. Cible et synthèse	141
3. Propriétés optiques	147
4. Conclusion	152
D. Bilan général	153
Chapitre III. Formulation des colorants en nanoparticules pour l'imagerie de fluorescence.....	155
A. Nanoagrégats et nanoparticules au laboratoire.....	155
1. Synthèse et propriétés des nanoagrégats.....	156
2. Transfert d'énergie résonant de type Förster	157
3. Synthèse et propriétés de nanoparticules pluronic/silice.....	159
B. Optimisation de la synthèse des nanoagrégats et imagerie cellulaire	162
1. Molécule modèle pour optimisation	162
2. Influence de la fraction volumique acétone/eau	163
3. Influence de la concentration initiale de colorant	166
4. Bilan	168
C. Propriétés optiques des chromophores en agrégats	169
1. Propriétés spectroscopiques des chromophores en mélanges acétone/eau	170
2. Synthèse de nanoagrégats pour l'imagerie cellulaire	173
3. FRET	178
D. Nanoparticules pluronic/silice pour l'angiographie.....	185
1. Chromophores SPh et SO2Ph	185
2. Chromophores basés sur un dithiénopyrrole.....	187
3. Imagerie cellulaire	188
E. Bilan	189
Chapitre IV. Chromophores pour l'imagerie photoacoustique	191
A. Synthèse de nouveaux chromophores	191
1. Objectifs.....	191

2. Monothiophène.....	192
3. Bithiophène	200
4. Bilan	209
B. D'anciens colorants pour une nouvelle application.....	209
1. Présentation des chromophores	209
2. Propriétés optiques en solution	210
C. Imagerie photoacoustique.....	211
1. Présentation du microscope PA	211
2. Premiers essais	212
3. Concentration des agrégats.....	216
4. Imagerie PA de circuits de microfluidique.....	219
5. Imagerie PA <i>in vivo</i>	223
6. Bilan	228
Chapitre V. Conclusions et perspectives	231
Chapitre VI. Partie expérimentale	235
A. Synthesis	235
1. General information	235
2. General procedure A for Knoevenagel condensations	235
3. Synthesis and characterisation.....	236
B. Nanoparticles and nanoaggregates synthesis and characterization	272
1. Preparation of aggregates	272
2. Preparation of pluronic/silica nanoparticles	274
C. Spectroscopy	274
1. Fluorescence quantum yields in solution	274
2. Fluorescence quantum yields in solid	275
3. Solvatochromism	276
4. Fluorescence study in Acetone/water mixtures	276
D. Imaging.....	276
1. Cells imaging with aggregates	276
2. Cell imaging with the F127-SiO ₂ NPs	277
3. Photoacoustic imaging	277
E. X-ray Crystallography	278
Références	286

Remerciements

Au cours de ces trois années au laboratoire de chimie de l'ENS de Lyon, de nombreuses personnes m'ont accueilli, aidé, encouragé, supporté et m'ont permis de passer trois excellentes années. Je souhaiterais prendre un moment pour les remercier.

En premier lieu, je tiens à remercier chaleureusement les membres de mon jury et en particulier mes rapporteurs, Prof. Elena Ishow ainsi que Dr. Cyrille Sabot, pour avoir accepté d'examiner minutieusement mon manuscrit. Je souhaiterais aussi remercier les autres membres de mon jury, Dr. Andrey Klymchenko ainsi que Dr. Boudewijn van der Sanden.

Ensuite, je voudrais remercier Yann Bretonnière et Chantal Andraud pour leur encadrement pendant ces trois années. Merci pour tout ce que j'ai appris à vos côtés pendant cette thèse, merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir laissé essayer toutes mes idées. Dans un futur proche, j'espère pouvoir vous raconter la suite de mes aventures au détour d'une conf ou d'une collab.

Outre mes encadrants, de nombreuses personnes m'ont formé ou aidé pendant ma thèse. Un grand merci à Nathalie Calin et Erwann Jeanneau pour la résolution de structures DRX ; Frédéric Lerouge pour tes réponses à toutes mes questions sur la DLS ainsi que pour les observations au MEB ; Denis Château pour les nombreuses discussions sur la stabilisation des nanoparticules ; Laure Guy, Corentin et Mathieu ainsi que le CCSM pour la masse basse et haute résolution ; Sandrine Denis-Quanquin pour ton expertise sur la RMN et pour ton aide précieuse pour résoudre les puzzles de mes produits secondaires ; Jean-Christophe et Delphine pour leur conseils de synthèse ainsi que pour leur implication dans la vie du labo ; Tanguy Le Bahers et Pauline pour les calculs de DFT et TD-DFT ; Christophe Bucher pour la voltamétrie cyclique ; Noëlle Lascoux, Akos Banyasz et Patrice Baldeck pour les mesures d'absorption à deux photons ; et enfin, merci à Christophe Chamot et à Damien pour l'imagerie cellulaire. Je souhaiterais également remercier les personnes hors ENS qui ont collaboré avec nous et qui permettent de donner des applications aux chromophores que j'ai synthétisé : Boudewijn van der Sanden et Oliver Hugon pour l'imagerie photoacoustique, le groupe d'Eunkyoung Kim pour les cellules électroluminescentes et, plus récemment, Emmanuel Beaurepaire et Júlia pour les premiers essais d'absorption à trois photons.

Merci aussi à tous les membres de Chimie Pour l'Optique pour ces trois années de discussions lors des group meetings ainsi que pour leurs réponses à mes nombreuses questions en spectro. En particulier, merci à Olivier pour avoir transmis ma candidature à Yann.

Par ailleurs, j'aimerais remercier le laboratoire de chimie dans son ensemble pour son accueil, pour les discussions et les moments de rigolade pendant les pauses-repas, les pots, les vendredi soirs au Ninka, les barbecues et autres occasions festives. Un grand merci à ceux qui ont été là pour moi quand je suis arrivé et notamment Corentin, pour ton accueil, ta générosité et ta bonne humeur pendant ces deux années passées ensemble (on aura eu du mal à te faire partir) ; Shuai et Zheng pour avoir été de formidables co-labos pendant ma première année ; Laure-lise et Maëlle, entre autres, pour ces fêtes de la science superbement organisées ; l'ancienne team LR4 : Anh-Thy, Margaux, Sebastiano, Cristina, Christelle. Et bien sûr aux autres : Paul, Bastien, Romain et le reste du LR6 et ceux que j'oublie. Merci aussi aux nouveaux arrivants qui ont su apporter un nouveau souffle dans la vie du laboratoire. En particulier, Mathieu pour la verdure du bureau mais aussi pour m'avoir aidé à faire tourner en bourrique ce cher

Corentin, je vous souhaite de bonnes parties de PhDictionary avec ce manuscrit (la plus haute probabilité c'est fluorescen* avec 521 occurrences) ; La futur Dr. Octavie, qui fait quasiment partie du labo ; F. X. et Sylvain, toujours partants pour aller boire une bière ; Delphine avec qui on se suit depuis la prépa ; Saskia, I hope you're having a wonderful time back in Spain; Orsola, for the arabic pastries ; Caroline, pour les retours de soirée à pied après avoir loupé le dernier ou premier tram ; Jean, pour ces apéros questions pour un champion ; Damien, pour ta mauvaise foi sur les importances respectives de la chimie et de la bio ; Guillaume, j'espère que tu vas réussir à supporter ce bureau ; Jérémy, courage ! Je suis certain qu'un jour tu arriveras à sortir une sonde ; Quentin, merci pour tous tes conseils de rédaction ; Alix, bon courage pour supporter tes co-bureaux, Alex pour toutes les soirées que tu as organisées... Mais aussi tous les autres qui ont permis/permettent toujours de ne jamais s'ennuyer : Déborah, Niki, Amadine, Léa, Florence, Clément, Tingting, Andy, Shagor, Paul, Antton, Szilvia, Lilian, Bruno, Ruben, Vincent (dans le désordre) et ceux que j'aurais oublié car j'ai procrastiné ces remerciements jusqu'au dernier moment... And last but not least, I would like to thanks Lulu, Mohamad-Jamal and Yuguo for their internships in our team. Thanks Lulu for all your work and for continuing my projects. I hope you will have a wonderful time in France and in the lab!

Je n'oublie pas non plus le département de chimie. Merci de m'avoir donné l'opportunité d'enseigner pendant ma thèse.

Ces trois années ne se sont pas limitées à l'ENS. Je tiens à remercier tout d'abord ma famille, à qui je ne donne pas assez de nouvelles, en particulier mes parents pour leur soutien ainsi que pour la relecture de mon manuscrit et l'aide à la préparation du pot. Je voudrais aussi remercier mes amis, Mika et J. B., Axel et Yan, Thomas, Alex, Thibault, Kevin et Maija, Bertrand, Criska... que je ne vois définitivement pas assez. Un merci tout particulier à Margaux pour tous les merveilleux moments passés en vacances aux quatre coins du monde, en week-end entre Lyon et Bures ou encore à discuter chimie et labos à 2 heures du matin. Je te souhaiterais bien bonne chance pour l'Autriche, mais je sais déjà que tu vas tout déchirer.

Enfin, merci à Emil Knoevenagel, sans qui cette thèse n'aurait pas été possible... ou alors aurait impliqué un bon paquet de métathèses ou de réactions de Wittig.

Abréviations

2PEF : fluorescence excitée à deux photons (two photon excited fluorescence)

A : accepteur

ACQ : extinction de fluorescence par agrégation (aggregation-caused quenching)

ADP : absorption à deux photons

AIE : émission induite par agrégation (aggregation-induced emission)

AIEE : accroissement de l'émission induite par agrégation (aggregation-induced emission enhancement)

AR-PAM : microscopie photoacoustique à résolution acoustique (acoustic resolution photoacoustic microscopy)

ATP : absorption à trois photons

BLA : alternance de longueur de liaisons simples et doubles (bond length alternation)

GSH : génération de seconde harmonique

GTH : génération de troisième harmonique

CI : conversion interne

D : donneur

DCM : dichlorométhane

DCC : *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide

DIPE : diisopropylether

DLS : diffusion dynamique de la lumière (dynamic light scattering)

DMF : *N,N*-diméthylformamide

DMSO : diméthylsulfoxyde

DRX : diffraction des rayons X

EtOAc : acétate d'éthyle

EtOH : éthanol

FDA : agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (food & drug administration)

FRET : transfert d'énergie résonant de type Förster (Förster resonance energy transfer)

FON : nanoagrégats organiques fluorescents (fluorescent organic nanoparticles)

GM : Göppert-Mayer

HOBt : hydroxybenzotriazole

HOMO : orbitale la plus haute occupée (highest occupied molecular orbital)

LE : état localement excité, état Franck-Condon (Locally excited state)

IC : intersection conique

ICG : indocyanine green

IR : infrarouge

LUMO : orbitale vacance la plus basse (lowest unoccupied molecular orbital)

MEB : microscope électronique à balayage

MET : microscopie électronique en transmission (transmission electron microscopy)

MeOH : méthanol

MW : micro-onde (microwave)

MWCNT : nanotubes de carbone multiple-feuillets (multiple walls carbon nanotubes)

NIR : proche infrarouge (near infrared)

NP(s) : nanoparticule(s)

OLEDs : diodes électroluminescentes organiques (organic light emitting diodes)

OLEFETs : transistors à effet de champs électroluminescents organiques (organic light emitting field-effect transistors)

ONL : optique non-linéaire

OR-PAM : microscopie photoacoustique à résolution optique (optical resolution photoacoustic microscopy)

PA : photoacoustique

PAM : microscopie photoacoustique (photoacoustic microscopy)

PBS : tampon phosphate salin (phosphate buffered saline)

Pc(s) : phtalocyanine(s)

PEG : polyéthylèneglycol

QM : quinoline-malononitrile

RT/TA : température ambiante (room temperature)

ROI : région d'intérêt (region of interest)

ROS : espèces oxygénées réactives (reactive oxygen species)

SWCNT : nanotubes de carbone simple-feuillets (single wall carbon nanotubes)

SLE : accroissement de luminescence à l'état solide (solid-state luminescence enhancement)

TCF : tricyanofurane

TEOS : orthosilicate de tétraéthyle (tetraethyl orthosilicate)

TICT : transfert de charge intramoléculaire tordu (twisted intramolecular charge transfert)

TPE : tetraphényléthylène

THF : tétrahydrofurane

UV : ultraviolet

Introduction générale

Cette thèse est consacrée à la synthèse et à l'étude de nouveaux chromophores dipolaires D- π -A pour l'imagerie de fluorescence, ainsi que pour l'imagerie photoacoustique. Les chromophores dipolaires mettent en jeu un transfert de charge intramoléculaire entre un groupement donneur et un groupement accepteur reliés par un pont π conjugué. Ils présentent de nombreuses propriétés intéressantes pour l'imagerie, notamment de forts déplacements de Stokes, des propriétés optiques sensibles à leur environnement ainsi que des sections efficaces d'absorption à deux photons élevées. Ce manuscrit est séparé en deux parties. La première traite de l'utilisation de ces chromophores en imagerie de fluorescence à excitation biphotonique et la deuxième se concentre sur des dipôles destinés à l'imagerie photoacoustique.

Dans le Chapitre I, nous présenterons les principes de l'absorption et de la fluorescence. Nous insisterons sur la fluorescence à l'état solide qui permet de nombreuses applications, notamment la conception de nanoparticules fluorescentes pour l'imagerie. Enfin, nous détaillerons les deux applications visées et nous donnerons un aperçu détaillé des chromophores décrits dans la littérature pour la fluorescence à l'état solide ou pour l'imagerie photoacoustique.

Le Chapitre II concerne la synthèse de nouveaux chromophores émettant à l'état solide dans le rouge lointain et dans le proche infrarouge. Afin d'exalter la fluorescence à l'état solide, nous avons modifié le donneur, l'accepteur ou le pont π conjugué en introduisant des groupements encombrants pour diminuer les interactions intermoléculaires à l'état solide. Les propriétés optiques des nouveaux chromophores en solution dans des solvants organiques ainsi qu'à l'état solide en poudre seront aussi détaillées dans ce chapitre.

Dans le Chapitre III, nous présenterons l'encapsulation de ces nouveaux chromophores dans des nanoagrégats et des nanoparticules pluronic/silice afin de les rendre hydrosolubles en vue de leur utilisation en imagerie de fluorescence. Nous montrerons ensuite l'imagerie cellulaire effectuée avec les nanoagrégats de certains colorants ainsi que l'utilisation de ces agrégats comme plateforme pour restaurer la fluorescence d'un chromophore par transfert d'énergie résonant de type Förster.

Enfin, le Chapitre IV décrira la synthèse de nouveaux chromophores dipolaires absorbant dans la fenêtre biologique pour l'imagerie photoacoustique. De plus, nous présenterons aussi quelques anciens colorants du laboratoire aux absorptions dans le rouge lointain ou le proche infrarouge. Enfin, nous commenterons l'imagerie photoacoustique effectuée avec ces chromophores, d'abord en solution organique dans des capillaires en verre, puis en agrégats dans des circuits de microfluidique et enfin *in vivo*.

Ce manuscrit se terminera par une conclusion dans le Chapitre V, suivie de la partie expérimentale dans le Chapitre VI.

Chapitre I. Introduction à l'imagerie optique

A. Principes d'absorption et de fluorescence

1. Absorption

a) Absorption d'un photon

Lorsque des molécules sont soumises à une onde électromagnétique d'énergie adéquate, il leur est possible d'absorber un photon afin de promouvoir un électron d'une orbitale occupée vers une orbitale d'énergie supérieure.^[1] Expérimentalement, il est possible de définir l'absorbance d'un composé, $A(\lambda)$, comme étant le logarithme du quotient entre I_{λ}^0 et I_{λ} , respectivement l'intensité lumineuse du faisceau de longueur d'onde λ avant et après traversée de l'échantillon, selon l'équation (I-1).

$$A(\lambda) = \log\left(\frac{I_{\lambda}^0}{I_{\lambda}}\right) \quad (I-1)$$

Dans un milieu dilué en composés absorbants, l'absorption suit généralement la loi de Beer-Lambert décrite par l'équation (I-2), où l est la distance parcourue par la lumière dans le milieu absorbant (en cm), c est la concentration (en mol.L⁻¹) et $\varepsilon(\lambda)$ le coefficient d'absorption molaire du composé à la longueur d'onde λ (en L.mol⁻¹.cm⁻¹).

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda)lc \quad (I-2)$$

À haute concentration, la validité de cette loi est souvent compromise par la formation d'excimères ou d'agrégats aux propriétés optiques différentes du monomère, ainsi que par la limite de sensibilité du détecteur.

Dans la loi de Beer-Lambert, le coefficient d'absorption molaire ε est caractéristique de la capacité d'absorption du chromophore. Ce terme rend compte de la probabilité de transition électronique à une longueur d'onde donnée. Sa valeur dépend donc du caractère interdit (par exemple par changement de la multiplicité du spin : $\varepsilon < 10$ L.mol⁻¹.cm⁻¹ ou par symétrie : $\varepsilon < 1000$ L.mol⁻¹.cm⁻¹) ou autorisé de la transition. En général, la valeur de ε donnée est la valeur au maximum d'absorption et permet de comparer un chromophore à un autre. Puisqu'en pratique l'absorption d'un composé se présente sous la forme de bandes d'absorption plus ou moins larges, il est aussi possible de définir la transition électronique par sa force d'oscillateur f . Cette force d'oscillateur correspond à la raideur du ressort modélisant le dipôle oscillant. La force d'oscillateur est liée à l'intégrale du coefficient d'absorption molaire sur toute la bande d'absorption de la transition par l'équation (I-3).

$$f = 2303 \frac{mc_0^2}{N_a \pi e^2 n} \int \varepsilon(\bar{\nu}) d\bar{\nu} \quad (I-3)$$

Avec :

- m et e : la masse et la charge d'un électron
- c_0 : la vitesse de la lumière
- n : l'indice de réfraction du milieu
- $\bar{\nu}$: le nombre d'onde en cm^{-1}
- N_a : le nombre d'Avogadro

Ainsi contrairement au coefficient d'absorption molaire, la force d'oscillateur permet de comparer les probabilités de transition quelle que soit la largeur de la bande.

b) Effets non-linéaires

Lorsqu'un milieu est traversé par une onde électromagnétique, le déplacement des nuages électroniques induit par l'onde crée une polarisation du milieu. Dans l'hypothèse d'un rayonnement peu puissant (comme cela était supposé dans la partie précédente), la polarisation macroscopique induite P est proportionnelle à la force du champ électrique local E avec une constante de proportionnalité appelée susceptibilité linéaire $\chi^{(1)}$. Cette susceptibilité est un nombre complexe dont la partie réelle est liée à l'indice de réfraction n du milieu et la partie complexe est liée à l'absorption monophotonique.

Cependant, lorsque le champ électrique devient trop intense, la linéarité est perdue et des termes quadratiques, cubiques et d'ordre supérieur apparaissent. On parle alors d'optique non-linéaire (ONL) dont l'étude a été permise par le développement rapide des lasers depuis les années 60 qui ont grandement accru les puissances lumineuses atteignables.^[2,3] La polarisation est alors donnée par l'équation (I-4).^[4,5]

$$P = \chi^{(1)}E + \chi^{(2)}E^2 + \chi^{(3)}E^3 + \dots \quad (I-4)$$

Avec :

- $\chi^{(1)}$: la susceptibilité linéaire
- $\chi^{(2)}, \chi^{(3)}, \dots$: respectivement les susceptibilités non linéaires de 2nd ordre, 3^{ème} ordre, ...

D'un point de vue microscopique, cette oscillation du nuage électronique modifie le moment dipolaire μ de la molécule selon l'équation (I-5) :

$$\mu = \mu_0 + \alpha E + \beta E^2 + \gamma E^3 + \dots \quad (I-5)$$

Avec μ_0 le moment dipolaire permanent et α , β et γ respectivement la polarisabilité et les hyperpolarisabilités du 1^{er} et du 2^{ème} ordre.

On peut classer les effets non linéaires en deux catégories : les interactions non résonantes qui ne correspondent pas au peuplement d'un état excité et inversement les interactions résonantes qui peuplent un état excité (Figure I-1).

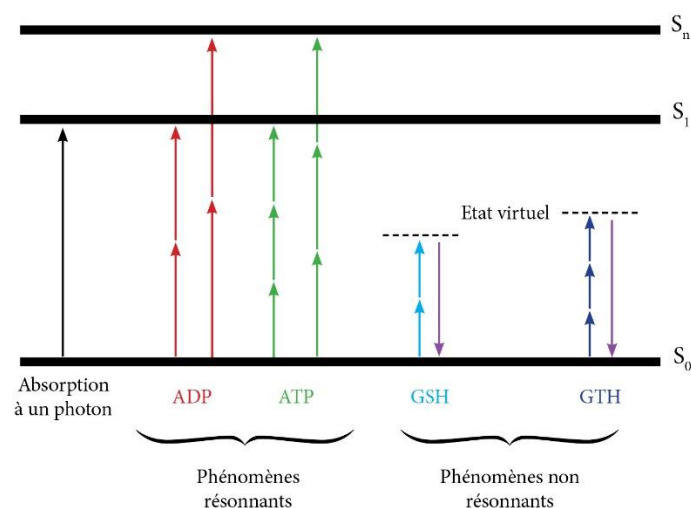


Figure I-1. Exemples de phénomènes résonnants et non résonnants en optique non-linéaire.
 ADP : absorption à deux photons, ATP : absorption à trois photons, GSH : génération de seconde harmonique, GTH : génération de troisième harmonique.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous limiterons aux phénomènes résonnants et plus précisément à l'absorption multiphotonique.

c) Absorption à deux photons

Si le flux de photons est suffisamment élevé, une molécule peut absorber simultanément deux photons de faible énergie via un état virtuel. Puisque l'ADP est un phénomène résonnant, la somme des énergies des deux photons doit correspondre à l'énergie nécessaire pour atteindre l'un des états excités de la molécule. Ce phénomène a été prédit dès 1931 par M. Göppert-Mayer.^[6] Néanmoins, il a fallu attendre trente ans pour une première observation expérimentale d'ADP par Kaiser et Garrett sur un cristal de $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$ grâce au premier laser ruby apparu une année plus tôt.^[7] Deux ans plus tard, Peticolas *et al.* observent le phénomène d'ADP par des molécules organiques à l'aide de cristaux d'hydrocarbures aromatiques (anthracène, phénanthrène, pyrène et 3,4 benzopyrène).^[8] Depuis ces travaux précurseurs, le développement de nouveaux lasers couvrant une gamme spectrale toujours plus importante ainsi que l'apparition de nouvelles applications (imagerie de fluorescence à excitation biphotonique,^[9,10] microfabrication 3D,^[11,12] thérapie photodynamique profonde^[13,14] ou encore la limitation optique^[15,16]) ont permis la création d'un champ de recherche dynamique : la synthèse et l'étude de nouveaux chromophores organiques pour l'ONL.^[5,17]

L'ADP d'un chromophore peut être quantifié par sa section efficace, σ , donnée par l'équation (I-6).^[4] σ est exprimée en Göppert-Mayer ($1 \text{ GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s} \cdot \text{photons}^{-1}$).

$$\sigma = \frac{8\pi^2 \hbar \omega^2}{n^2 c^2 N} \text{Im}(\chi^{(3)}) \quad (I-6)$$

Avec :

- $\hbar$: la constante de Planck réduite
- ω : la fréquence de l'onde incidence
- n : l'indice de réfraction
- c : la vitesse de la lumière
- N : la densité électronique dans le milieu
- $\text{Im}(\chi^{(3)})$: la partie imaginaire de la susceptibilité non linéaire de 3^{ème} ordre

La symétrie de la molécule détermine le niveau électronique atteignable lors de l'ADP (Figure I-2). En effet, l'ADP n'est possible qu'entre deux états de même parité.

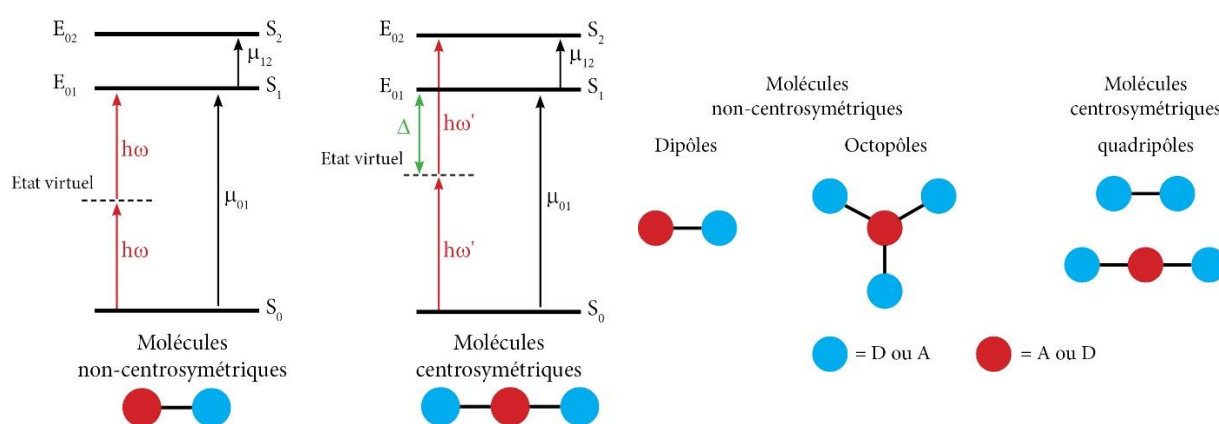


Figure I-2. Effets de symétrie sur l'ADP.

Dans le cas de molécules non-centrosymétriques (dipolaires ou octopolaires), le niveau S_1 est atteignable par absorption à un photon et par ADP, on peut alors utiliser un modèle à deux niveaux (S_0 et S_1) pour décrire le phénomène et le spectre d'absorption à un photon est superposable avec le spectre d'ADP (par simple division par 2 de la longueur d'onde, Figure I-3, gauche).

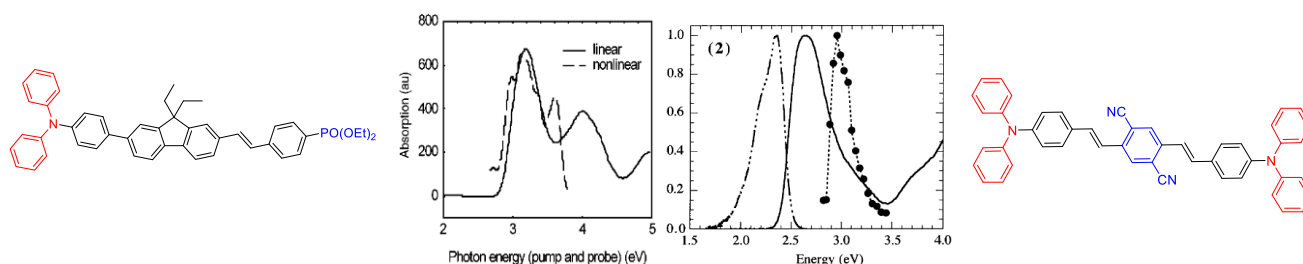


Figure I-3. Absorption mono et biphotonique d'un composé non-centrosymétrique (gauche) et d'un composé centrosymétrique (droite). [18,19]

A l'inverse, si la molécule est centrosymétrique (quadrupolaire), les transitions autorisées à un photon ne le sont pas à deux photons : le niveau S_1 n'est donc pas atteignable par ADP. Pour décrire le phénomène il faut alors utiliser un modèle à trois niveaux (S_0 , S_1 et S_2) qui donne la polarisabilité cubique γ en prenant en compte les deux premiers niveaux excités et l'état fondamental : [20]

$$\gamma \propto \left[\begin{array}{l} - \frac{\mu_{01}^4}{(E_{01} - \hbar\omega - i\Gamma)^2(E_{01} + \hbar\omega - i\Gamma)} \quad (N) \\ + \frac{\mu_{01}^2 \Delta\mu_{01}^2}{(E_{01} - \hbar\omega - i\Gamma)^2(E_{01} - 2\hbar\omega - i\Gamma)} \quad (D) \\ + \frac{\mu_{01}^2 \mu_{12}^2}{(E_{01} - \hbar\omega - i\Gamma)^2(E_{02} - 2\hbar\omega - i\Gamma)} \quad (2P) \end{array} \right] \quad (I-7)$$

Avec :

- μ_{ij} : le moment dipolaire de transition entre les états S_i et S_j
- $\Delta\mu_{ij} = \mu_{jj} - \mu_{ii}$: la variation de moment dipolaire entre les états S_i et S_j
- E_{0i} : l'énergie de transition entre l'état fondamental et l'état S_i
- Γ : la largeur homogène (demi-largeur à mi-hauteur de la bande d'ADP en énergie)

Ainsi la polarisabilité cubique dépend de trois termes :

- un terme négatif (N) qui correspond à la résonance monophotonique qui peut généralement être négligé
- un terme dipolaire (D), valable uniquement pour les composés non-centrosymétriques et qui décrit la résonance biphotonique entre les états S_0 et S_1
- un terme « deux photons » (2P) qui décrit la résonance biphotonique entre S_0 et les états S_n (ici représenté seulement pour $n = 2$)

Pour un composé centrosymétrique, $\Delta\mu_{01}$ et donc D sont nuls. Si on néglige (N), on peut donc écrire γ uniquement en fonction de (2P) :

$$\gamma \propto \frac{\mu_{01}^2 \mu_{12}^2}{\Delta^2 \Gamma} \quad (I-8)$$

Avec Δ la différence énergétique entre l'état S_1 et l'état virtuel (Figure I-2).

De nombreux articles traitent de la relation structure-propriétés de chromophores ADP afin d'identifier les principes d'ingénierie moléculaire prédominants pour augmenter la section efficace.^{[5,17,21–}

^{23]} Nous donnerons ici seulement les conclusions principales.

L'ADP dépend essentiellement de la présence d'un transfert de charge au sein du chromophore. En effet la présence de groupes électrodonneurs et accepteurs augmente les valeurs des μ_{ij} et possiblement de $\Delta\mu_{01}$. Par ailleurs, ces coefficients peuvent être augmentés en allongeant la conjugaison tout en conservant la planéité. Des bandes d'absorption mono et biphotoniques fines et intenses auront aussi tendance à accroître σ par diminution de Γ . Pour les composés centrosymétriques, si l'état virtuel est proche de S_1 (Δ faible), un phénomène de résonance est alors observé et augmente significativement la section efficace. Ce phénomène de résonance et le fait que les μ_{ij} sont généralement plus grands pour les composés centrosymétriques que pour les composés non-centrosymétriques sont les deux raisons pour lesquelles il est considéré que l'ADP est plus efficace pour des composés centrosymétriques.

Cependant de fortes sections efficaces peuvent tout de même être obtenues pour des composés non centrosymétriques (Figure I-4). Par exemple, notre groupe a synthétisé une hémicyanine avec un donneur indole et le tricyanofurane (TCF) en accepteur avec une section efficace d'environ 800 GM. Ce

composé aux propriétés non-linéaires élevées peut être synthétisé à l'échelle du multi-grammes et a pu être testé pour des applications de limitation optique.^[24] Belfield *et al.* ont utilisé un fluorène comme pont conjugué pour relier une diphenylamine à un groupe nitro afin d'obtenir un chromophore possédant une section efficace de 1300 GM.^[18] Enfin, Beverina *et al.* ont constaté que l'addition de donneurs et d'accepteurs auxiliaires pouvait permettre d'accroître considérablement les propriétés non-linéaires des chromophores dipolaires.^[25] En effet, leur colorant D- π -D'- π -A'- π -A possède une section efficace de 1500 GM, comparable à celle de très bons composés centrosymétriques.

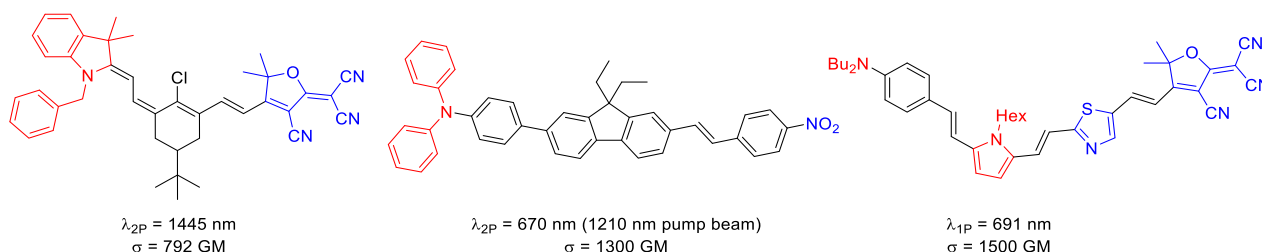


Figure I-4. Colorants dipolaires présentant de fortes ADP.^[18,24,25]

d) Méthodes de mesures de sections efficaces

Expérimentalement, il existe deux principales méthodes pour mesurer la section efficace des chromophores : la méthode du z-scan et la fluorescence excitée à deux photons (2PEF).

La méthode 2PEF est une méthode relative. Elle compare la fluorescence du chromophore avec la fluorescence d'une référence, tous les deux excités à deux photons dans les mêmes conditions. La section efficace du composé est alors donnée par l'équation (I-9).

$$\sigma_s = \sigma_{ref} \frac{\Phi_{ref} c_{ref} n_{ref} F_s}{\Phi_s c_s n_s F_{ref}} \quad (I-9)$$

Avec σ_{ref} la section efficace de la référence. Φ , c , n et F respectivement le rendement quantique de fluorescence, la concentration, l'indice de réfraction du solvant et l'intégrale du spectre de 2PEF de la référence (*ref*) ou du chromophore étudié (*s*).

Les principaux désavantages de cette méthodes sont la nécessité que le chromophore soit fluorescent et ait des longueurs d'onde d'absorption et d'émission proches d'une des références déjà publiées.^[26,27] En pratique, il faut généralement utiliser plusieurs références pour couvrir toute la gamme d'absorption et d'émission du chromophore.

La seconde méthode, le z-scan, est basée sur le déplacement de l'échantillon le long de l'axe d'un rayon laser focalisé sur $z = 0$.^[28] On mesure alors l'intensité lumineuse transmise en fonction de la position de la cuvette et de l'intensité lumineuse incidente. En fonction de l'ouverture du diaphragme du détecteur, il est possible de mesurer l'indice de réfraction non linéaire (petite ouverture) ainsi que le coefficient d'absorption non linéaire (grande ouverture). La section efficace du chromophore peut ensuite être calculée à partir du coefficient d'absorption non linéaire. Contrairement à la méthode 2PEF, le z-scan n'est

pas limité aux composés fluorescents. Cependant cette technique surestime généralement σ notamment car elle ne corrige pas l'absorption depuis l'état excité ou la diffusion.

2. Luminescence

Maintenant que nous avons couvert les processus d'absorption, nous allons nous intéresser à ce que devient la molécule à la suite du phénomène d'absorption. Une fois le photon absorbé, le chromophore est alors dit dans un état excité et cherchera à perdre cet excédent énergétique par diverses méthodes : la réémission d'un photon (luminescence), la génération de chaleur, un transfert d'énergie, une réaction chimique...^[29] Le diagramme de Perrin-Jablonski (Figure I-5) résume les voies de désexcitation les plus courantes.

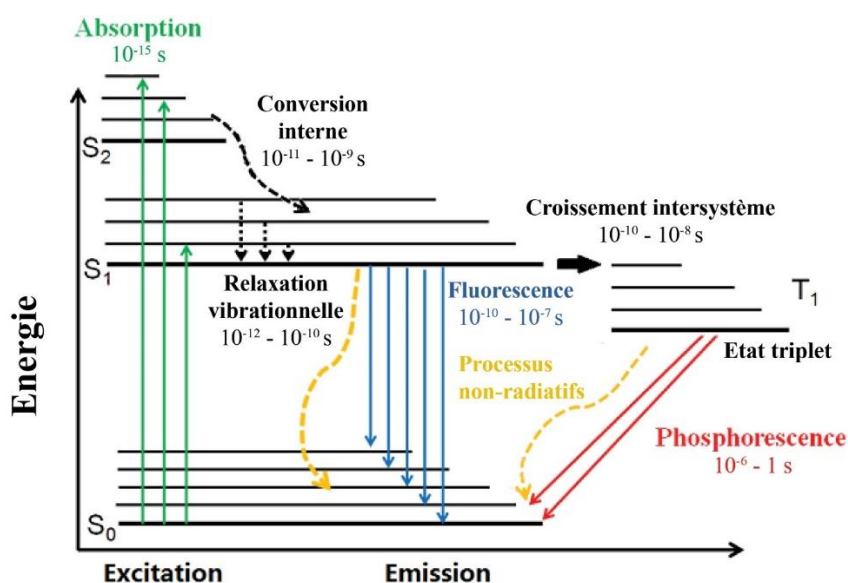


Figure I-5. Diagramme de Perrin-Jablonski (modifié depuis ^[30]).

Pour la majorité des chromophores, l'absorption d'un photon va être immédiatement suivie de conversions internes et de relaxations vibrationnelles afin d'atteindre l'état excité de plus basse énergie S_1 . Ce phénomène, appelé loi de Kasha, vient du fait que la conversion interne $S_n - S_1$ et les relaxations vibrationnelles sont beaucoup plus rapides que les phénomènes de désexcitation pour revenir à l'état fondamental. Depuis l'état S_1 , la désexcitation peut se faire de trois manières :

- L'émission d'un photon par fluorescence.

Caractérisée par une transition sans changement de multiplicité de spin, la fluorescence possède généralement des temps de vie courts de l'ordre de la dixième à la centaine de nanosecondes. Ce temps de vie peut néanmoins être accru dans le cas de la fluorescence thermiquement retardée, par le passage temporaire par un état triplet lorsque les énergies de S_1 et de T_1 sont proches.

- Un croisement intersystème vers l'état triplet T_1 suivi d'une émission de photon par phosphorescence.

Le croisement intersystème est possible grâce au couplage spin-orbite. L'incorporation d'éléments lourds dans la structure du chromophore permet d'accroître sa probabilité. La transition $T_1 - S_0$ est interdite à cause du changement de spin et possède donc une constante de vitesse beaucoup plus petite que celle de fluorescence et donc des temps de vie plus élevés ($10^{-6} - 1$ s).

- Une désexcitation non radiative depuis l'état S_1 ou l'état T_1 .

Parmi les raisons de désexcitation non radiative, on peut notamment citer la présence d'une intersection conique (IC), la génération de chaleur, un transfert d'énergie ou d'électron vers un quencheur, une réaction photochimique...

Les deux processus radiatifs décrits ci-dessus sont quantifiés par un rendement quantique Φ , défini par le quotient entre nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés, et par le temps de vie τ de leur état excité. Le rendement quantique et le temps de vie sont liés par l'équation (I-10) :

$$\Phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} = k_r \tau \quad (I-10)$$

Avec k_r et k_{nr} respectivement les constantes de vitesse radiatives et non radiatives.

Il est important de noter que puisque l'émission se fait depuis l'état S_1 ou T_1 , il y a une perte d'énergie entre le photon absorbé et le photon émis. Le spectre d'émission est donc décalé vers le rouge par rapport au spectre d'absorption. On appelle déplacement de Stokes la différence d'énergie (en cm^{-1}) entre le maximum d'absorption et le maximum d'émission. Par abus, le déplacement de Stokes est parfois donné en nm.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous focaliserons sur la fluorescence et sur sa compétition avec les phénomènes non radiatifs.

3. Fluorophores à transfert de charge

a) Présentation des fluorophores à transfert de charge

Depuis la première description du phénomène de fluorescence du sulfate de quinine par J. Herschel en 1845 ^[31] et la synthèse de la fluorescéine par A. von Baeyer en 1871, ^[32] de nombreuses familles de molécules fluorescentes ont été découvertes et étudiées. Notre groupe s'intéresse à une classe de fluorophores bien particulière : les fluorophores dipolaires à transfert de charge intramoléculaire. Aussi appelés « push-pull » ou fluorophores dipolaires, ces molécules possèdent un groupement donneur d'électron (D) lié à un groupement électro accepteur (A) par un pont π conjugué (Schéma I-1).

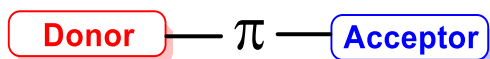


Schéma I-1. Structure générale de colorants dipolaires.

Ces composés possèdent une photophysique particulière : l'absorption d'un photon par le chromophore s'accompagne d'un transfert de charge entre le donneur et l'accepteur. En fonction de la force du couple D/A, de la longueur et du type de pont π conjugué séparant le couple D/A et d'interactions extérieures (solvant...), cet échange peut se faire dans un sens ou dans l'autre (Figure I-6).

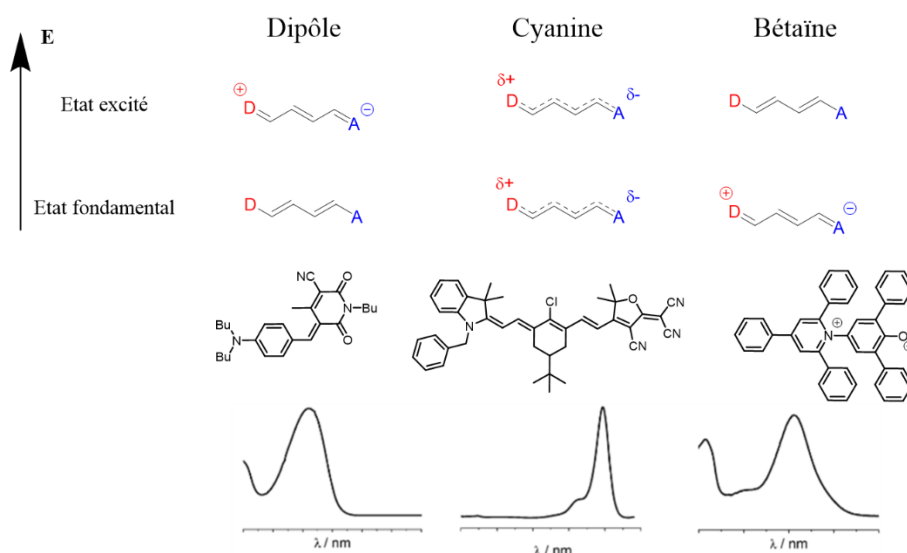


Figure I-6. Les états électroniques des différents cas de colorants dipolaires, exemple de chromophore et la forme générale de leur spectre d'absorption.^[24,33–35]

- Si le couple D/A est de force modérée :

Alors, l'état fondamental sera neutre, l'alternance des longueurs de liaisons simples et doubles (BLA) sera positive et le solvatochromisme aussi (décalage bathochrome avec l'accroissement de polarité du solvant, cette notion sera détaillée par la suite). Lors de l'absorption, le transfert de charge de D vers A donne une forme excitée zwitterionique. On appellera ce cas de manière abusive le cas dipolaire.

- Si la force du couple D/A est trop élevée :

Alors, la molécule aura un état fondamental zwitterionique, une BLA et un solvatochromisme négatifs. Le transfert d'électron se fera de A vers D et donnera une forme excitée neutre. Ce cas sera appelé le cas bêtaïne.

- Enfin, il existe une troisième forme possible : la forme cyanine.

Dans ce cas, la charge est répartie de manière homogène tout le long du pont conjugué : les deux formes mésomères (zwitterionique et neutre) contribuent chacune autant à la fois à l'état fondamental et à l'état excité. Les cyanines possèdent une BLA et un solvatochromisme nuls. Enfin,

les cyanines possèdent une bande d'absorbance caractéristique fine et intense avec un épaulement vibronique vers les basses longueurs d'onde.

En modifiant la force du couple D/A,^[33] le pont conjugué,^[36–38] le solvant^[39] ou encore le contre ion,^[35] il est possible de passer d'une forme à une autre. Au cours de cette thèse, nous avons surtout rencontré le premier cas (à part pour quelques colorants que nous présenterons dans le dernier chapitre de ce manuscrit pour lesquels nous avons atteint la forme cyanine).

Les colorants dipolaires possèdent plusieurs caractéristiques que nous allons maintenant détailler.

b) Décalage bathochrome des propriétés optiques

L'ajout d'un transfert de charge est, avec l'augmentation de la taille du système π , l'une des deux méthodes usuelles pour décaler l'absorption et l'émission d'un chromophore vers le rouge.^[40] En effet, l'ajout d'un couple D/A crée une hybridation des orbitales frontières du pont conjugué avec les groupes D et A résultant en une déstabilisation de l'orbitale la plus haute occupée (HOMO) et une stabilisation de l'orbitale vacante la plus basse (LUMO). Ainsi, le « gap » énergétique à franchir pour promouvoir un électron du niveau fondamental vers un niveau excité est diminué (Figure I-7, gauche). Les bandes d'absorption et d'émission deviennent alors larges, d'allure gaussienne, sans structure vibronique et sensibles à leur environnement, comme nous le verrons par la suite.

Parmi les nombreux exemples de ce principe d'ingénierie moléculaire, le groupe de Meier a comparé une série de trans-stilbènes avec un transfert de charge croissant en augmentant la force de l'électroaccepteur à donneur constant. En passant d'un atome d'hydrogène au groupe tricyanoéthylène, l'absorption est décalée de 300 nm, des UV jusqu'au rouge (Figure I-7, droite).

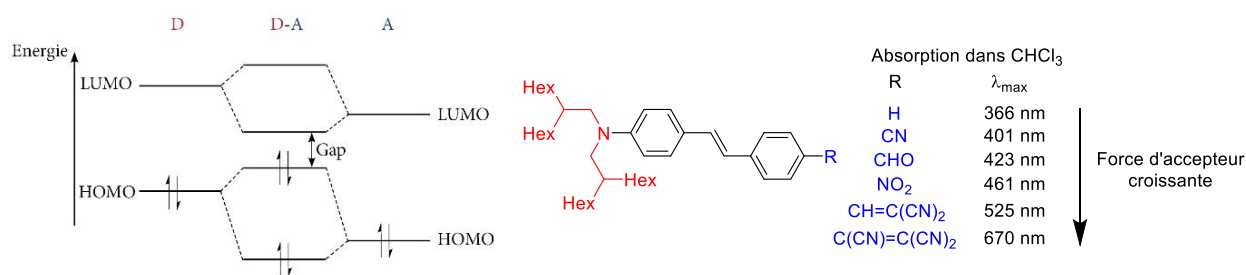


Figure I-7. A gauche : diminution du gap HOMO-LUMO par transfert de charge (adapté de ^[41]).

A droite : augmentation du transfert de charge intramoléculaire menant au décalage bathochrome de l'absorption.^[42]

c) Solvatochromisme

• Solvatochromismes d'absorption et d'émission

La plupart des dipôles présentent un solvatochromisme en absorption et/ou en émission. Cette variation des propriétés optiques avec la polarité du solvant découle de la grande différence entre l'état fondamental et l'état excité. En effet, l'absorption d'un photon va modifier radicalement le moment

dipolaire de la molécule ce qui a pour conséquence de perturber les interactions entre le chromophore et sa sphère de solvation. On distinguera deux cas de solvatochromisme : le solvatochromisme impactant l'émission et celui impactant l'absorption.

Le cas le plus classique de solvatochromisme est celui d'émission. Dans le cas d'un solvatochromisme positif (comme c'est souvent le cas pour les dipôles), l'absorption d'un photon mène à une augmentation du moment dipolaire du chromophore. Selon le principe de Franck-Condon, l'absorption a lieu plus rapidement que tous mouvements de noyaux, la molécule se retrouve alors dans l'état Franck-Condon dans lequel la sphère de solvation ne stabilise plus efficacement le chromophore à cause de son augmentation de moment dipolaire. Afin de stabiliser cet état excité, les molécules de solvant vont se réorganiser alors autour du chromophore (Figure I-8, gauche). Cette réorganisation vers un état relaxé se fait à l'échelle de temps de la centaine de picosecondes, soit avant une désexcitation radiative. Plus le solvant est polaire, plus l'état excité au fort moment dipolaire sera stabilisé et plus la fluorescence est décalée de manière bathochrome.

L'émission depuis l'état relaxé est généralement large, d'allure gaussienne et sans structure vibronique. Cependant, il se peut que le solvant ne permette pas le passage vers l'état relaxé et que l'émission se fasse depuis l'état Franck-Condon. Cela peut arriver si le solvant est trop visqueux pour permettre une réorganisation avant que la fluorescence ait lieu ou alors pour les solvants très apolaires (alcane) qui ne peuvent pas stabiliser un moment dipolaire élevé. Dans ces cas, on peut retrouver une structure vibronique. Enfin, une fois que le chromophore s'est désexcité de manière radiative ou non, le chromophore se retrouve à l'état fondamental avec la sphère de solvation de l'état relaxé, il faut donc une nouvelle réorganisation des molécules de solvant afin de retrouver l'état initial.

Ainsi, dans le cas d'un solvatochromisme positif, plus la polarité du solvant est importante, plus la stabilisation de l'état relaxé sera importante et donc plus l'émission du chromophore sera décalée vers le rouge. Par exemple, notre groupe a étudié le chromophore **a10** qui présente une variation de 215 nm entre son maximum de fluorescence dans le cyclohexane apolaire et son maximum dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) (Figure I-8, droite).^[10]

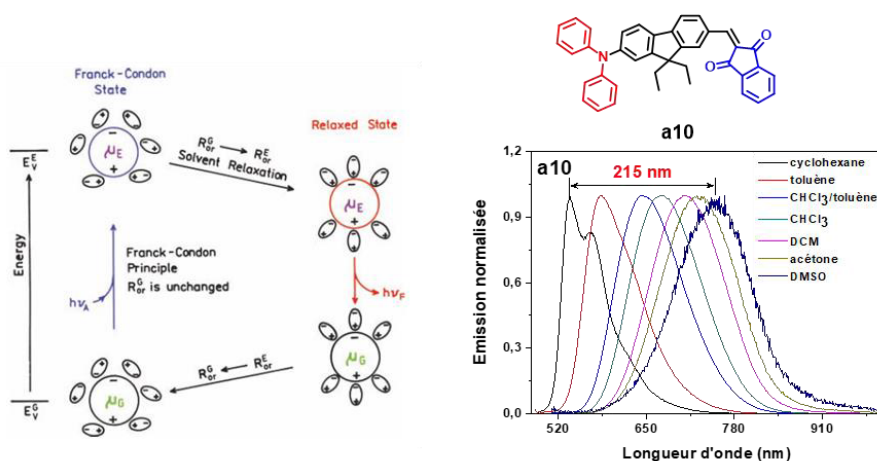


Figure I-8. A gauche : interactions solvant/fluorophore lors d'un cycle d'excitation/émission.^[29]
A droite : exemple de chromophore possédant un solvatochromisme d'émission positif.^[10]

Dans le cas précédent, nous avons vu que le solvant se réorganise entre l'état Franck-Condon et l'état relaxé pour donner lieu au solvatochromisme d'émission. Cependant, le solvant a aussi une influence sur la stabilisation de l'état Franck-Condon (par rapport au vide ou à un autre solvant). En effet, plus la sphère de solvation de l'état fondamental stabilise bien l'état excité (avant toute réorganisation ou relaxation vibrationnelle), plus ce solvant décalera l'absorption du composé de manière bathochrome.^[34] C'est alors un solvatochromisme d'absorption. Le groupe de Würthner a synthétisé un chromophore basé sur un pont bithiophène avec un solvatochromisme d'absorption de 130 nm entre l'hexane et un mélange 1:1 d'eau et de formamide (Figure I-9).^[43]

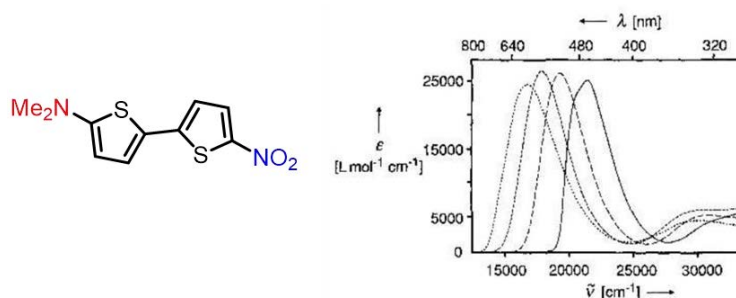


Figure I-9. Exemple de chromophore présentant un fort solvatochromisme positif en absorption. De droite à gauche, les courbes représentent l'absorption dans l'hexane, le tétrahydrofur (THF), le DMSO et dans un mélange 1:1 d'eau et de formamide.^[43]

A l'inverse des dipôles, les bétaines ont souvent un solvatochromisme négatif car leur moment dipolaire diminue lors du passage de l'état fondamental (zwitterionique) à l'état excité (neutre). Enfin, les cyanines présentent un solvatochromisme très peu marqué puisqu'elles ne subissent presque pas de changement de leur répartition électronique lors de l'excitation.

• Modélisation du solvatochromisme

Il existe plusieurs modèles permettant de rationaliser la stabilisation pour chaque solvant. Le plus utilisé est le modèle de Lippert-Mataga qui donne le déplacement de Stokes $\Delta\bar{\nu}$ en fonction de l'indice de réfraction n et de la constante diélectrique ε du solvant selon l'équation (I-11).

$$\Delta\bar{\nu} = \bar{\nu}_{abs} - \bar{\nu}_{em} = \frac{2}{hc} \left(\frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right) \frac{(\mu_e - \mu_f)^2}{a^3} + cste = \frac{2}{hc} \Delta f \frac{(\mu_e - \mu_f)^2}{a^3} + cste \quad (I-11)$$

Avec

- h : la constante de Planck
- c : la vitesse de la lumière
- a : le rayon de la cavité d'Onsager = rayon hydrodynamique du fluorophore
- μ_e : le moment dipolaire à l'état excité
- μ_f : le moment dipolaire à l'état fondamental
- Δf : la polarisabilité d'orientation

Ainsi, le caractère solvatochromique d'un colorant peut être accru en augmentant la variation de moment dipolaires entre les états fondamental et excité, par exemple en augmentant le transfert de charge intramoléculaire. Il dépend aussi de la longueur du pont conjugué du fluorophore comme le

montre une étude de Lord *et al.* (Figure I-10). Les auteurs ont comparé les pentes des courbes de Lippert-Mataga de fluorophores avec un pont phényle, naphtalène et anthracène et ont montré que plus la pente (et donc la variation de moment dipolaire) augmente plus la molécule est allongée. Cet accroissement provient surtout de l'augmentation du moment dipolaire à l'état excité qui est dû à une redistribution à plus longue distance des charges lors du transfert de charge.

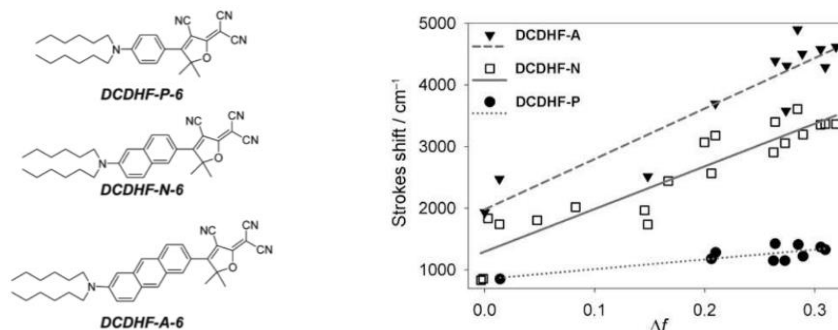


Figure I-10. A gauche : fluorophores dipolaires étudiés par Lord *et al.*^[44]
A droite : courbes de Lippert-Mataga des fluorophores de Lord *et al.*^[45]

Le solvatochromisme a permis l'établissement de plusieurs échelles de polarité pour les solvants (l'échelle $E_T(30)$ introduite par Reichardt *et al.*,^[34] π^* de Kamlet *et al.*,^[46] ...) mais aussi de caractériser la polarité de certains milieux biologiques (membranes,^[47] organelles,^[48] ...). Il faut néanmoins faire attention à l'influence d'autres paramètres sur la fluorescence : la viscosité qui peut empêcher la réorganisation de la sphère de solvation, la température ou les interactions spécifiques entre le solvant et le fluorophore comme des liaisons hydrogène ou des équilibres acido-basiques qui peuvent perturber la linéarité du modèle notamment dans les solvants protiques.

d) Augmentation du déplacement de Stokes

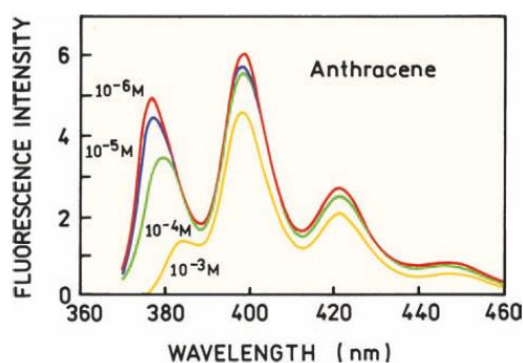


Figure I-11. Diminution de la bande bleue de fluorescence de l'anthracène par réabsorption en fonction de la concentration (tiré de [29] adapté de [49]).

Une autre caractéristique des dipôles est leur fort déplacement de Stokes qui résulte de la grande différence entre l'état fondamental (neutre) et l'état excité (zwitterionique). De plus, leur déplacement de Stokes est accru dans les solvants polaires grâce au solvatochromisme. Un grand déplacement de Stokes permet d'éviter la réabsorption des photons de plus haute énergie émis par les fluorophores voisins. Par

exemple, le faible déplacement de Stokes de l'anthracène résulte en la réabsorption de la bande bleue de sa fluorescence lorsque la concentration devient trop importante et donc à la modification de l'allure du spectre d'émission (Figure I-11).

En outre, plus le déplacement de Stokes est grand, plus il est facile de distinguer un photon de la source excitatrice d'un photon émis par le fluorophore et ainsi de collecter l'ensemble du spectre de fluorescence sans que l'excitatrice ne sature le détecteur.

4. Fluorescence à l'état solide

Habituellement la fluorescence est étudiée sur des molécules isolées les unes des autres. La seule interaction considérée est alors celle entre le fluorophore et le solvant. Cependant, de plus en plus d'applications nécessitent de fortes concentrations locales en fluorophore, voire l'utilisation du fluorophore à l'état solide. C'est par exemple le cas des diodes électroluminescentes organiques (OLEDs),^[50] des transistors à effet de champ électroluminescents organiques (OLEFETs),^[51] des lasers à solide organiques,^[52] des senseurs fluorescents organiques,^[53] des nanoparticules organiques^[54] ou encore de l'utilisation de fluorophores pour le cryptage ou l'anti-contrefaçon.^[55,56] Dans ces applications, la proximité entre les fluorophores entraîne diverses interactions chromophore-chromophore qui peuvent être bénéfiques ou néfastes sur les propriétés de fluorescence. Pour la majorité des fluorophores, ces interactions sont néfastes et la fluorescence diminue à forte concentration, jusqu'à s'éteindre en grande partie ou complètement à l'état solide. Par exemple, entre trois fluorophores rouges très utilisés : le Nile Red, le **DCM** et la **TPP**, seul le **DCM** possède une faible fluorescence à l'état solide (Figure I-12).

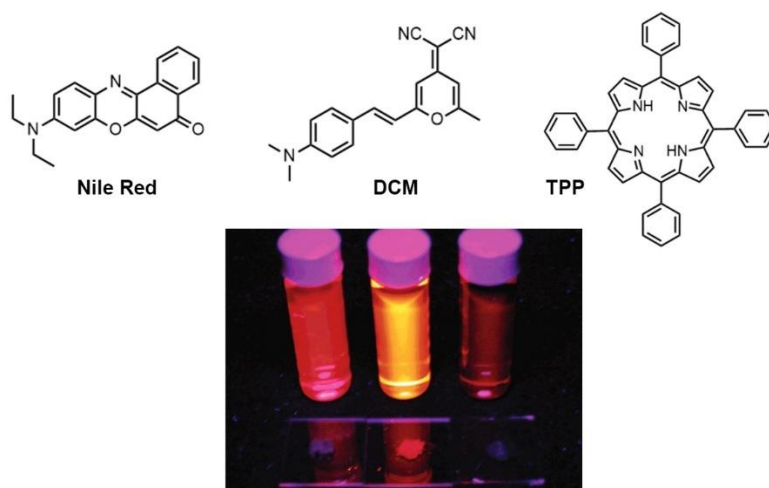


Figure I-12. Structure et image de la fluorescence en solution (CH_2Cl_2) et en poudre du Nile Red (gauche), du **DCM** (milieu) et de la **TPP** (droite) sous excitation UV. Adapté de ^[50].

Pour pallier cette extinction de fluorescence à l'état solide, la méthode couramment utilisée est l'utilisation du chromophore comme dopant dans une matrice solide. A faible concentration de dopant, les chromophores sont trop éloignés les uns des autres pour interagir et retrouvent leur fluorescence, comme en solution. Cependant, cette méthode limite la quantité de fluorophore utilisée et donc la

performance de l'application visée. La meilleure solution reste de concevoir des fluorophores efficaces à l'état solide afin de pouvoir les utiliser directement comme hôte.

Afin de comprendre comment concevoir des fluorophores émissifs à l'état solide, nous allons présenter succinctement les interactions à l'état solide entre les chromophores, puis nous présenterons le phénomène d'émission induite par agrégation (AIE) et la théorie d'accroissement de la luminescence à l'état solide (SLE).

a) Sources d'extinction à l'état solide : transfert d'énergie résonants et formation d'excimères

La proximité dans un état solide entraîne plusieurs types d'interactions entre chromophores. Deux de ces interactions sont considérées comme défavorables pour l'émission solide : les transferts d'énergie entre chromophores ainsi que la formation d'excimères, des dimères entre un monomère excité et un autre à l'état fondamental.

La première interaction consiste en un transfert de l'exciton sur un chromophore voisin. Ce transfert peut se faire de manière radiative ou non radiative.

- Transfert radiatif

Lorsqu'il y a un recouvrement entre les spectres d'absorption et d'émission du chromophore, un chromophore peut absorber un photon préalablement émis par un autre chromophore. La probabilité de cette réabsorption augmente avec la concentration en colorants et est responsable d'un décalage artificiel du maximum d'émission vers le rouge à l'état solide ou en solution concentrée par réabsorption de la partie bleue du spectre.

- Transfert non-radiatif

L'énergie peut aussi être transférée de manière non radiative par des interactions coulombiennes (mécanisme de Förster) et/ou par un recouvrement d'orbitales intermoléculaires (mécanisme de Dexter).

Le mécanisme de Förster est basé sur une interaction dipôle-dipôle et peut se faire à des distances relativement élevées (environ 100 Å). Le transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET) nécessite un recouvrement entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur et dépend du coefficient d'absorption de l'accepteur, du rendement quantique du donneur et de la distance donneur-accepteur. Ce transfert se fait par une transition simultanée entre l'électron promu du donneur (S_1-S_0) et un électron de l'accepteur (S_0-S_1), selon la Figure I-13.

Dans le cas d'un transfert selon le mécanisme de Dexter, l'électron excité du donneur est transféré sur la LUMO de l'accepteur simultanément au passage d'un des électrons de l'HOMO de l'accepteur sur la HOMO du donneur. Cet échange d'électron nécessite un contact direct entre les deux chromophores et n'est efficace qu'à courte distance (< 10 Å).

b) Excitons et agrégats

Les excimères ne sont pas les seuls dimères que les chromophores peuvent créer. La formation de dimères physiques ou, à une échelle plus grande, d'agrégats va modifier les propriétés optiques des fluorophores. Ce phénomène a été décrit pour la première fois indépendamment par Jelley et par Scheibe en 1936. Ils ont montré que l'agrégation du chlorure de pseudoisocyanine était accompagnée par l'apparition d'une bande d'absorption fine décalée vers le rouge. Puis, dans les années 50, les propriétés optiques des agrégats ont été théorisées par Kasha *et al.* dans le modèle de l'exciton.^[60]

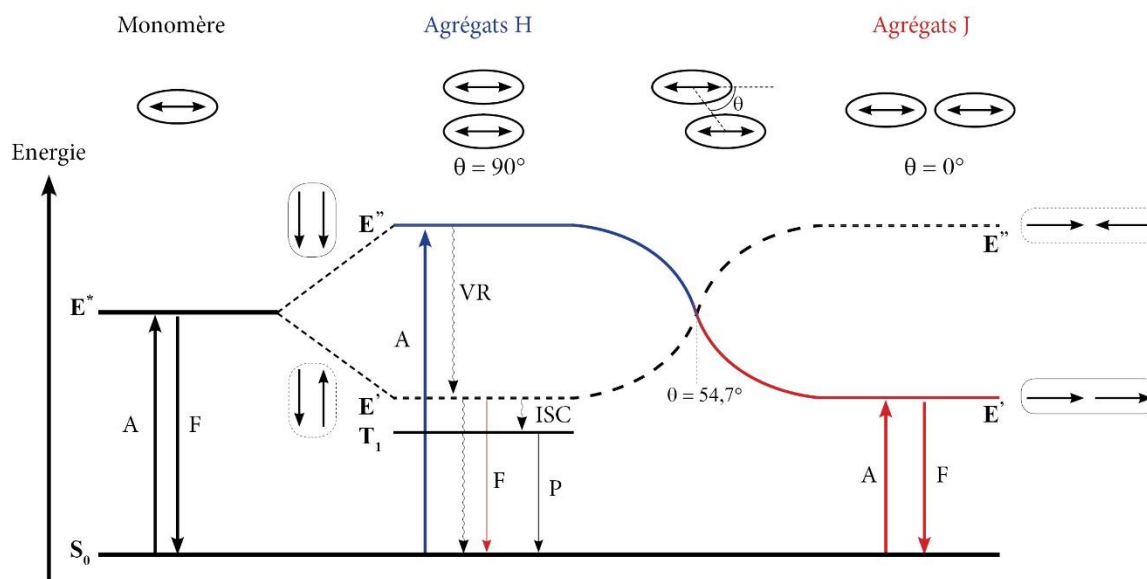


Figure I-15. Règles de sélection dans le cas de moments de transitions parallèles.

A = absorption, F = fluorescence, VR = relaxation vibrationnelle, ISC : croisement intersystème, P = phosphorescence. Les états en pointillés représentent les états interdits. Le bleu (respectivement rouge) représente un décalage hypsochrome (respectivement bathochrome) des propriétés optiques.

Dans ce modèle, lors de la formation d'un dimère physique, l'interaction dipôle-dipôle entre les deux monomères entraîne une levée de dégénérescence de l'état excité. L'état excité est séparé en deux niveaux : un niveau stabilisé (que nous appellerons E') par rapport à l'état excité du monomère et un niveau déstabilisé (E''). Les règles de sélection des transitions vers (ou depuis) chacun de ces deux niveaux dépendent de l'orientation des moments de transition des deux monomères et plus précisément de la somme vectorielle de ces deux moments de transition.

Si les deux moments de transition sont parallèles, seul le niveau où les moments de transition des monomères sont en phase sera autorisé. Dans le cas inverse, les moments de transition s'annulent et le niveau sera interdit. Ainsi, il est possible de distinguer trois cas :

- Si les dipôles sont alignés en tête-à-queue (Figure I-15, droite) :

Alors seuls les moments de transitions du niveau stabilisé E' sont en phase. Les transitions d'absorption et d'émission peuvent avoir lieu uniquement entre le niveau fondamental et E' . Les propriétés optiques du dimère sont donc décalées vers les plus grandes longueurs d'onde, comme ce fut observé par Jelley et Scheibe avec le chlorure de pseudoisocyanine. Les agrégats présentant ce comportement sont appelés agrégats J (pour Jelley) ou parfois agrégats Scheibe.

- Si les dipôles sont face-à-face (Figure I-15, gauche) :

Cette fois le niveau stabilisé E' correspond à des transitions de moment dipolaire opposées et est interdit. L'absorption se fait donc entre le niveau fondamental et le niveau déstabilisé E'' . L'absorption est donc décalée de manière hypsochrome et les agrégats de ce type sont appelés agrégats H. Les agrégats H sont généralement peu fluorescents. En effet, l'électron promu subit une relaxation vibrationnelle rapide entre E'' et E' . La transition entre E' et le niveau fondamental étant interdite, la constante de vitesse radiative k_r correspondante sera très faible et la fluorescence sera défavorisée par rapport à une désexcitation non radiative ou au passage à l'état triplet. Cependant, il existe de nombreux agrégats H fluorescents où k_r , bien que faible, reste supérieur à k_{nr} et k_{isc} (la constante de vitesse du croisement intersystème), notamment dans le cas de monocristaux.^[61,62]

- Si les dipôles ne sont pas dans un des deux cas idéaux précédents (Figure I-15, milieu) :

En fonction de l'angle d'orientation θ entre deux monomères, le comportement de l'agrégat est similaire à l'un des deux cas idéaux. Pour des θ faibles, on retrouve un agrégat J, aux propriétés décalées vers le rouge et une forte fluorescence. Pour des θ élevés, l'absorption est décalée vers le bleu et l'agrégat est généralement peu émissif, signes d'une agrégation H. Entre les deux, il existe une valeur de θ d'inversion, où le niveau reste dégénéré. Dans l'approximation de point-dipôles, l'angle d'inversion est calculé à $54,7^\circ$. Cette valeur est souvent utilisée pour déduire le comportement d'un solide à partir d'une structure de diffraction des rayons X.

Si les moments de transition ne sont pas parallèles, la somme vectorielle ne s'annule pas et les deux niveaux E' et E'' sont permis. Les agrégats de ce type présenteront une bande d'absorption de type H et une bande de type J avec des intensités relatives dépendant de l'orientation des deux dipôles. C'est notamment le cas pour des assemblages en chevrons.

Jusqu'ici nous avons utilisé le cas simplifié d'un dimère physique. En pratique, les agrégats sont généralement des structures 3D constituées d'un grand nombre de monomères. Les conclusions présentées ci-dessus peuvent néanmoins s'appliquer avec la création de bandes excitoniques au lieu des deux niveaux excités.^[63] Comme dans le cas des dimères, les agrégats J possèdent des propriétés décalées vers le rouge et sont généralement fluorescents alors que l'absorption des agrégats H est décalée de manière hypsochrome et leur fluorescence est souvent considérée comme étant faible.

Si le modèle de l'exciton permet d'expliquer le lien entre les propriétés optiques et la disposition des molécules à l'état solide, il est encore difficile de prédire la disposition des molécules à partir de leur structure. Cette disposition dépend de plusieurs interactions intermoléculaires : interactions électrostatiques, interactions de dispersion, interactions attractives ou répulsives entre les orbitales, interactions spécifiques telles que les liaisons hydrogènes, des interactions C-H... π ou encore des effets solvatophobes...^[64,65] Quelques tentatives d'établir une relation structure-disposition-propriétés ont été faites sur des familles précises telles que les distyrylbenzènes ou les dicyanostibènes.^[62,66] Ces études nous donnent quelques pistes d'ingénierie moléculaire pour tenter d'obtenir une agrégation J. Ainsi, l'introduction de groupements encombrant tels que les tert-butyles ou des groupements phényles hors du plan du chromophore peut permettre de diminuer les interactions intermoléculaires entre les systèmes π et peut orienter l'agrégation en tête-à-queue. L'agrégation J peut aussi être favorisée par l'incorporation de groupements polaires de faible taille tels que des nitriles et des méthoxys.

Cependant, même entre structures similaires, les motifs d'agrégation peuvent être surprenants. Par exemple, dans notre groupe, M. Ipay a synthétisé une famille de colorants basée sur des donneurs méthoxybenzènes et un accepteur commun : le tricyanofurane (TCF).^[67] Malgré les structures très semblables (différant seulement sur le nombre et la position des méthoxys sur le cycle phényle), les motifs d'agrégation obtenus sont extrêmement divers, allant d'agrégats H aux agrégats J (Figure I-16). Ces différents arrangements proviennent probablement de l'apport mésomère + inductif ou seulement inductif des méthoxys aux propriétés électroniques du cycle en fonction de leur position sur celui-ci. Les propriétés optiques en poudre restent cohérentes avec le motif d'agrégation : moins de 1% de rendement quantique pour les agrégats H du composé **1i** alors que le composé **1m** avec ses agrégats J en mur de brique (angle de décalage de 35°) est fortement fluorescent avec un rendement quantique de 22%.

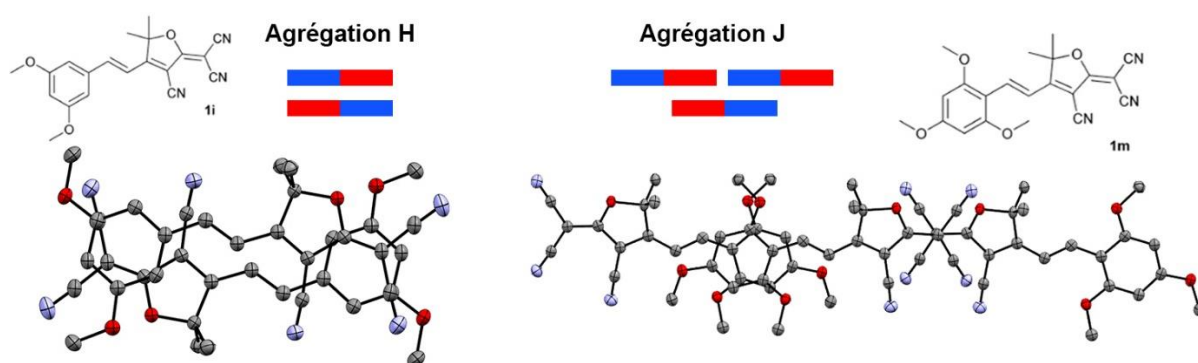


Figure I-16. Agrégats H et J dans la série des méthoxyTCF (adapté de ^[67]).

Enfin, certaines interactions intermoléculaires spécifiques peuvent tout de même être utilisées afin de contrôler le mode d'agrégation. Ainsi, des liaisons hydrogène ou des interactions fluorophiles/fluorophobes peuvent permettre d'orienter l'agrégation des chromophores dans un motif tête-à-queue.^[68,69]

Plus récemment, ces concepts d'agrégats J fluorescents et d'agrégats H peu émissifs ont été repris sous d'autres termes : l'émission induite par agrégation et l'extinction causée par agrégation.

c) Emission induite par agrégation

Le terme d'émission induite par agrégation (AIE - « aggregation induced emission») introduit par B. Z. Tang en 2001 désigne à l'origine des chromophores peu ou non fluorescents en solution qui deviennent fortement émissifs lorsqu'ils s'agrègent. Ce phénomène a été montré pour la première fois sur le méthylpentaphénylsilole dont la fluorescence est augmentée d'un facteur 333 entre la solution et l'état agrégé.^[70]

Ce phénomène d'AIE s'oppose à celui d'extinction causée par agrégation (ACQ- « aggregation caused quenching») qui est beaucoup plus commun et connu depuis longtemps.^[71] En effet, la plupart des fluorophores conventionnels sont constitués d'un système π étendu et rigide, souvent polyaromatique. Cette géométrie complètement plane rend efficace la formation d'interactions d'empilement π à l'état solide. La présence d'empilements π est généralement néfaste pour la fluorescence. En effet, ils sont responsables de la formation d'excimères ou d'agrégation de type H afin de maximiser les interactions π - π . Ainsi, le phénomène d'ACQ limite l'utilisation de fluorophores conventionnels pour des applications nécessitant de fortes concentrations ou une utilisation des fluorophores sous forme de films, poudre,

cristaux, nanoparticules... La calcéine, par exemple, voit sa fluorescence augmenter linéairement avec sa concentration jusqu'à 4mM puis s'éteindre progressivement lorsque sa concentration dépasse cette valeur seuil (Figure I-17).^[72] Similairement, la fluorescence du **DDPD** disparaît lorsque la fraction volumique d'eau devient trop importante et entraîne l'agrégation du colorant hydrophobe.^[73]

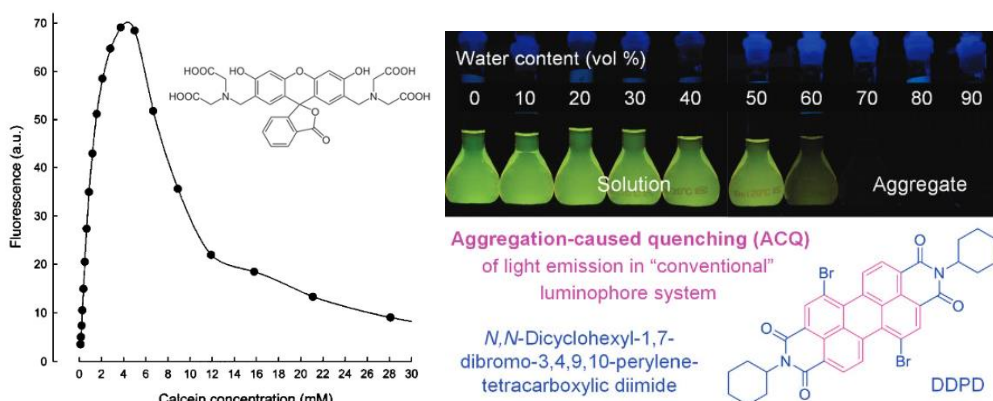


Figure I-17. Exemples de fluorophores ACQ.

Gauche : variation de la fluorescence de la calcéine en fonction de sa concentration dans l'eau (modifié de ^[72]).
Droite : variation de la fluorescence du **DDPD** en fonction du pourcentage volumique d'eau du mélange THF/eau.^[73]

Les fluorophores AIE permettent de pallier ces limitations. Effectivement, à l'inverse des fluorophores conventionnels, les chromophores AIE sont faiblement fluorescents en solution mais deviennent fortement émissifs sous la forme d'agrégats. Trois explications sont données pour éclaircir ce comportement peu commun : la restriction de rotations, de vibrations et de mouvements intramoléculaires.

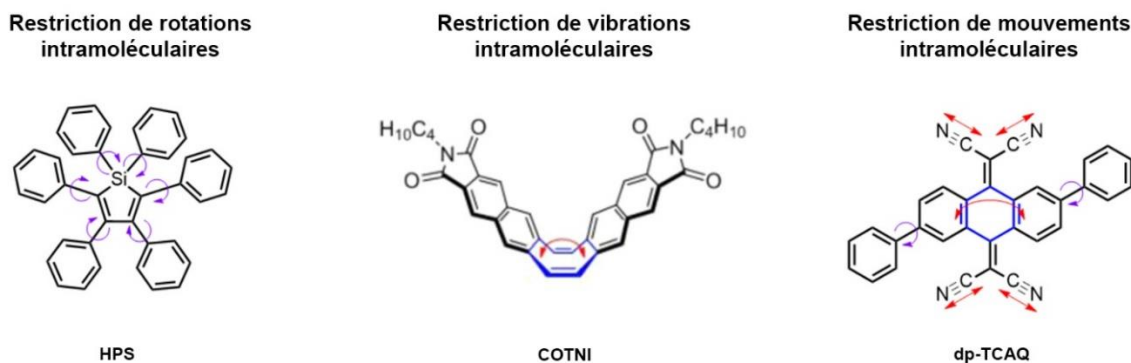


Figure I-18. Molécules modèles des trois mécanismes de fonctionnement de l'AIE (adapté de ^[74]).

Dans ces trois mécanismes, en solution, l'énergie absorbée est perdue par les mouvements intramoléculaires du chromophore. L'état agrégé restaure la luminescence par une restriction des mouvements intramoléculaires. Le mécanisme à considérer dépend des mouvements par lesquels la molécule se désexcite en solution (Figure I-18). Ainsi, le mécanisme de restriction de rotations intramoléculaires intervient lorsque la molécule possède des rotors, tel que l'hexaphenylsilole (**HPS**) ou encore le tétraphényléthylène (**TPE**). Pour les molécules qui ne possèdent aucun rotor tels que **COTNI**, l'AIE est souvent basé sur une restriction de vibrations intramoléculaires. Dans le cas de **COTNI**, le phénomène d'AIE provient d'une restriction du mouvement d'aplanissement qui a lieu lors de l'absorption d'un photon. Enfin, lorsque l'AIE d'une molécule provient d'une restriction de rotation ET d'une restriction de vibration, il s'agit alors d'une restriction de mouvements intramoléculaires. C'est par exemple le cas de

dp-TCAQ qui possède deux cycles phényles agissant comme rotors, mais aussi des liaisons triples CN et un cœur quinone pouvant vibrer. Dans tous les cas, l'état d'agrégat permet une désexcitation radiative en bloquant ces mouvements énergivores mais surtout grâce à des interactions π - π limitées par les structures non planaires des fluorophores AIE.^[74] Généralement, cette augmentation de la fluorescence a aussi lieu dès qu'il y a restriction des mouvements comme toutes les formes d'état solide (agrégats, films, cristaux, solutions solides, ...) mais aussi lors d'une augmentation de la viscosité ou de la pression ou d'une diminution de la température.^[75]

Afin de comparer les efficacités d'AIE de différents fluorophores, il est possible de définir le coefficient d'accroissement de fluorescence par AIE α selon l'équation (I-12) :

$$\alpha = \frac{\varphi_{F,agrégats}}{\varphi_{F,solution}} \quad (I-12)$$

Avec $\varphi_{F,agrégats}$ le rendement quantique de fluorescence en agrégats et $\varphi_{F,solution}$ celui en solution.

Lorsque $\alpha < 1$, la molécule est plus fluorescente en solution qu'en agrégats, c'est le phénomène d'ACQ. A l'inverse, si $\alpha > 1$, la fluorescence est accrue par passage à l'état solide, c'est donc une molécule AIE.

Il est possible d'augmenter le coefficient α d'un fluorophore en lui greffant un groupement « AIE-actif ». Ainsi de nombreux travaux, notamment du groupe de B. Z. Tang, ont montré la possibilité de transformer une molécule ACQ en AIE en ajoutant un groupement tétraphényléthylène (**TPE**) ou triphénylamine (**TPA**). En effet, les quatre ou trois phényles de ces deux groupements servent de rotors limitant la fluorescence en solution tandis que leur structure en hélice à l'état solide limite les interactions entre chromophores et restaure la fluorescence. Ainsi, l'anthracène, qui possède un comportement ACQ avec un coefficient α de 0,5, peut être transformé en fluorophore AIE en ajoutant un groupement **TPE** sur le cycle phényle central. Cet ajout augmente α jusqu'à 357 (Figure I-19).

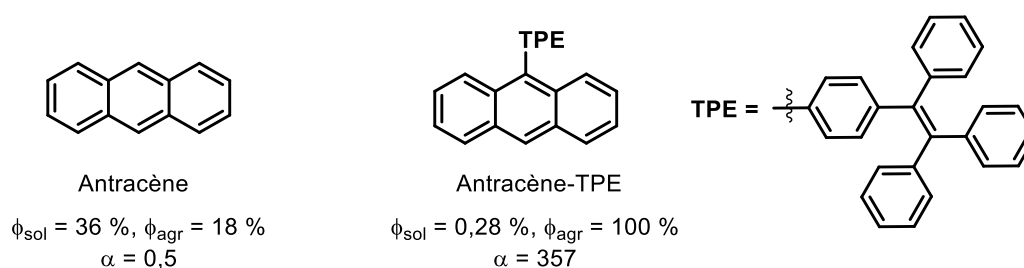


Figure I-19. Stratégie pour transformer un fluorophore ACQ en fluorophore AIE par l'ajout d'un motif TPE (adapté de ^[73]).

Ainsi, le phénomène d'AIE permet de créer des fluorophores avec une émission efficace à l'état solide soit à partir de fluorophores existants soit par ingénierie de nouvelles structures. La recherche de chromophores AIE s'est développée exponentiellement ces dernières années grâce aux nombreuses applications de la fluorescence à l'état solide. Cependant même si les principes d'ingénierie moléculaire sont efficaces, l'explication théorique du mécanisme peut être considérée comme simpliste dans de nombreux cas. C'est pourquoi certains chercheurs tentent de développer de nouvelles théories plus complètes pour expliquer la fluorescence à l'état solide.

d) *Accroissement de l'émission induite par agrégation et accroissement de luminescence à l'état solide*

Une année après la proposition du terme AIE, le groupe de S. Y. Park a publié l'étude d'un dérivé de stilbène **CN-MBE** qui présente lui aussi une fluorescence seulement sous forme d'agrégats.^[76] Ils ont montré que cette apparition de la fluorescence provient d'un aplanissement de **CN-MBE** dans les nanoparticules ainsi que d'une agrégation J, favorisée notamment par le groupement cyano. En effet, la géométrie optimisée de **CN-MBE** en solution montre la présence de plusieurs torsions dans la structure à cause de la gêne stérique entre les phényles et entre ces derniers et le groupement cyano. Ces torsions induisent une mauvaise conjugaison en solution et donc une faible fluorescence. Les contraintes de l'état solide sont plus importantes que la répulsion stérique des atomes d'hydrogène en ortho des phényles et induisent une bien meilleure conjugaison par aplanissement de la molécule.

Contrairement aux mécanismes d'AIE dans lesquels l'augmentation de fluorescence n'est liée qu'à un blocage des processus de désexcitation non radiatifs (soit une diminution de k_{nr}), l'agrégation de **CN-MBE** conduit également à une augmentation de la constante radiative k_r par augmentation de la conjugaison. Le rendement quantique de fluorescence pouvant être défini comme le quotient entre k_r et la somme $k_r + k_{nr}$, une modification de l'une ou l'autre constante de vitesse aura un impact direct sur la fluorescence. Pour nommer les molécules dont l'agrégation conduit à une diminution de k_{nr} ET à un accroissement de k_r , les auteurs ont proposé le terme d'accroissement de l'émission induite par agrégation (AIEE - « aggregation induced emission enhancement »).

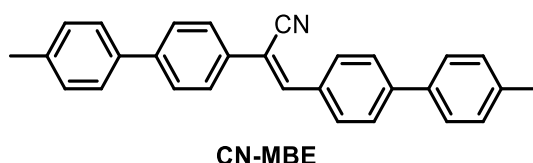


Figure I-20. Premier exemple de molécule présentant une augmentation de fluorescence par AIEE.

Plus récemment, S. Y. Park et J. Gierschner ont proposé un nouveau terme plus général que AIE ou AIEE : l'accroissement de luminescence à l'état solide (SLE – « solid-state luminescence enhancement »).^[61] Ce terme permet de dépasser la maladresse de vocabulaire des termes précédents mais aussi d'étendre les voies mécanistiques au-delà d'une simple restriction de mouvements.

En effet, il est toujours déroutant d'employer le terme d'émission induite par **agrégation** pour justifier une forte luminescence en poudre ou en film. A l'inverse, l'état solide du terme SLE permet de parler de solutions solides (solution congelée, solution dans une matrice solide comme le polyméthacrylate de méthyle ou encore en solution visqueuse) mais aussi de l'ensemble des phases condensées (amorphe, mono et polycristalline).

De plus, la définition de ce nouveau terme leur a permis de rappeler la présence de contributions intramoléculaires mais aussi intermoléculaires et leur effet sur les constantes non radiatives et radiatives. Nous allons détailler ces contributions ci-dessous.

- Effets intramoléculaires

Le passage de la solution à l'état solide peut être accompagné par une modification de la force d'oscillateur f de la transition étudiée. Ainsi, la force d'oscillateur peut être augmentée par la modification de l'indice de réfraction du milieu mais aussi par une possible réorganisation entre les états excités et notamment une inversion entre un état sombre (f faible) et un état lumineux (f élevé). Comme la force d'oscillateur peut être reliée à la constante radiative par l'équation de Strickler-Berg (I-13) en utilisant la définition de la force d'oscillateur donnée dans l'équation (I-3) et avec comme approximation que le déplacement de Stokes est faible et que l'absorption et la fluorescence sont des images l'une de l'autre.^[61,77,78] Une augmentation de f entraînera donc une augmentation directe de k_r .

$$k_{r,SB} = 2,88 \cdot 10^{-9} n^2 \frac{\int I(\bar{\nu}) d\bar{\nu}}{\int I(\bar{\nu}) \bar{\nu}^{-3} d\bar{\nu}} \int \frac{\varepsilon(\bar{\nu})}{\bar{\nu}} d\bar{\nu} = 0,667 \frac{\int I(\bar{\nu}) d\bar{\nu}}{\int I(\bar{\nu}) \bar{\nu}^{-3} d\bar{\nu}} n^2 \bar{\nu}_A^{-1} f \quad (I-13)$$

Avec $I(\bar{\nu})$ l'intensité de fluorescence et $\bar{\nu}_A$ le nombre d'onde moyen correspondant à la transition d'absorption $S_0 \rightarrow S_1$.

Les effets intramoléculaires du passage à l'état solide peuvent entraîner une diminution de k_{nr} et donc une augmentation du rendement quantique. Ainsi, les pertes d'énergie non radiative sont minimisées par la rigidification de la structure et la suppression des mouvements du fluorophore à cause de l'environnement contraint (ou d'une faible température). Outre la suppression de ces mouvements, l'état solide peut influencer les surfaces d'énergie potentielle des états excités et perturber les autres voies de désexcitation non radiative tels que l'isomérisation cis-trans, le croisement intersystème et la conversion interne. Par exemple, il a été montré que la désexcitation du diméthyltétraphénylsilole en solution se faisait principalement par conversion interne via une intersection conique entre les états S_1 et S_0 .^[79] En milieu restreint, la surface d'énergie potentielle de S_1 est modifiée et l'intersection S_0/S_1 n'est plus énergétiquement accessible (Figure I-21). La fluorescence est restaurée et le rendement quantique passe de 0,22% dans le cyclohexane à 76% en couche mince.

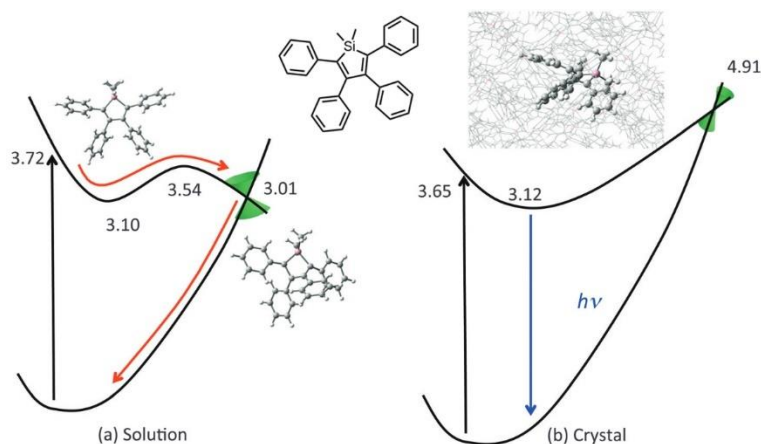


Figure I-21. Mécanismes de désexcitation du diméthyltétraphénylsilole en solution (a) et en cristal (b). Adapté de ^[79].

- Effets intermoléculaires

Le passage à l'état solide peut aussi augmenter la force d'oscillateur par augmentation de la planéité de la molécule comme pour l'exemple de **CN-MBE** ci-dessus. Cependant, la majeure partie des contributions intermoléculaires sur les constantes radiative et non radiative provient de leur motif d'agrégation dans le cadre du modèle d'exciton de Kasha. Il faut néanmoins être prudent car ce modèle ne donne que l'évolution de k_r et non pas celle du rendement quantique. Ainsi, dans le cas d'arrangements polycristallins, les agrégats H sont généralement peu fluorescents et sont considérés comme synonymes d'ACQ. Cette extinction de fluorescence est causée par le piégeage de l'exciton aux surfaces, aux joints de grains ou au niveau d'impuretés et de défauts. Dans des conditions sans pièges, comme en monocristal, les rendements quantiques des agrégats H peuvent être bons à excellents.^[80,81] Enfin, la densité de l'assemblage solide influence k_{nr} . Pour des états solides peu denses comme des solutions solides, les mouvements intramoléculaires peuvent ne pas être totalement inhibés.

En conclusion, de nombreux mécanismes permettent d'expliquer la variation du rendement quantique de fluorescence lors du passage solution/état solide. L'approche AIE permet une première approche efficace et donne de bonnes pistes d'ingénierie afin de créer des fluorophores émissifs à l'état solide. Cependant, la restriction de mouvements moléculaires ne permet pas d'expliquer à elle seule la photophysique de nombreux composés. C'est pourquoi plusieurs groupes tentent d'étendre ce terme pour incorporer d'autres contributions, comme S. Y. Park et J. Gierschner avec leur terme SLE mais aussi, par exemple, le groupe de C. Adamo.^[82] Enfin, il est important de noter que tous les états solides peuvent donner des propriétés optiques très différentes. En particulier, il faut considérer l'état cristallin ou amorphe de la phase condensée.

5. Fluorescence solide dans la littérature et au laboratoire

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, la proximité entre les chromophores à l'état solide entraîne de nombreuses interactions pouvant être néfastes pour la fluorescence à l'état solide. Ici, nous allons présenter quelques stratégies pratiques pour concevoir des fluorophores fortement émissifs à l'état solide puis nous donnerons des exemples de fluorophores dipolaires émettant au-delà de 650 nm à l'état solide.

a) Stratégies pour augmenter la fluorescence à l'état solide

Plusieurs stratégies ont été employées afin d'accroître la fluorescence à l'état solide. Elles reposent principalement sur la volonté d'éloigner les fluorophores les uns des autres afin de limiter leurs interactions et de diminuer les processus de désexcitation non radiatifs.

- Structure non plane

Technique très employée dans les molécules dites « AIE », l'utilisation d'un système π -conjugué non-plan permet de limiter la formation d'empilements π . Ainsi, de nombreux groupements conjugués encombrés sont connus pour favoriser la fluorescence à l'état solide. Parmi les groupements les plus utilisés se trouvent les triarylamines et les tetraphényléthylènes, mais aussi les spirobifluorènes.

Un exemple de l'utilisation du motif TPE afin d'accroître les propriétés optiques à l'état solide de l'anthracène a déjà été présenté dans la Figure I-19. Similairement, les triarylamines ont aussi été utilisées afin de transformer un fluorophore ACQ en AIE. De plus, les triarylamines sont aussi d'excellents groupements donneurs et peuvent être utilisées comme tels dans des fluorophores à transfert de charge. Ainsi, Yamaguchi *et al.* ont synthétisé un fluorophore D- π -A- π -D basé sur deux groupements triphénylamine conjugués avec deux boryles encombrés (Figure I-22).^[83] La présence des deux dimesitylboryles et des deux triphénylamine permet au fluorophore de conserver un excellent rendement quantique de 90 % à l'état solide.

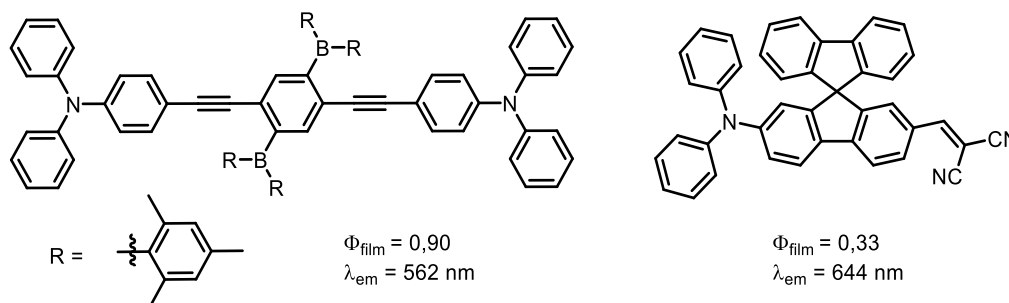


Figure I-22. Exemples d'utilisation de groupements hors du plan du fluorophore afin d'améliorer les rendements quantiques à l'état solide.^[83,84]

Une autre méthode pour encombrer le pont π conjugué est d'utiliser des spirobifluorènes. En effet, dans ce motif, les deux cycles fluorènes sont orthogonaux ce qui permet de limiter drastiquement la possibilité d'empilement π . Cette méthode a notamment permis au groupe de Chen d'obtenir des films avec un rendement quantique de 33% à 644 nm.^[84]

- Dendrimères

La construction d'un dendrimère protecteur autour d'un cœur fluorescent permet aussi d'empêcher l'empilement π . Par exemple, Ifor *et al.* ont synthétisé une série de dendrimères de génération 0 à 3 basés sur un cœur fluorescent tris(distyrylbenzényle)amine entouré de dendrons composés de stilbène et de terminaisons tert-butyle (Figure I-23).^[85] La fluorescence des quatre dendrimères est identique en solution avec un rendement quantique de 62 % et une émission à 520 nm. Sous forme de films, le dendrimère de génération 0 montre le plus d'interactions entre chromophores avec une baisse radicale du rendement quantique et l'apparition d'un épaulement côté hautes longueurs d'onde. L'augmentation de la génération de dendrimère permet de restaurer en partie la fluorescence en passant d'un rendement quantique de 5 % pour G0 à un rendement de 12 % pour G3 mais aussi de retrouver la forme du spectre en solution, signe d'une diminution des interactions intermoléculaires.

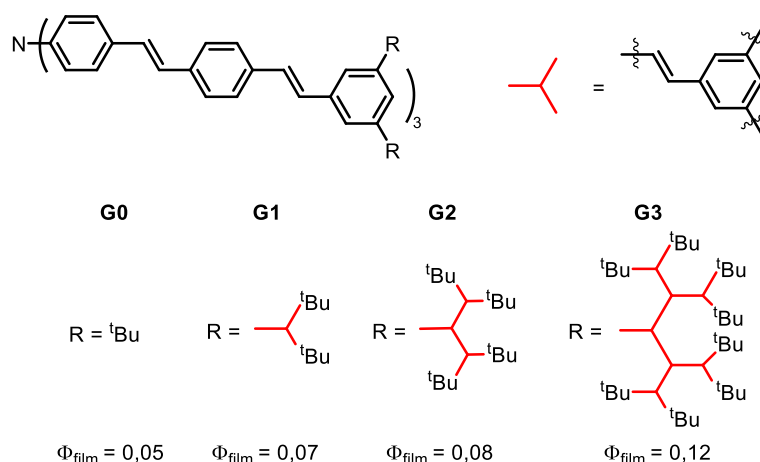


Figure I-23. Exemple d'utilisation de dendrimères afin de diminuer les interactions intermoléculaires à l'état solide.^[85]

- Contre-ions encombrants

Une méthode pour restaurer la fluorescence à l'état solide de fluorophores conventionnels chargés est l'utilisation d'un contre-ion encombrant afin d'empêcher l'empilement π - π entre colorants. Cette stratégie a été notamment employée par Klymchenko *et al.* afin de limiter l'extinction de fluorescence d'une rhodamine **R18** au sein de nanoparticules.^[86] En remplaçant l'anion perchlorate par des boranes encombrés, le taux de dopage de **R18** dans les nanoparticules d'un copolymère d'acides lactique et glycolique (PLGA) peut être augmenté en conservant de bons rendements quantiques (Figure I-24). Parmi les contre-anions testés, le pentafluorotetraphénylborane **F5-TPB** permet de préserver au mieux les propriétés optiques de **R18**.

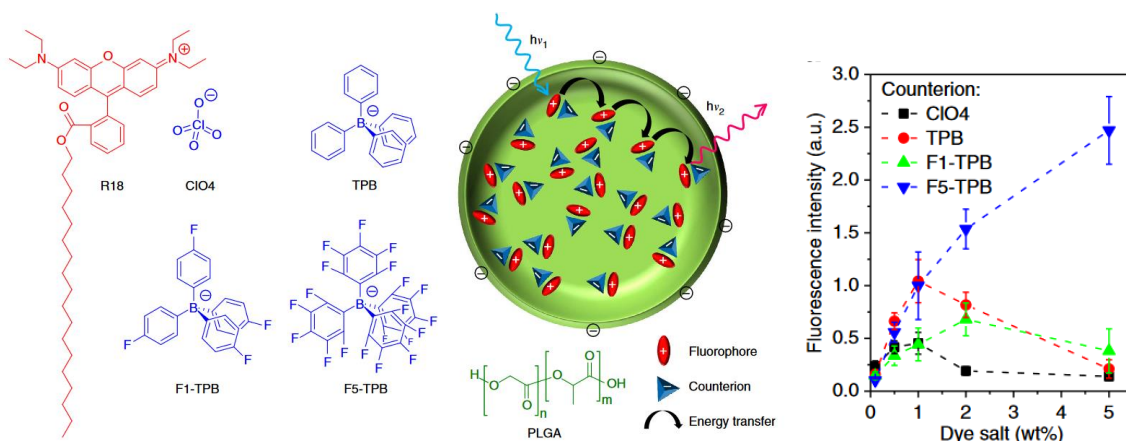


Figure I-24. Exemple d'utilisation de contre-ions encombrant afin de conserver une forte intensité de fluorescence lors de l'augmentation du taux de dopage au sein de la nanoparticule.^[86]

- Substituants volumineux

L'utilisation de substituants volumineux permet d'éloigner les chromophores au sein de la phase condensée. Ces substituants peuvent être de diverses natures : cycles saturés ou insaturés, groupements alkyles.

Ainsi, le groupe de Ishow a synthétisé une famille de chromophore basé sur la triphénylamine avec deux bras substitués par des p-tertbutylphényles et un dernier bras menant à un groupement electro-accepteur (Figure I-25).^[87] En fonction de la force de l'accepteur, ils ont pu décaler l'émission en couche mince de 383 nm (-H) jusqu'à 631 nm (-CHC(CN)₂). Dans cet exemple, deux éléments permettent de conserver de bons rendements quantiques à l'état solide : la forme en hélice de la triarylamine ainsi que la gêne stérique des groupements tert-butyles terminaux.

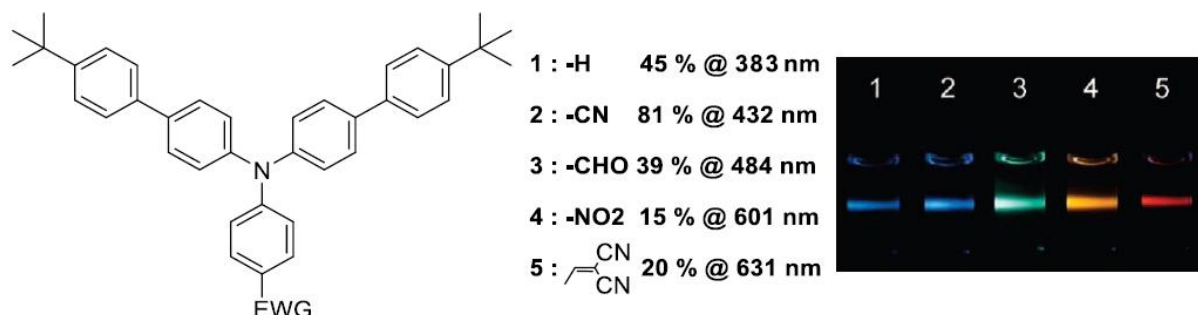


Figure I-25. Structures et propriétés d'émission en film (rendements quantiques) et en nanoparticules (image) des colorants dipolaires synthétisés par Ishow et al.^[87]

- Empilement croisé

Dans le modèle de l'exciton de Kasha que nous avons décrit dans le 4.b), un empilement face-à-face des chromophores aura tendance à créer un état stabilisé interdit par annulation des moments de transition. Cependant, si les moments dipolaires ne sont pas parallèles, les moments de transition ne peuvent plus s'annuler. Ainsi, Xie *et al.* ont montré la première configuration d'empilement croisé à l'état cristallin adoptée par le trans-2,5-diphenyl-1,4-distyrylbenzene (**DPDSB**).^[88] L'angle de 70° entre deux chromophores voisins est dû aux interactions C-H... π (Figure I-26). L'interaction entre chromophores donne toujours une levée de dégénérescence, mais les deux niveaux sont autorisés et la faible différence énergétique entre les deux niveaux permet une transition facile entre le niveau déstabilisé et le niveau stabilisé.

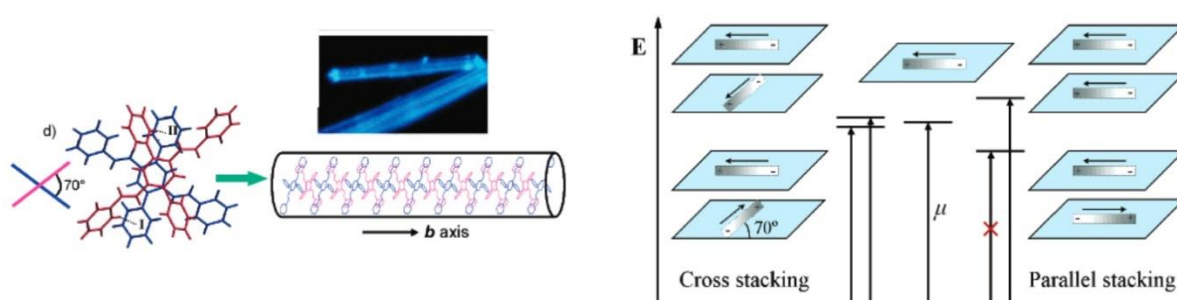


Figure I-26. Configuration en empilement croisé de **DPDSB** (adapté de^[88]).

b) Fluorophores dipolaires émettant à l'état solide dans le proche infrarouge

La difficulté d'obtenir une forte fluorescence à l'état solide dans le proche infrarouge (NIR) provient du faible gap des fluorophores NIR. En effet, plus la différence HOMO-LUMO est faible, plus il est facile pour le chromophore de perdre son énergie par une autre voie que l'émission d'un photon. De plus, le décalage bathochrome de la fluorescence jusqu'au proche infrarouge se fait souvent en étendant la conjugaison à l'aide de polycycles ou alors en augmentant le transfert de charge. La première approche donne généralement des composés plans pouvant facilement s'agréger avec des interactions d'empilement π . La seconde approche augmente le caractère dipolaire du colorant ce qui peut augmenter les interactions dipôle-dipôle et un arrangement tête-bêche des chromophores.

Malgré ces difficultés, ces quinze dernières années, l'ingénierie moléculaire en utilisant les méthodes présentées ci-dessus ainsi que la sérendipité ont permis la synthèse de nombreux fluorophores émettant à l'état solide dans le proche infrarouge.

Dans cette partie, nous allons présenter des fluorophores émettant à l'état solide dans le proche infrarouge. Plus précisément, nous nous concentrerons sur des chromophores à transfert de charge et en particulier sur des dipôles D- π -A. Tous les types d'états solides seront considérés : poudre et cristal bien sûr, mais aussi agrégats en suspension, couches minces pures et dopées... Enfin, la définition de proche infrarouge ayant tendance à varier d'un article à un autre, nous considérons comme proche infrarouge une émission dans la fenêtre biologique, soit supérieure à 650 nm.

- Dans la littérature

Une stratégie de fluorescence à l'état solide souvent employée, notamment par le groupe de B. Z. Tang, consiste en l'utilisation de groupement tétraphényléthylène. Plusieurs chromophores avec un transfert de charge depuis le groupement **TPE** vers un groupement accepteur ont été synthétisés (Figure I-27). Ainsi, le groupe de Bin Liu a étudié des nanoagrégats de **TPEEP** fonctionnalisés avec un peptide améliorant la pénétration dans les cellules, Tat, afin de traquer des cellules stromales de moëlle osseuse depuis leur injection jusqu'au site d'ischémie.^[89] La forte fluorescence, avec un rendement quantique de 35 % à 690 nm, ainsi que la faible génération de ROS de ces agrégats en font un excellent marqueur cellulaire.

Récemment, Xia *et al.* ont synthétisé des agrégats de **TPFE-Rho** stabilisés avec du pluronic F127 qui présentent un déplacement de Stokes élevé et une fluorescence à 654 nm pour l'imagerie cellulaire et le suivi de croissance de tumeur.^[90] Le rendement quantique n'est cependant pas précisé.

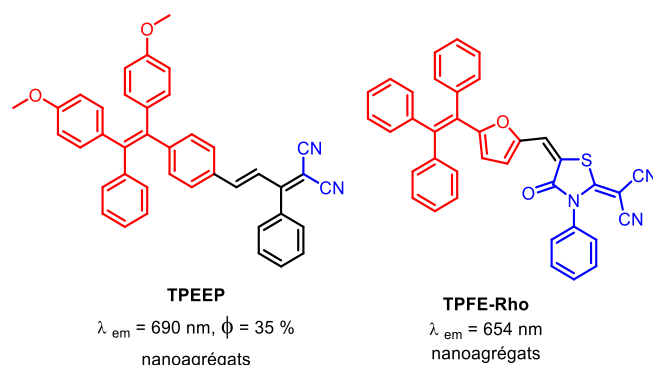


Figure I-27. Structures de chromophores dipolaires basés sur un donneur TPE.^[89,90]

Un autre donneur populaire est la triphénylamine. En effet, sa forme d'hélice couplée à son fort caractère donneur en fait un excellent groupement pour la conception de dipôles avec une fluorescence intense à l'état solide dans le rouge lointain ou dans le NIR.

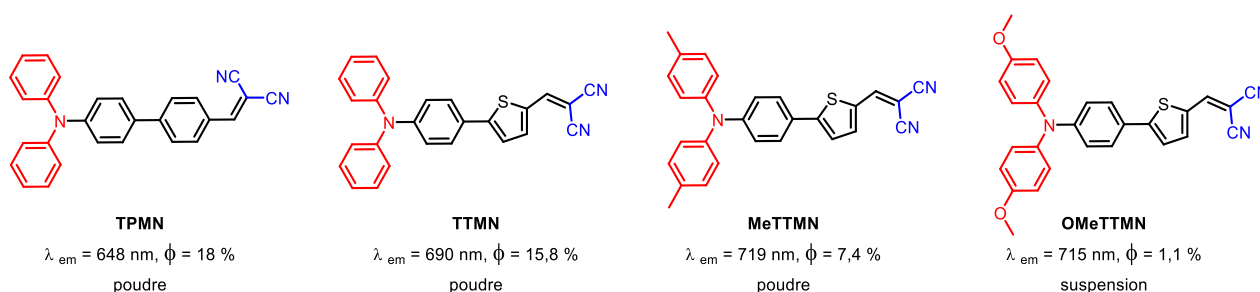


Figure I-28. Chromophores dipolaires émissifs à l'état solide pour l'imagerie de gouttelettes lipidiques.^[91]

Le groupe de B. Z. Tang a synthétisé plusieurs petits chromophores dipolaires présentant une fluorescence intéressante en agrégats (Figure I-28).^[91] La légère variation du donneur ainsi que du pont conjugué permet de modifier la longueur d'onde d'émission entre 650 et 720 nm. En particulier, entre **TPMN** et **TTMN**, la substitution d'un phényle par un thiophène conduit à un décalage bathochrome de 40 nm. L'imagerie cellulaire avec ces chromophores a montré leur accumulation dans les gouttelettes lipidiques.

Des chromophores semblables basés sur un accepteur quinoline-malononitrile (QM) ont été étudié par l'équipe de Zhu (Figure I-29).^[92] Les agrégats obtenus par nanoprécipitation de plusieurs de ces chromophores possèdent une émission dans la fenêtre biologique. Les auteurs ont montré que la morphologie des agrégats était fortement chromophore-dépendante. En particulier, les nanoagrégats sphériques de **QM-5** de diamètres de 85 nm ont montré d'excellentes capacités à cibler passivement et à imager des tumeurs.

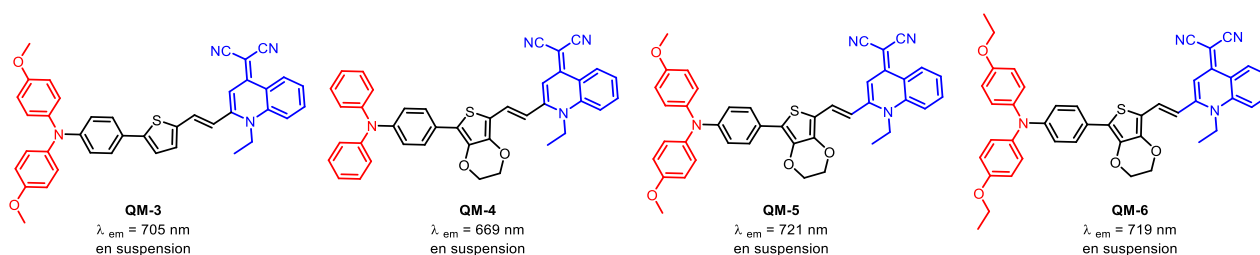


Figure I-29. Chromophores basés sur un transfert de charge entre une triphénylamine et l'accepteur QM.^[92]

Toujours basé sur une triphénylamine, le chromophore **TPABDFN**, synthétisé par Qian *et al.*, a été encapsulé dans des co-agrégats avec du poly(styrène-co-anhydride maléique), PSMA (Figure I-30).^[93] Les auteurs ont montré que l'augmentation du taux de dopage entraîne un décalage bathochrome de la fluorescence mais aussi une chute importante du rendement quantique. Les nanoparticules les plus fluorescentes avec un taux de dopage de 1:25 ont permis l'angiographie du cerveau d'une souris avec craniotomie jusqu'à 1200 μm de profondeur.

Shimizu *et al.* ont synthétisé des 2-donneur-7-accepteur-9-silafluorènes présentant un fort solvatochromisme ainsi que de fortes fluorescences en film net (Figure I-30).^[94] Parmi leurs films de chromophore, celui basé sur un donneur diphénylamine et un accepteur dicyanométhylène possède une fluorescence à 665 nm avec un rendement quantique de 33 %.

Le groupe de Blanchard-Desce a synthétisé plusieurs nanoagréats fluorescents prometteurs pour l'imagerie. En particulier, **HIFON** possède une émission à 800 nm et une brillance calculée à $2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Figure I-30).^[95]

Enfin, récemment, le groupe de B. Z. Tang a publié quatre chromophores émissifs à l'état solide dans la fenêtre biologique basés sur un pont conjugué carbazole (Figure I-30).^[96] Ces chromophores ont montré d'excellentes sections efficaces d'ADP entre 800 et 1000 nm (390-880 GM). Les agrégats de **DCMa**, **DCIs** et **DCFu** ont permis un marquage sélectif des gouttelettes lipidique alors que les agrégats de **DCPy** se concentrent dans les mitochondries. De plus, lorsqu'il est excité avec de la lumière blanche, **DCPy** a montré une forte génération d'oxygène singulet qui peut être intéressante pour des applications de photothérapie.

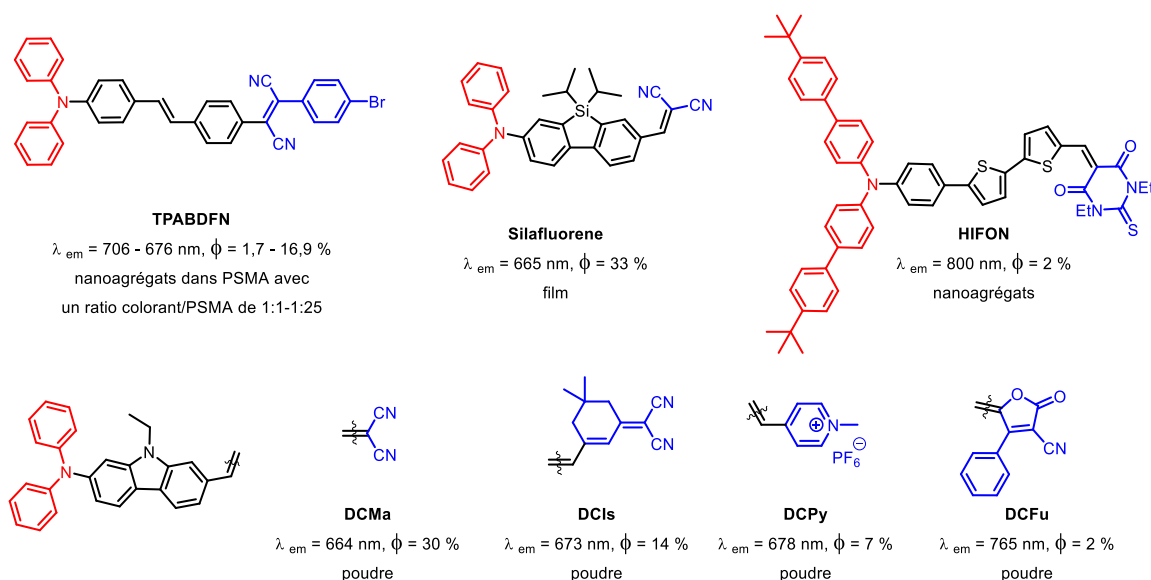


Figure I-30. Chromophores dipolaires émissifs à l'état solide dans la fenêtre biologique basés sur un donneur diphénylamine.^[93-96]

Outre la triphénylamine, d'autres donneurs ont aussi permis d'obtenir des chromophores aux propriétés intéressantes à l'état solide. Par exemple, Singh *et al.* ont synthétisé des chromophores avec un transfert de charge entre une diméthylamine ou un *N*-éthylcarbazole et des dérivés de l'indandione (Figure I-31).^[97] Ces chromophores ont montré une fluorescence intense en agrégats atteignant un rendement de 20 % à 740 nm pour **CbV9**.

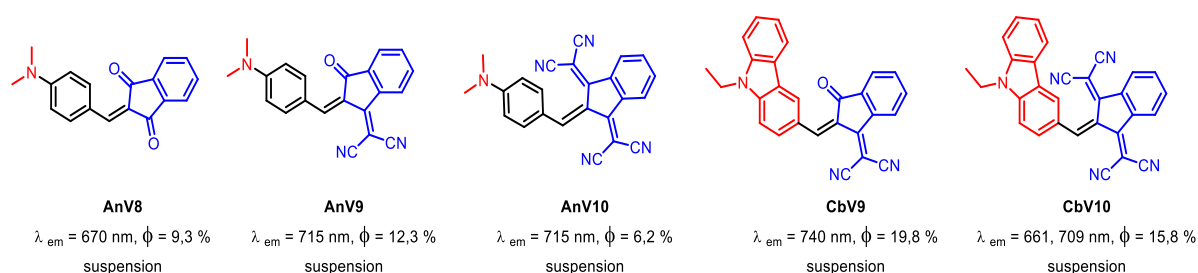


Figure I-31. Chromophores basés sur des donneurs diméthylamine et N-éthylcarbazole.^[97]

D'Aléo et Fagès ont étudié des chromophores basés sur des 2-hydroxychalcones complexés avec du bore (Figure I-32).^[98,99] En faisant varier la structure de la chalcone, les auteurs ont obtenu plusieurs fluorophores fortement émissifs sous forme de poudre entre 722 nm et 855 nm avec des rendements quantiques entre 20 % et 0,1 %. Ils ont aussi montré que ces chromophores peuvent être intégrés dans des films de CBP pour des OLEDs et des lasers organiques émettant dans le proche infrarouge.

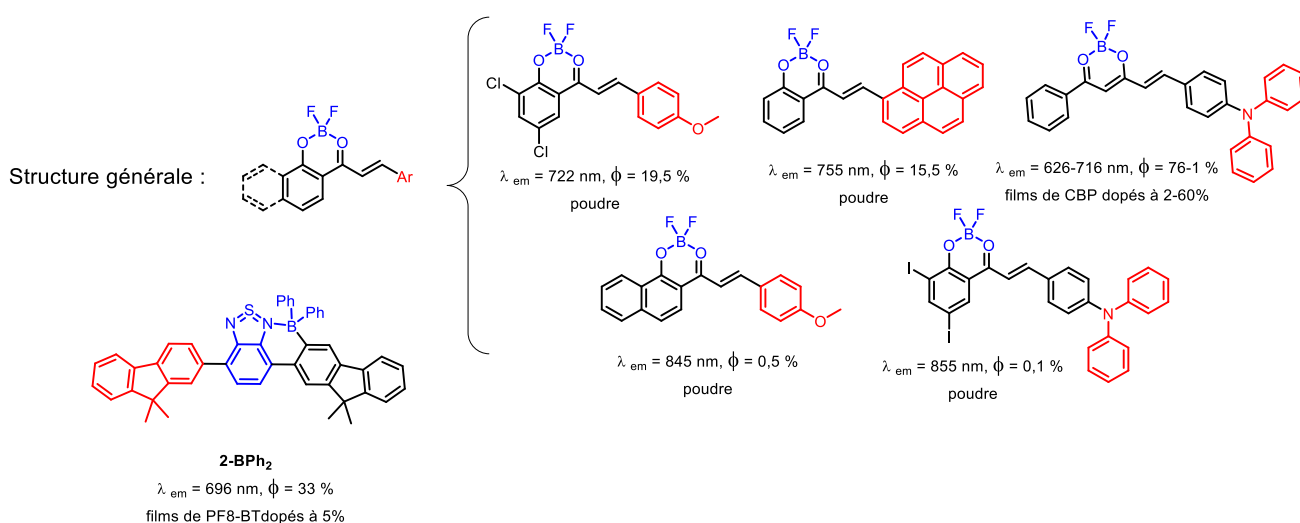


Figure I-32. Fluorophores solides basés sur un complexe de bore.^[98-100]

Enfin, le groupe de Turner a utilisé un complexe de bore pour augmenter la force de l'accepteur, mais aussi rigidifier le système conjugué des chromophores (Figure I-32).^[100] Cette stratégie permet le décalage bathochrome du maximum d'émission d'environ 200 nm tout en améliorant les rendements quantiques en solution. Certains composés, tel que **2-BPh₂**, se sont révélés être émissifs lorsqu'ils sont utilisés comme dopants dans un polymère PF8-BT.

- Chromophores synthétisés par notre groupe

Les travaux sur la fluorescence à l'état solide dans notre groupe ont débuté avec la synthèse d'une série de colorants dipolaires basée sur un transfert de charge entre une aniline et la dicyanoisophorone (Figure I-33).^[101] Ces chromophores possèdent une émission en cristal au-delà de 700 nm. Cependant, les rendements quantiques de fluorescence n'avaient pas pu être mesurés à l'époque.

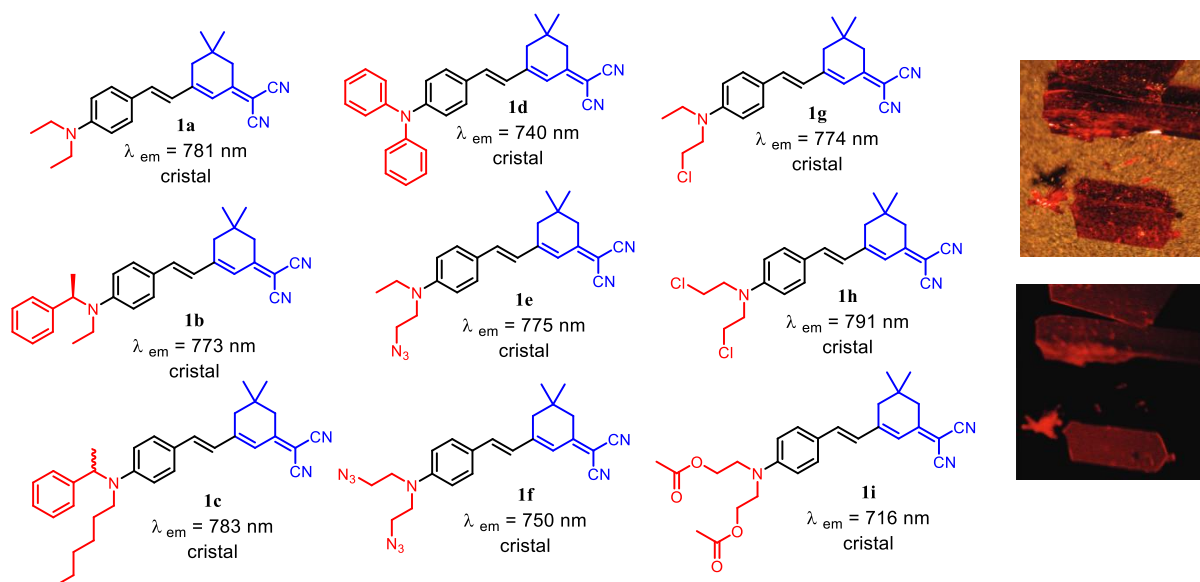


Figure I-33. Structures de chromophores basés sur la dicyanoisophorone et photographie des cristaux sous lumière blanche (haut) et ou lampe UV (Bas, 365 nm) de **1i**.^[101]

Nous avons ensuite synthétisé une famille de chromophores avec un transfert de charge entre des carbazoles ou une diphenylamine et une dizaine d'accepteurs.^[102–104] De nombreux composés de cette famille possèdent une émission à l'état solide dont le maximum varie entre 580 nm et 770 nm en fonction des forces des donneurs/accepteurs et de l'agencement intermoléculaire. Les cinq composés possédant une émission au-delà de 650 nm à l'état solide sont représentés dans la Figure I-34. En particulier, le composé **2d** possède un rendement quantique remarquable de 11% à 735 nm et un accroissement AIE de 969 à 678 nm.

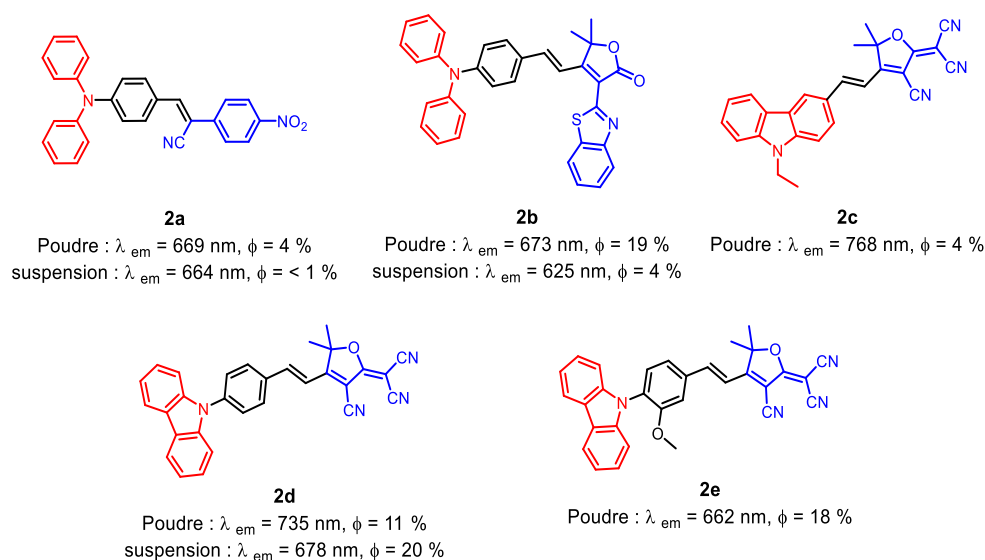


Figure I-34. Dipôles émissifs en poudre ou en suspension basés sur des donneurs aminés.^[102–104]

Puis, nous avons étendu la famille du groupement tricyanofurane (TCF), fortement électroaccepteur, à de nouveaux donneurs, principalement basés sur des méthoxybenzènes.^[67,104] Nous avons pu étudier l'influence sur les propriétés optiques du nombre et de la position des groupements méthoxy sur le cycle. Nous avons représenté dans la Figure I-35 les composés avec une fluorescence dans le proche infrarouge. L'absorption à deux photons à l'état solide a pu être mesurée sur la gamme

720-900 nm. Ces composés souffrent cependant d'un décalage hypsochrome des propriétés entre le cristal et les nanoagrégats, accompagné généralement d'une baisse du rendement quantique de fluorescence en nanoagrégats.

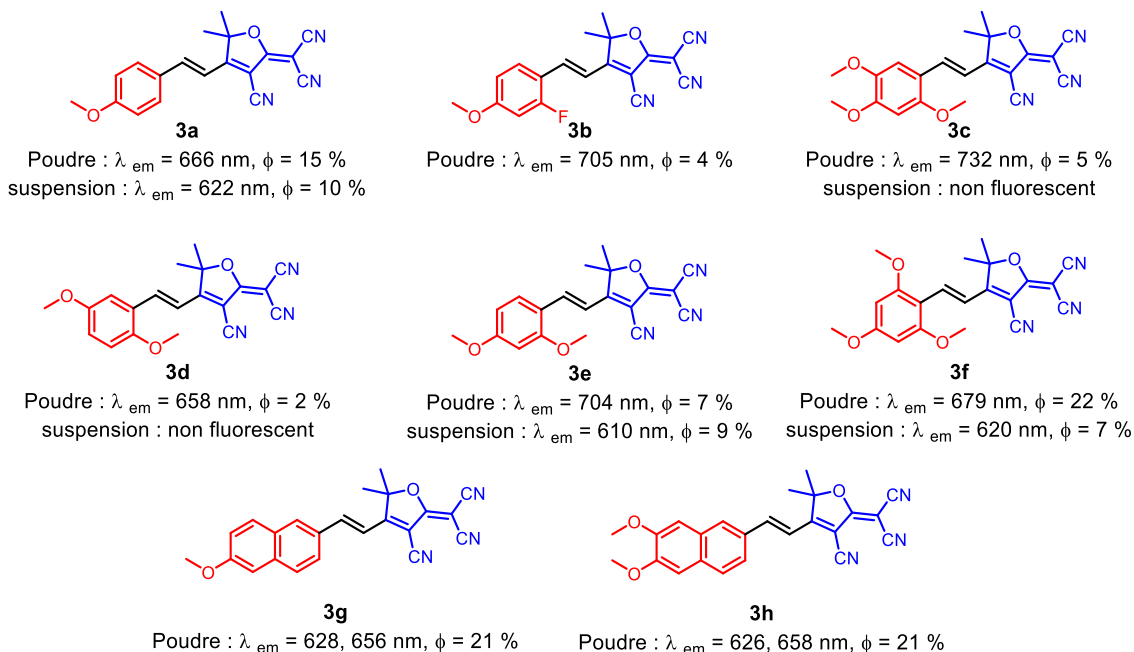


Figure I-35. Dipôles émissifs à l'état solide basés sur des donneurs méthoxys.^[67,104]

Enfin, plus récemment, nous avons synthétisé une série de fluorophores basés sur un groupement fluorène comme pont π conjugué.^[105] La rigidité de ce pont conjugué a permis l'obtention d'excellents rendements de fluorescence en solution organique, notamment dans le chloroforme où des rendements de plus de 40% jusqu'à 720 nm ont été atteints. Ces composés sont aussi fluorescents à l'état solide, en poudre et en suspension dans un mélange eau/acétone, avec des rendements quantiques de fluorescence généralement de l'ordre de quelques pourcents. Le composé le plus fluorescent à l'état solide **a10** a été encapsulé dans des nanoparticules pour l'imagerie de la microvascularisation d'une oreille de souris.^[10]

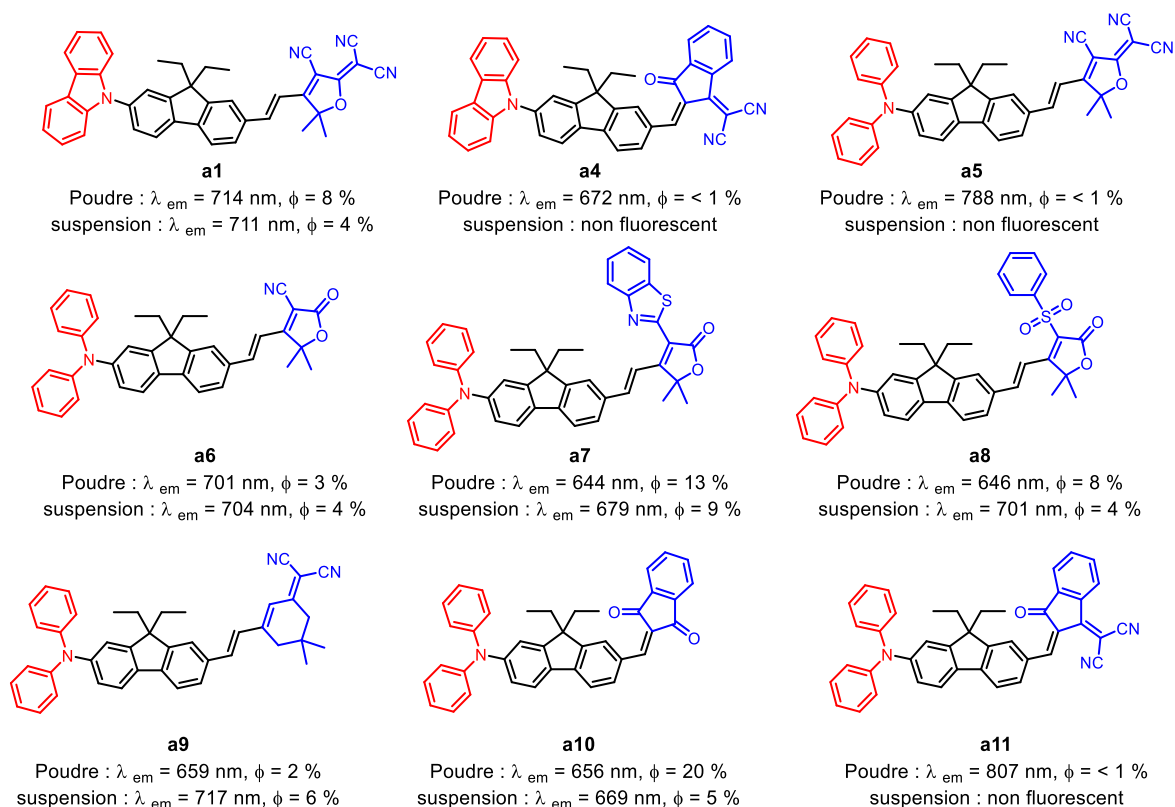


Figure I-36. Chromophores basés sur un pont fluorényle.^[105]

Comme nous venons de voir ci-dessus, la fluorescence à l'état solide de fluorophores dipolaires émettant dépend autant de l'arrangement entre chromophores que des forces de l'accepteur et du donneur. Cela est flagrant dans la série des chromophores basés sur la dicyanoisophorone ou des légères variations sur le groupement donneur entraînent des maxima très différents (65 nm entre **1a** et **1i** sur la Figure I-33). Cet effet est retrouvé dans la série des méthoxybenzène-TCF (Figure I-35) ou sur les donneurs carbazoles où l'augmentation du caractère donneur par l'ajout d'un méthoxy sur le carbazole donne un décalage hypsochrome de l'émission de 75 nm (Figure I-34). La propriété de fluorescence à l'état solide en elle-même peut aussi être totalement perdue par une légère modification de la structure. Ces variations brutales rendent difficile la prévision des propriétés optiques à l'état solide à partir de la structure.

B. Dipôles pour l'imagerie de fluorescence

1. Fenêtre de transparence biologique

a) *Absorption et diffusion par les tissus*

Un des prérequis les plus basiques de l'imagerie optique *in vivo* est de trouver une source lumineuse capable de traverser les tissus de la source jusqu'à la zone à imager puis d'atteindre un détecteur. Bien que notre corps semble opaque à première vue, l'observation d'une lumière blanche au travers de tissus peu épais (joue, doigts, ...) nous prouve le caractère pénétrant des photons rouges. Cette observation pouvait déjà se faire à la lumière d'une bougie. Ainsi dès le XVII^{ème} siècle, Georges de la Tour donnait une lueur rouge aux doigts d'un enfant éclairés en transmission par une bougie dans sa peinture « Saint Joseph Charpentier » (Figure I-37). Cette observation s'explique par deux phénomènes physiques qui vont limiter la propagation d'une onde lumineuse dans des tissus : l'absorption de l'onde et sa diffusion.

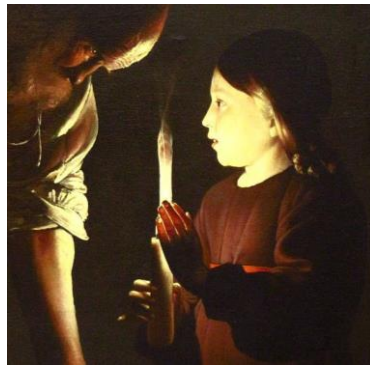


Figure I-37. Zoom sur la peinture de Georges de la Tour « Saint Joseph Charpentier », XVII^{ème} siècle.

En effet, les tissus sont des milieux complexes où fluides, protéines et autres molécules intrinsèques absorbent sur une large gamme spectrale. On peut notamment citer l'hémoglobine, la mélanine mais aussi l'eau qui bien que transparente dans le visible absorbe fortement dans l'ultraviolet (UV) et l'infrarouge (IR). Ainsi, trois fenêtres de transparence biologiques peuvent être définies : la première fenêtre biologique de 650 nm à 950 nm, la deuxième entre 1050 nm et 1350 nm et une troisième entre 1550 nm et 1870 nm (Figure I-38).

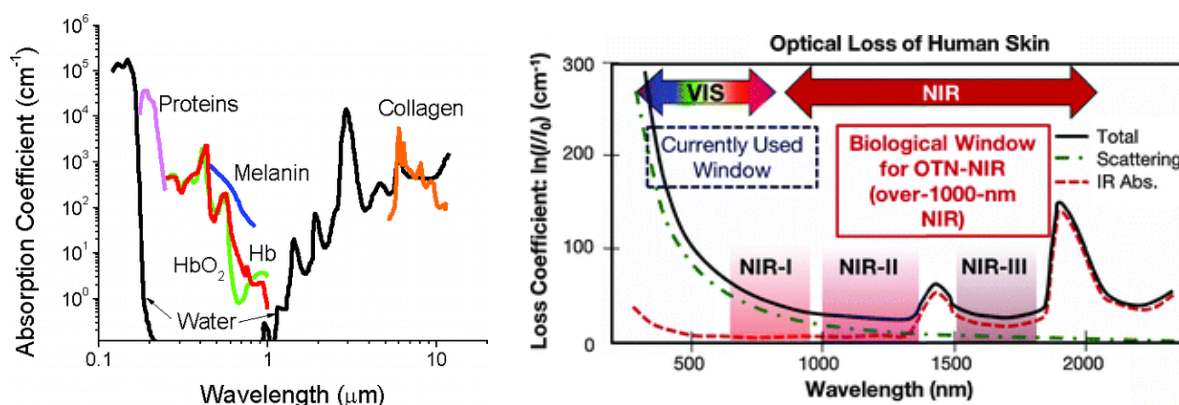


Figure I-38. A gauche : coefficient d'absorption des principaux constituants biologiques.^[106]
A droite : pertes par diffusion en fonction de la longueur d'onde et représentation des différentes fenêtres biologiques.^[107]

Le deuxième phénomène limitant est la diffusion de la lumière par les tissus. La diffusion provient de la rencontre de la lumière avec une particule d'indice de réfraction différent de celui du milieu que parcourent les photons. Les milieux biologiques présentent de nombreuses variations d'indice de réfraction, à la fois à l'échelle des organelles (indice du noyau différent de celui des mitochondries ou du cytoplasme) mais aussi à l'échelle des organes (indice dépendant principalement de la teneur en eau du tissu).^[108] Il existe trois régimes de diffusion en fonction de la taille de la particule diffusante : la diffusion Rayleigh, pour des petites particules ($< \lambda/10$), avec une intensité de diffusion proportionnelle à $1/\lambda^4$, la diffusion Mie, pour des particules plus grosses, qui est plus complexe et qui se fait principalement vers l'avant et enfin la diffusion géométrique pour les structures à l'échelle macroscopique qui peut être traitée par la loi de Snell-Descartes. Outre le fait de limiter la quantité de lumière pouvant exciter les fluorophores, la diffusion pose surtout problème pour localiser le fluorophore ayant émis le photon détecté. En effet, dans les tissus biologiques, le parcours moyen entre deux changements de trajectoire par diffusion est estimé à 20 à 200 μm en fonction des tissus et de la longueur d'onde. La principale méthode pour arriver à localiser la source du signal est l'utilisation des photons dits « balistiques », n'ayant pas été déviés, qui arrivent en premier au détecteur. Cependant plus l'imagerie est profonde, plus le nombre de ces photons balistiques diminue.

Au global, la diffusion Rayleigh est considérée comme étant la plus impactante. Sa dépendance en $1/\lambda^4$ rend la lumière rouge et NIR beaucoup plus pénétrante car moins diffusée (Figure I-38, courbe verte) mais aussi moins absorbée, notamment dans les fenêtres biologiques.

b) Autofluorescence

Il existe un autre phénomène limitant l'utilisation de la lumière bleue, verte ou jaune, même pour l'imagerie peu profonde : l'autofluorescence. En effet, les milieux biologiques contiennent déjà de nombreux fluorophores intrinsèques (NADP, les flavines ou encore toute protéine avec une fraction non négligeable de tyrosine ou de tryptophane). Leur fluorescence crée un bruit de fond et donc une diminution du ratio signal sur bruit. La Figure I-39 montre l'autofluorescence d'une souris avec trois jeux de filtres (excitation/collecte). L'autofluorescence est maximale pour une excitation dans le bleu et une collecte dans le vert. Dans ces conditions la peau, la vésicule biliaire (GB), l'intestin grêle (SI), et la vessie

(BI) fluorescent fortement (image b). Cette autofluorescence diminue grandement si l'excitation/collecte est décalée vers le vert/rouge. Dans ces conditions, il reste encore un peu d'autofluorescence de la peau et de l'intestin grêle (image c). Ce n'est qu'avec une excitation et une collecte dans le proche infrarouge que l'autofluorescence devient négligeable (image d).

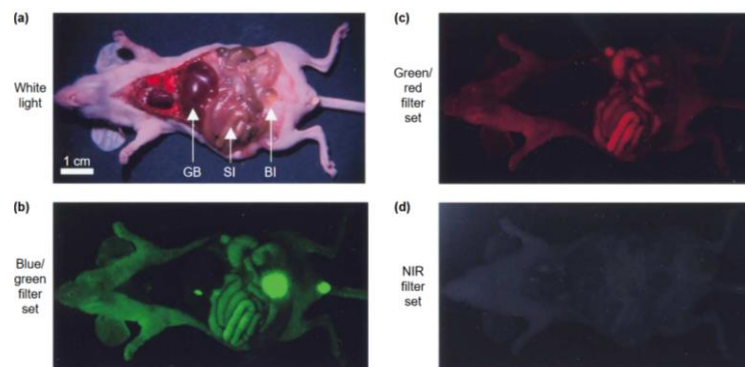


Figure I-39 : Autofluorescence d'une souris en fonction de la longueur d'onde d'excitation et de collecte. (a) photo de la souris après sacrifice sous lumière blanche. Les flèches représentent la vésicule biliaire (GB), l'intestin grêle (SI) et la vessie (BI). Autofluorescence avec différents jeux d'excitation/collecte : (b) bleu/vert (460-500 nm/505-560 nm), (c) vert/rouge (525-555 nm/590-650 nm) et (d) NIR/NIR (725-775 nm/790-830 nm). Conditions d'excitation identiques (2 mW/Cm²). Les temps d'exposition ont été ajustés pour compenser la taille des fenêtres de collecte ainsi que la sensibilité du détecteur. Tiré de [109].

En conclusion, la lumière proche infrarouge est parfaitement adaptée à une utilisation pour l'imagerie. Elle permet de s'affranchir au maximum de l'absorption, de la diffusion et de l'autofluorescence des tissus. L'utilisation de lumière proche infrarouge permet d'atteindre des profondeurs de l'ordre du centimètre, soit dix fois plus que la lumière verte (Figure I-40).

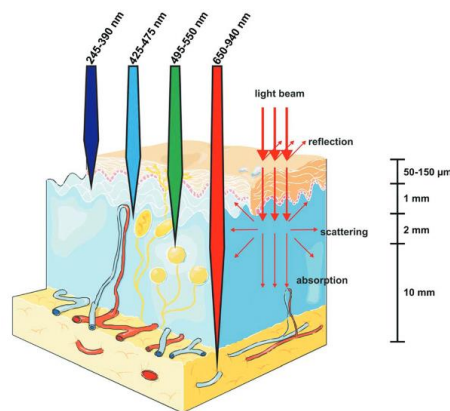


Figure I-40. Profondeur de pénétration de tissus humains en fonction de la longueur d'onde. [110]

2. Intérêt de l'excitation biphotonique pour l'imagerie de fluorescence

Trente ans après la première preuve expérimentale d'ADP, Denk et Webb démontrent l'énorme potentiel de l'excitation biphotonique en imagerie. [111] Un des plus gros avantages qu'apporte l'excitation biphotonique est le décalage de l'excitation dans une fenêtre de transparence biologique (généralement dans NIR-I). En effet, la plupart des colorants dipolaires (donc avec de forts déplacements de Stokes) qui

émettent dans la première fenêtre de transparence biologique ont des absorptions en dessous de 600 nm. Ainsi doubler la longueur d'onde de l'excitatrice permet de meilleures profondeurs de pénétration mais aussi de limiter l'utilisation d'UV, plus nocifs pour le vivant. Pour les composés à faibles déplacements de Stokes, l'ADP peut permettre de récolter l'ensemble du spectre d'émission puisque le filtre dichroïque séparant l'excitatrice des photons émis ne sera plus au milieu du spectre d'émission.^[112]

L'excitation biphotonique permet aussi de restreindre la taille de la zone excitée. En effet, seule la région située au point focal du laser possède une puissance laser suffisante pour le phénomène d'ADP. Cela provient de la nécessité de passer une puissance seuil pour déclencher le phénomène d'ADP (les deux photons doivent arriver dans une fenêtre de temps de l'ordre de l'attoseconde ce qui nécessite un flux de photons important) et de la dépendance quadratique de l'ADP avec cette puissance laser.^[112] Cela permet d'éviter de la fluorescence hors focus qui diminuerait le ratio signal sur bruit. La Figure I-41 compare l'excitation à un photon et biphotonique d'un fluorophore dans une cuvette. Alors que la fluorescence monophotonique se fait sur tout le rayon du faisceau laser, l'excitation biphotonique ne donne qu'un point fluorescent. Cette localisation de la fluorescence dans un volume de l'ordre de grandeur du femtolitre permet aussi de limiter la photo dégradation du fluorophore ainsi que le photodommage des tissus. De plus, il est possible de reconstituer une image 3D en scannant point par point le tissu à imager ce qui permet de s'affranchir des multiples détecteurs et des algorithmes de reconstruction de la tomographie.^[9] En imagerie cellulaire, l'ADP permet de s'affranchir du sténopé de la microscopie confocale et donc de gagner en signal.^[113]



Figure I-41. Comparaison de la fluorescence du safranin O excité à un photon (543 nm, haut) et à deux photons (1046 nm, flèche).^[112]

Enfin, l'excitation biphotonique permet de limiter l'autofluorescence des tissus. En effet la plupart des fluorophores endogènes possèdent des sections efficaces d'ADP inférieur à 1 GM.^[9] Ainsi, un colorant avec une section efficace correcte sera beaucoup plus visible que les molécules fluorescentes endogènes. En outre, les fluorophores endogènes hors du point focal seront complètement invisibles par excitation biphotonique.

Depuis plus de 25 ans, le développement de l'imagerie de fluorescence à excitation biphotonique a permis d'augmenter grandement le ratio signal sur bruit de l'imagerie *in vivo* mais aussi d'accroître les profondeurs de pénétration accessibles et de pouvoir faire de l'imagerie 3D de tissus sans utiliser d'algorithmes de reconstitution d'image.

3. Intérêt des dipôles pour l'imagerie de fluorescence

Comme nous l'avons vu précédemment, les dipôles ont des déplacements de Stokes modérés à grands, notamment en milieux polaires comme les milieux biologiques. Ces grands déplacements de Stokes ont trois avantages en imagerie. Le premier est de diminuer l'autofluorescence en distinguant les dipôles des fluorophores endogènes aux déplacements de Stokes généralement faibles. Cela permet aussi de décaler l'émission dans le rouge où le proche infrarouge et donc de permettre une imagerie de profondeur. Enfin le faible recouvrement entre les spectres d'absorption et d'émission permet d'avoir un spectre d'émission complètement collectable, car séparé de l'excitatrice, mais aussi de diminuer l'auto-absorption et donc de maximiser les chances qu'un photon émis arrive au détecteur.

De plus, les dipôles sont particulièrement bien adaptés pour obtenir de nombreuses informations supplémentaires sur l'environnement du fluorophore. Nous avons déjà parlé de leur utilisation en tant que sonde de polarité grâce à leur fort solvatochromisme. Si leur structure incorpore des rotors, ils peuvent aussi être utilisés comme sonde de viscosité.^[114–116] Enfin, toute modification de la force du donneur ou de l'accepteur entraînera un changement des propriétés optiques du chromophore et donc la possibilité de sonder la cause de cette modification.

Cependant, les dipôles ont souvent des absorptions modérées (coefficient d'absorption molaire entre 20 000 et 60 000 L.mol⁻¹.cm⁻¹), il peut donc être difficile d'obtenir des brillances élevées ($B = \Phi\varepsilon$). Pour pallier ce problème, on choisira une approche nanoparticulaire qui nous permettra aussi d'obtenir des objets fortement absorbants mais aussi présentant une stabilité colloïdale pour les applications dans l'eau ou en milieu biologique.

C. Dipôles pour l'imagerie photoacoustique

1. Phénomène photoacoustique

a) Principes de la photoacoustique

Malgré tous leurs avantages, les techniques d'imagerie optique (microscopie confocale, microscopie à deux photons, tomographie à cohérence optique...) présentent une faiblesse commune : le faible libre parcours moyen d'un photon dans les milieux biologiques extrêmement diffusants. Même en utilisant de la lumière NIR, dont nous avons vanté les mérites dans la partie précédente, le libre parcours moyen n'est que de 100-200 μm .^[117,118] Cela correspond à une moyenne de cinq à dix événements de diffusion par millimètre de tissus traversés. Même si la diffusion est très anisotrope et se fait majoritairement vers l'avant (ce qui permet à la lumière infrarouge de traverser plusieurs centimètres de tissu), le nombre de photons balistiques diminue très rapidement avec la profondeur. Ainsi, au-delà d'un millimètre, il devient difficile de focaliser le laser dans un faible volume (ce qui gêne une excitation biphotonique) mais aussi de détecter les photons émis et de déterminer leur provenance, si l'excitation n'est pas localisée. En somme, avec les techniques d'imagerie optique, plus la zone à imager se situe en profondeur, moins l'image sera résolue. Pour pallier cette limitation au mieux millimétrique, une nouvelle technique d'imagerie hybride est apparue : l'imagerie photoacoustique.

L'imagerie photoacoustique (aussi appelée optoacoustique) est basée sur la conversion de lumière en ondes acoustiques par l'effet photoacoustique (PA). Lorsqu'une molécule absorbe de la lumière, elle peut restituer cette énergie sous la forme de chaleur, ce qui provoque une élévation locale de la température et donc, en milieu biologique, une dilatation thermoélastique des tissus environnants (Figure I-42). Si la source lumineuse est pulsée, l'alternance de dilatation/rétraction des tissus va créer une onde de pression qui va se propager dans les tissus.

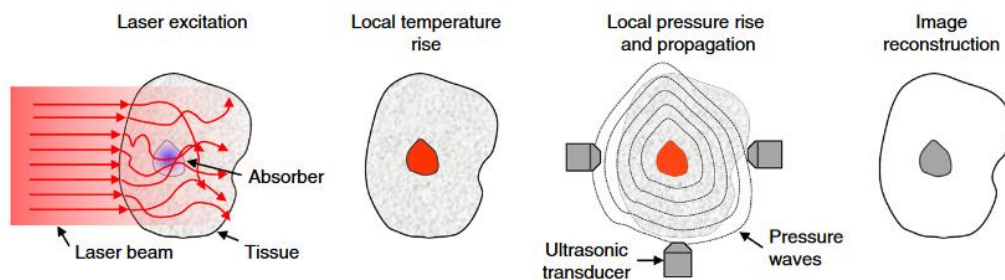


Figure I-42. Principe de l'imagerie PA.^[119]

Cette onde peut être mesurée par des transducteurs piézoélectriques classiquement utilisés en échographie. Cette technique combine donc les avantages d'une excitation optique et d'une détection acoustique :

- Faible diffusion des ultrasons

Puisque la diffusion des ultrasons est plus faible de trois ordres de grandeur que la diffusion optique dans les tissus biologiques, il est beaucoup plus facile de détecter le signal émis par la zone à imager. La profondeur de d'imagerie n'est limitée que par la profondeur de pénétration de la lumière excitatrice et peut donc atteindre 5-6 cm tout en gardant des puissances laser considérées comme inoffensives.^[120,121]

- Résolution optique ou acoustique

A faible profondeur (< 1 mm) il est possible d'obtenir une résolution optique (résolution de quelques μm) en imageant point par point avec un laser focalisé.^[122] Pour une imagerie plus en profondeur, la résolution est donnée par le transducteur acoustique et la fréquence de l'onde sonore. Les résolutions sont alors de l'ordre de grandeur de 50 μm en résolution latérale et de 15 μm en résolution axiale.^[123]

- Contraste d'absorption

Contrairement à l'échographie où le faible contraste est dû à des différences dans les propriétés élastiques des tissus, le contraste PA provient des différences d'absorption de la lumière incidente. Ainsi, une zone ne contenant aucune molécule absorbante ne produira aucun signal PA. De plus, en utilisant plusieurs longueurs d'onde pour exciter différents colorants, il est possible de créer une image multi-contrastée. Enfin, les molécules n'ont pas besoin d'être fluorescentes, ce qui permet la valorisation des nombreux colorants peu ou pas fluorescents.

Cependant, la photoacoustique combine aussi les désavantages optiques et acoustiques. On peut par exemple citer les photo-dégâts pouvant être engendrés par une excitation optique ou la nécessité d'avoir un milieu transmettant les ultrasons entre le sujet à imager et le transducteur (eau ou gel à ultrasons). Ces quelques défauts sont largement compensés par les nombreux avantages qui donnent un incroyable potentiel à l'imagerie PA. Dans cette partie, afin de donner au lecteur un aperçu des applications de la PA, nous allons d'abord présenter un résumé des prémices de l'imagerie et de la microscopie PA. Puis nous nous recentrerons sur les colorants utilisés comme agents de contraste exogènes et sur les conditions pour obtenir un bon agent de contraste.

b) De l'effet photoacoustique aux débuts de la tomographie photoacoustique

L'effet photoacoustique a été découvert par Alexander Bell en 1880 par l'observation de la génération d'ondes sonores par du sélénium éclairé par une lumière modulée.^[124] Il avait été remarqué que la résistance électrique du sélénium diminuait lorsque celui-ci était éclairé. Bell voulait utiliser cette découverte pour créer un « photophone » (Figure I-43) en encodant la voix dans des fluctuations d'intensité lumineuse et en la restituant dans un téléphone par variation du courant électrique. Cependant, Bell se rendit compte que le sélénium (puis d'autres matières) produisait directement des ondes sonores lorsqu'elles étaient exposées à de rapides variations d'intensité lumineuse, sans avoir besoin de circuit

électrique et d'un récepteur. Bell expliquait cette création d'onde sonore par une perturbation moléculaire créée par la lumière.

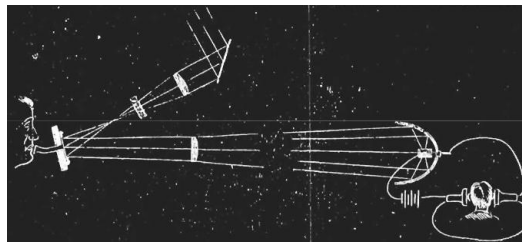


Figure I-43. « Photophone » d'A. Bell : un miroir avec diaphragme est utilisé pour encoder la voix en vibrations de lumière qui est focalisée sur un morceau de sélénium et modifie la résistance du circuit ainsi que le son produit par le téléphone.^[124]

Tout comme l'optique non-linéaire, la photoacoustique a dû attendre l'invention et le développement des lasers afin de connaître son véritable essor. Depuis les années 60, plusieurs applications basées sur ce phénomène ont été développées : la caractérisation non destructive de matériaux par spectroscopie photoacoustique (spectre d'excitation avec détection photoacoustique) ou la mesure de leurs propriétés thermoélastiques,^[125] l'études des procédés de désexcitation non radiatifs de composés luminescents et enfin l'imagerie biomédicale...^[126,127]

Le principe de l'imagerie photoacoustique découle de celui de la thermoacoustique que Bowen *et al.* ont démontré au début des années 80.^[128,129] Dans cette première expérience, l'onde acoustique est créée par une expansion thermique périodique du milieu engendrée par des pulsations de 0,4 μ s d'un courant électrique. Cette onde est détectée au travers d'un gel simulant un muscle et d'une couche d'huile simulant une couche lipidique. Plus tard, le courant électrique est remplacé par des rayonnements micro-ondes (5.66 GHz^[130] ou 3 GHz^[131]) ou ultra-hautes fréquences (434 MHz^[132]). Ce n'est qu'au milieu des années 90 que les groupes de Oraevsky et Kruger ont publié les premiers exemples de détection d'un signal photoacoustique créé à l'aide d'un laser Nd:YAG à 1,06 μ M.^[133–135] Le groupe d'Oraevsky a utilisé le signal photoacoustique pour caractériser l'absorption et les coefficient de diffusion de différents tissus à trois longueurs d'onde : 1064 nm, 532 nm et 355 nm. Celui de Kruger s'est intéressé à détecter un fantôme rempli d'encre de chine au centre d'un milieu diffusant.^[135] Une année plus tard, en 1995, la première image de tomographie photoacoustique 2D est publiée par Kruger *et al.*, toujours avec un fantôme dans un milieu diffusant (Figure I-44, gauche).^[136] S'en suivent plusieurs démonstrations sur fantôme des potentielles applications de la méthode : détection précoce des tumeurs au travers de plusieurs centimètres de tissus *ex vivo* (Figure I-44, milieu)^[137] et en angiographie *ex vivo* (avec un laser à 532 nm ou avec un laser à 1060 nm).^[138,139]

Ces travaux préliminaires de l'imagerie photoacoustique furent récompensés en 2003 par Kolkman *et al.* qui publièrent la première image photoacoustique *in vivo* de l'hémoglobine dans des vaisseaux sanguins d'un poignet humain (Figure I-44, droite).^[140]

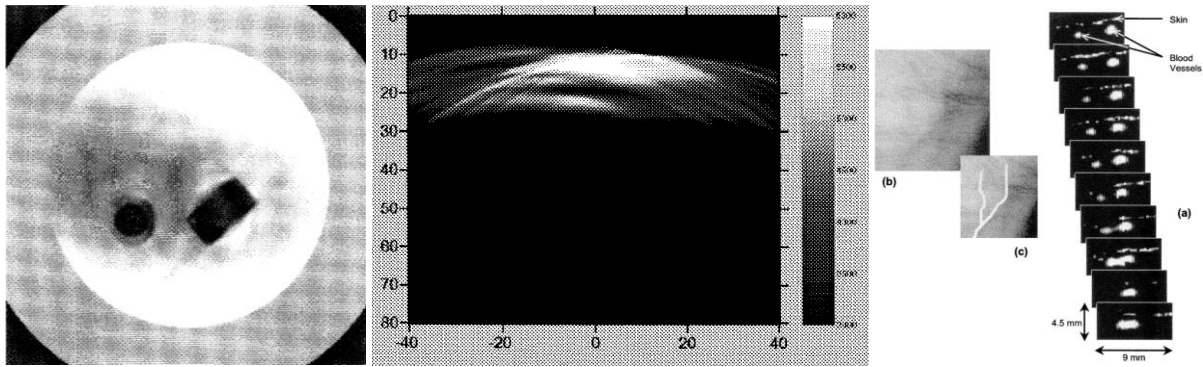


Figure I-44. Gauche : première image de tomographie 2D d'un fantôme rempli d'encre de chine dans un milieu diffusant.^[136]
Milieu : image PA d'une tumeur de 2 cm dans un sein quelques minutes après excision.^[137]
Droite : première image PA in vivo (angiographie d'un poignet humain).^[140]

Quelques mois plus tard, Wang *et al.* ont réalisé une tomographie PA d'un cerveau de rat sans avoir besoin de réaliser de craniotomie. Ils ont réussi à visualiser la structure du cerveau, mais aussi la présence de lésions, les réponses cérébrales hémodynamiques à l'hypoxie ou l'hyperoxie ainsi que les réponses cérébrales à la stimulation des moustaches du rat (Figure I-45, gauche et milieu).^[141]

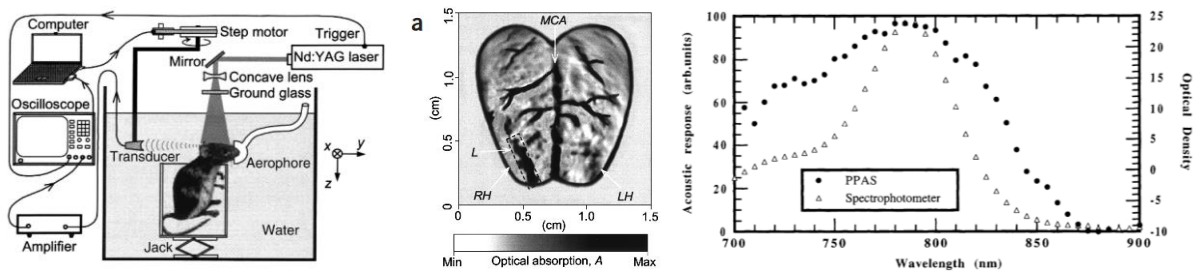


Figure I-45. Gauche : dispositif utilisé par Wang *et al.* pour l'imagerie photoacoustique in vivo du cerveau d'un rat. Le laser Nd:YAG est doublé pour émettre à 532 nm.
Milieu : image de cerveau d'un rat. On distingue les deux hémisphères (RH = right hemisphere et LH = left hemisphere), une lésion (L) ainsi que l'artère centrale (MCA = middle cerebral artery).^[141]
Droite : absorption optique (triangles) et acoustique (ronds) de l'IndoCyanine Green.^[142]

Les premières études d'imagerie photoacoustique mentionnées ci-dessus sont limitées par l'utilisation d'un laser Nd:YAG ce qui restreint la longueur d'onde à 1064 nm ou aux harmoniques : 532 nm et 355 nm. Néanmoins, la démocratisation de nouveaux lasers femtosecondes (notamment du laser Ti:Saphir) et plus tard l'apparition de diodes lasers vont permettre la disponibilité d'une large gamme de longueur d'onde et donc une sélection plus fine des absorbants visés ainsi que de nouvelles applications. Ainsi, ces nouvelles gammes de longueurs d'onde ont permis les premières utilisations d'agents de contraste exogènes tel que l'indocyanine green (ICG, Figure I-45, droite) ou encore d'améliorer les mesures d'hypoxie/hyperoxie en utilisant plusieurs longueurs d'onde en jouant sur la différence d'absorption entre l'hémoglobine et sa forme oxygénée.^[142,143]

En conclusion, ces travaux précurseurs entre 1994 et 2003 ont démontré le grand intérêt de la tomographie photoacoustique notamment en tant qu'imagerie *in vivo* non-invasive et ont su attirer l'attention de la communauté scientifique puisque le nombre d'articles contenant « photoacoustic imaging » a augmenté de façon exponentielle, de 30 en 2003 à plus de 750 en 2017 (Web of Science). Cet intérêt s'est concrétisé par une amélioration constante des techniques et des algorithmes, suivie par la commercialisation d'appareils à tomographie photoacoustique pour des applications précliniques. Pour

plus de détails sur les progrès de la tomographie PA, nous invitons le lecteur à lire les différentes revues citées ici.^[119,127,144,145] Dans la suite, ce manuscrit sera consacré à la microscopie photoacoustique.

c) *Microscopie photoacoustique*

En 2005, Maslov, Wang et al. ont développé un nouveau champ de l'imagerie photoacoustique : la microscopie photoacoustique (PAM).^[146] Contrairement à la tomographie PA, aucun algorithme de reconstruction d'image 3D n'est nécessaire en PAM : les tissus sont juste scannés plan par plan à l'aide d'un focus optique ou acoustique avec une résolution supérieure à la tomographie. La PAM peut être séparée en deux catégories : la PAM à résolution optique (OR-PAM) et la PAM à résolution acoustique (AR-PAM) en fonction de la réalisation du scan. Si la zone à imager est balayée par le point focal du laser alors la résolution sera optique et si elle est balayée par un transducteur à ultrason focalisé alors la résolution sera acoustique. Dans tous les cas, la résolution de l'imagerie peut être divisée en résolution axiale, la résolution sur la profondeur d'imagerie, et en résolution latérale, la résolution des objets dans le plan scanné.

- La résolution latérale optique $R_{L,O}$ et celle acoustique $R_{L,A}$ sont données par les équations (I-14) et (I-15) :

$$R_{L,O} = 0,51 \frac{\lambda}{NA_O} \quad (I-14)$$

$$R_{L,A} = 0,71 \frac{\lambda}{NA_A} \quad (I-15)$$

Avec NA_O et NA_A respectivement l'ouverture numérique de l'objectif et du transducteur ultrasonique. Les constantes reflètent la largeur à mi-hauteur de l'intensité de la tache focale optique ou de l'amplitude de la tache focale acoustique.

Ainsi, la résolution latérale peut être améliorée en diminuant la longueur d'onde (au détriment de la profondeur d'imagerie) ou en augmentant l'ouverture numérique de l'objectif (en utilisant une huile d'immersion par exemple).

- Les résolutions axiales optique $R_{A,O}$ et acoustique $R_{A,A}$ sont données par la même équation (I-16) :

$$R_{A,O} = R_{A,A} = 0,88 v_A / \Delta f_A \quad (I-16)$$

Avec v_A la vitesse de l'onde acoustique dans le milieu et Δf_A la largeur de bande des fréquences PA générées.

Cette résolution axiale augmente avec la profondeur d'imagerie car les ondes acoustiques de plus hautes fréquences s'atténuent vite entraînant une diminution de la largeur de bande.

Un autre paramètre important pour comparer les deux techniques de PAM est la profondeur maximale d'imagerie. L'OR-PAM est limitée au millimètre, profondeur à partir de laquelle la forte diffusion optique empêche le focus laser. Concernant l'AR-PAM, la limitation provient de l'atténuation de l'onde

acoustique mais aussi de la profondeur accessible aux photons, et donc de la fréquence acoustique et de la longueur d'onde optique. L'AR-PAM permet d'imager jusqu'au centimètre.

Ces différences de résolution et de profondeur d'imagerie font de la PAM une technique multi échelle permettant d'imager des objets de la taille d'un globule rouge ou d'une tumeur. En fonction de l'objet et de sa profondeur, il est possible de choisir entre l'OR-PAM qui permet d'avoir de meilleures résolutions latérales ou l'AR-PAM qui permet une imagerie plus profonde.^[147] Au début, la plupart des microscopes photoacoustiques ne fonctionnaient qu'en mode OR-PAM ou AR-PAM. En 2013, Wang *et al.* ont conçu un microscope pouvant fonctionner à la fois en OR-PAM (résolution de 2,2 μm , jusqu'à 1,3 mm de profondeur) et en AR-PAM (résolution de 40 μm , jusqu'à 3 mm de profondeur).^[148] Ce microscope leur a permis d'imager la microvascularisation de l'oreille d'une souris à différentes échelles (Figure I-46).

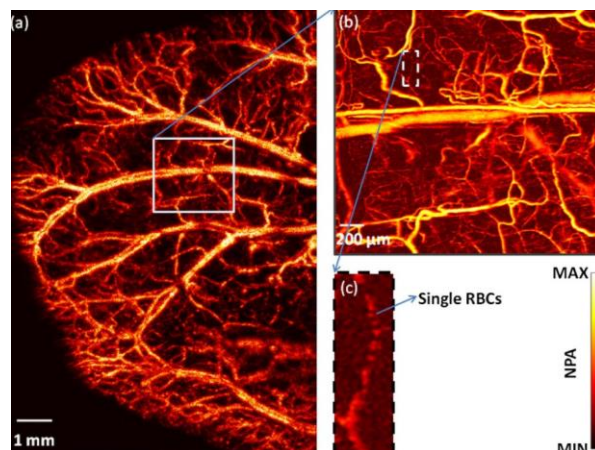


Figure I-46. Image photoacoustique de la micro vascularisation d'une oreille de souris par l'équipe de Wang.^[148]

(a) : large région imagée par AR-PAM.

(b) : région d'intérêt imagée par OR-PAM.

(c) : zoom sur l'image (b) permettant de distinguer un unique globule rouge (RBC).

Depuis sa création, la PAM n'a cessé d'accroître ses performances et de se trouver de nouvelles applications. Ainsi, la super résolution a été atteinte récemment pour l'OR-PAM par diverses techniques comme la saturation optique de l'absorbant, par expansion thermique non linéaire ou par absorption à deux photons.^[149,150]

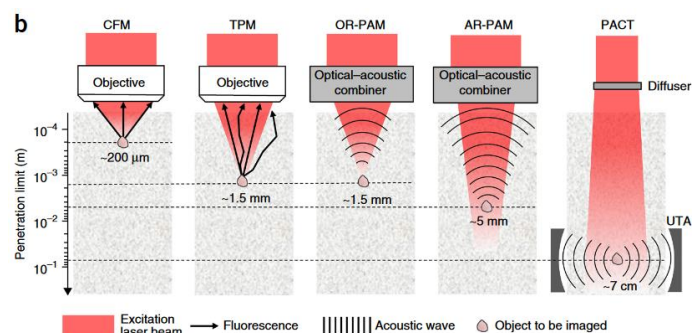


Figure I-47. Comparaison des profondeurs d'imagerie atteignables avec la microscopie confocale (CFM), la microscopie biphotonique (TPM), l'OR-PAM, l'AR-PAM et la tomographie photoacoustique (PACT).^[119]

En résumé, la PAM offre une résolution bien meilleure que la tomographie photoacoustique au prix d'une profondeur d'imagerie, pour l'instant, nettement plus faible (Figure I-47). Cette méthode est

idéale pour l'angiographie et présente, pour l'OR-PAM, une résolution inférieure à la taille des capillaires sanguins (5-10 μm).

2. Agents de contraste exogènes pour l'imagerie photoacoustique

L'imagerie photoacoustique possède un contraste optique. Par conséquent, plus l'absorbant est performant et localisé, meilleur sera le contraste. Dans les exemples présentés jusqu'à maintenant, les seuls absorbants utilisés étaient des chromophores endogènes, généralement les formes oxygénées et désoxygénées de l'hémoglobine. Bien que l'hémoglobine possède un fort coefficient d'absorption molaire, son absorption est majoritairement localisée entre 350 et 650 nm. Cette absorption contraint l'utilisateur à choisir entre un laser NIR pénétrant au prix de mauvais coefficients d'absorption ($\approx 10^3 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) ou un laser peu pénétrant afin d'exciter au maximum d'absorption de l'hémoglobine ($10^5 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ à 430 nm ou $10^4 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ à 500 nm). Une autre limite à l'utilisation de l'hémoglobine comme agent de contraste vient du flux discontinu des globules rouges dans les capillaires. Ainsi lors d'un pulse, il se peut qu'aucun globule rouge ne soit présent dans la portion du capillaire scannée, ce qui crée une discontinuité dans les images (Figure I-46).

Ainsi, l'utilisation d'agents de contraste exogènes permet d'améliorer grandement le contraste et les performances de l'imagerie photoacoustique mais aussi d'étendre la gamme de longueurs d'onde utilisables. De plus, l'utilisation de plusieurs agents de contraste rend possible la réalisation d'images multi-contrastées et donc l'imagerie simultanée de plusieurs éléments (une tumeur et sa vascularisation par exemple). Enfin, les agents de contraste permettent aussi de rendre visible des phénomènes ou des composés non absorbants et donc le développement de sondes photoacoustiques pour détecter la présence d'un marqueur ou d'une activité biologique.^[151] Ces avantages ont poussé de nombreux groupes de recherche à essayer des colorants commerciaux ou à en synthétiser des nouveaux. Comme nous allons le voir dans cette partie, il existe de nombreuses familles d'agents de contraste (Figure I-48) présentant chacune leurs avantages et leurs défauts.^[123,152-155]

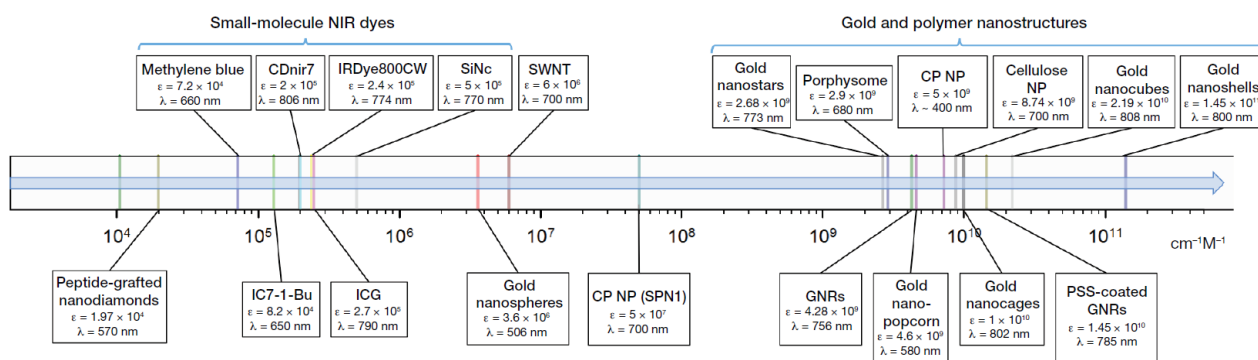


Figure I-48. Coefficient d'absorption d'agents de contraste utilisés en imagerie photoacoustique.^[152]
 Abréviations : SWNT = nanotubes de carbone simple-feuillets, CP NP = nanoparticules de polymères conducteurs, GNR = nanobâtonnets d'or, NP = nanoparticules.

a) Nanoparticules inorganiques

Les nanoparticules inorganiques ont été largement utilisées comme absorbants pour l'imagerie photoacoustique, en particulier les nanoparticules d'or et d'argent qui possèdent une absorption intense grâce à l'effet de résonance plasmonique de surface. Cet effet correspond à l'oscillation collective des électrons de surface de la nanoparticule grâce à un couplage avec les photons incidents. Ce couplage, et donc le spectre et le coefficient d'absorption, dépendent de la taille, de la géométrie et de la composition de la nanoparticule. Par exemple, plus un nano-bâtonnet d'or est allongé, plus la bande d'absorption est décalée de manière bathochrome.^[156] Ainsi des nanoparticules plasmoniques de diverses tailles et formes ont été synthétisées pour l'imagerie photoacoustique avec chacune leurs caractéristiques optiques.^[157,158]

Parmi les différentes nanoparticules plasmoniques, les plus utilisées en photoacoustique sont les nanobâtonnets d'or.^[159] Ces nanobâtonnets présentent une excellente réponse photoacoustique (Figure I-49, gauche) et ont par exemple été utilisés pour imager des tumeurs dans le petit animal (Figure I-49, droite).^[160,161] Il est aussi possible de leur rajouter une fine coquille de silice afin d'accroître encore plus leur réponse photoacoustique par réduction de la résistance thermique interfaciale entre l'or et le solvant.^[162]

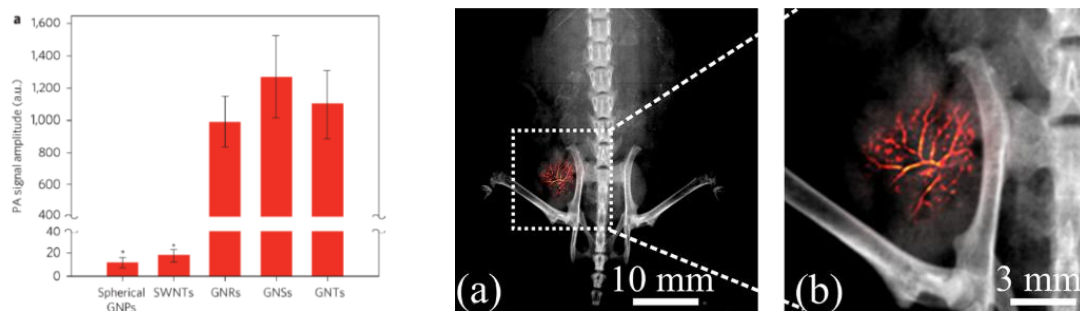


Figure I-49. Gauche : signal photoacoustique pour différentes structures de nanoparticules d'or.^[160]
GNPs : nanoparticules d'or, SWNTs : nanotubes de carbone simple-feuillet, GNRs : nanobâtonnets d'or, GNSs : nanocoquille d'or,
GNTs : nanotubes d'or.
Droite : imagerie combinée rayons-X/photoacoustique d'une tumeur in vivo.^[161]

Les autres nanostructures d'or n'ont pas été délaissées. Des nano-coquilles d'or (nanoparticules sphériques de silice entourées d'une couche d'or) et des nano-cages d'or (cubes poreux) ont par exemple permis à Wang *et al.* d'améliorer sensiblement le contraste de la vascularisation du cortex cérébral d'un rat (augmentation du signal de 80 % par rapport à l'hémoglobine, Figure I-50, gauche et milieu).^[163,164] Puis, plus tard, le même groupe a réalisé l'imagerie photoacoustique d'un mélanome avec une excellente sélectivité et sensibilité à l'aide de nano-cages recouvertes d'un peptide ciblant (Figure I-50, droite).^[165] Enfin, des nano-étoiles et nano-tripodes en or ont également été étudié pour l'imagerie photoacoustique, cependant leurs synthèses restent moins accessibles.^[166,167]

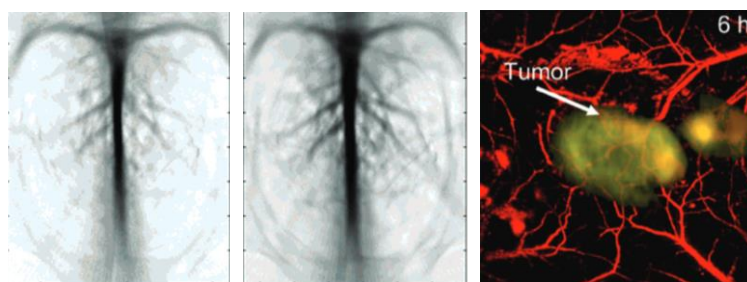


Figure I-50. Gauche : image du cortex cérébral d'un rat avant l'ajout de nano-cages d'or. Excitation à 800 nm.
Milieu : image du cortex cérébral deux heures après l'ajout de nano-cages d'or.^[163]
Droite : imagerie photoacoustique simultanée de l'hémoglobine (570 nm) et de nano-cages d'or (778 nm) dans un mélanome.^[165]

Outre la grande flexibilité de leurs propriétés optiques, un autre avantage des nanoparticules d'or est la facilité de fonctionnalisation grâce aux liaisons fortes Au-S ce qui permet l'ajout de groupements pour améliorer la stabilité, la furtivité, pour le ciblage ou pour l'imagerie multimodale.

Les nanoparticules d'argent sont généralement considérées comme moins stables et plus toxiques que leurs homologues dorés.^[168] Cependant certains groupes ont réussi à contourner ces problèmes en utilisant des réactifs et des groupement stabilisants biocompatibles.^[169] Des nano-plaquettes d'argent avec un maximum d'absorption à 1050 (proche du rayonnement d'un laser Nd:YAG) ont été synthétisé par Homan *et al.* Cependant cela nécessite une augmentation de leur taille trop importante pour de l'imagerie *in vivo* (> 200 nm) ce qui se traduit par un captage rapide des nanoparticules par le système réticulo-endothélial.^[170]

En conclusion, les nanoparticules d'or font actuellement partie des agents de contraste les plus performants pour l'imagerie PA grâce à leur absorption intense, relativement fine et modulable. Elles sont grandement préférées aux nanoparticules d'argent ou à d'autres types de nanoparticules inorganiques (CuS,^[171] quantum dots pour une imagerie dual fluorescence/photoacoustique^[172]). Cependant, les nanoparticules d'or souffrent du même problème de toxicité que de nombreuses nanoparticules inorganiques avec une biocompatibilité qui dépend énormément de leur forme, taille, potentiel ζ et méthode de synthèse... Par exemple, l'utilisation de bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB), pour augmenter la stabilité colloïdale ou pour accéder à certaines formes, est néfaste pour des applications *in vivo* à cause de sa toxicité et des difficultés pour s'en débarrasser.^[173] Cette nocivité variable rend nécessaire une étude de toxicité au cas par cas et limite énormément les applications dans l'humain.

b) Nanostructures de carbone

Les nanotubes de carbone simple-feuillets (SWCNTs) ou à multiple-feuillets (MWCNTs) sont constitués d'une ou de plusieurs feuilles de graphène roulées en cylindre. Déjà connu pour des applications d'ablation photothermique de cancers grâce à leur forte absorption dans le NIR ou de transports de médicaments grâce à leur grande surface spécifique, les nanotubes de carbone n'ont pas tardé à être étudiés en tant qu'agents de contraste pour l'imagerie PA.

Ainsi, Zerda *et al.* ont montré qu'il était possible d'utiliser des SWCNTs décorés d'un peptide cyclique Arg-Gly-Asp afin de cibler une tumeur glioblastome U87MG *in vivo* et ont obtenu huit fois plus de

photodégradation ou entraîner une phototoxicité si le processus de désexcitation passe par la création d'espèces réactives oxygénées (ROS). Enfin, leur faible solubilité dans l'eau, leur tendance à s'agréger ou à interagir avec des protéines ainsi que leur faible temps de circulation peuvent limiter leurs applications en milieu biologique.

La plupart des défauts des colorants organiques peuvent être partiellement voire entièrement résolus en les formulant comme nanoparticules organiques. Le fait de concentrer de nombreux chromophores au sein d'une même nanoparticule permet d'atteindre des absorbances du même ordre de grandeur que celles des nanoparticules d'or. De plus, le passage en nanoparticules peut entraîner une bonne stabilité colloïdale, même en milieu biologique complexe. Dans tous les cas, cette stabilité, mais aussi la furtivité et le ciblage peuvent être accrus grâce à une réactivité de surface des NPs (en utilisant une couche de silice par exemple) ou en utilisant des polymères amphiphiles stabilisants. Enfin, les nanoparticules protègent généralement les chromophores de leur photodégradation en limitant la génération de ROS.

Quelques colorants organiques sont autorisés pour la médecine chez l'humain par l'agence américaine « food & drug administration » (FDA). En particulier, trois colorants (l'indocyanine green, le bleu Evans et le bleu de méthylène, Figure I-52) ont été amplement utilisés et ont permis de nombreuses preuves de concept de l'imagerie PA.

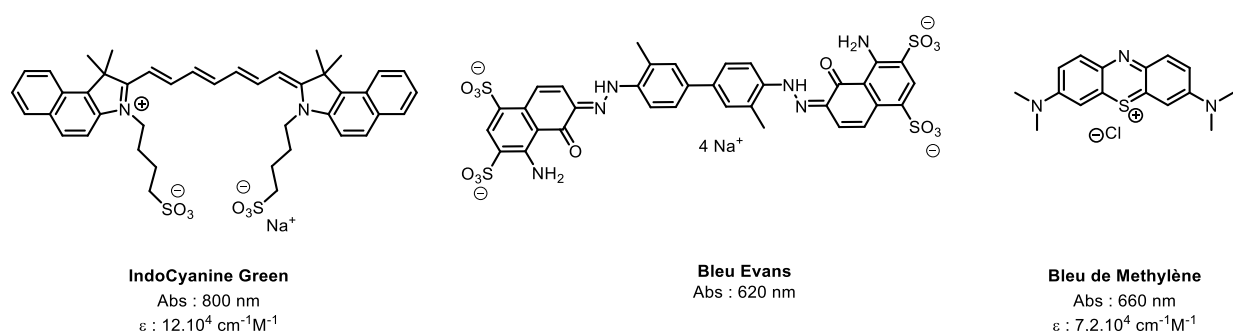


Figure I-52. Structure et propriétés optiques des colorants autorisés par la FDA.

- Indocyanine Green

Autorisée par la FDA depuis 1959, l'ICG est un colorant de choix pour la PA grâce à sa forte absorption ($\epsilon \approx 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) autour de 800 nm. Depuis la première preuve de la correspondance entre le spectre d'absorption et le spectre de génération de signal PA de l'ICG en 2000 (Figure I-45, droite), l'ICG a été utilisée dans de nombreuses études photoacoustiques. Cependant l'ICG possède un temps de demi-vie dans le sang de quelques minutes et est connu pour se lier à de nombreuses protéines du plasma.^[177] Plusieurs approches ont été utilisées pour augmenter le temps de rétention de l'ICG *in vivo* comme des solutions stabilisantes, maintenant commerciales, qui permettent d'utiliser l'ICG comme agent de contraste sanguin. Une autre solution a été employée par Sano *et al.* qui, après une légère modification de la structure, ont greffé de l'ICG sur un polysarcosine^[178] ou sur des anticorps^[179] pour l'imagerie PA de tumeurs. Enfin, comme nous l'avons mentionné ci-dessus, l'ICG peut aussi être greffée à des nanoparticules inorganiques (or, nanotubes de carbones) afin d'améliorer leurs propriétés optiques.

La fluorescence modérée de l'ICG a également permis à Wang *et al.* de l'utiliser pour la localisation bimodale, PA et fluorescence, de ganglions sentinelles.^[180] Les auteurs ont notamment comparé la

résolution latérale des deux techniques d'imagerie en fonction de la profondeur (Figure I-53). Ils ont montré que l'imagerie PA était jusqu'à dix fois plus résolue que l'imagerie de fluorescence à plusieurs millimètres de profondeur. Or puisque la localisation des ganglions sentinelles est généralement effectuée avant de les retirer chirurgicalement, plus l'imagerie sera résolue, plus le travail du chirurgien sera facilité.

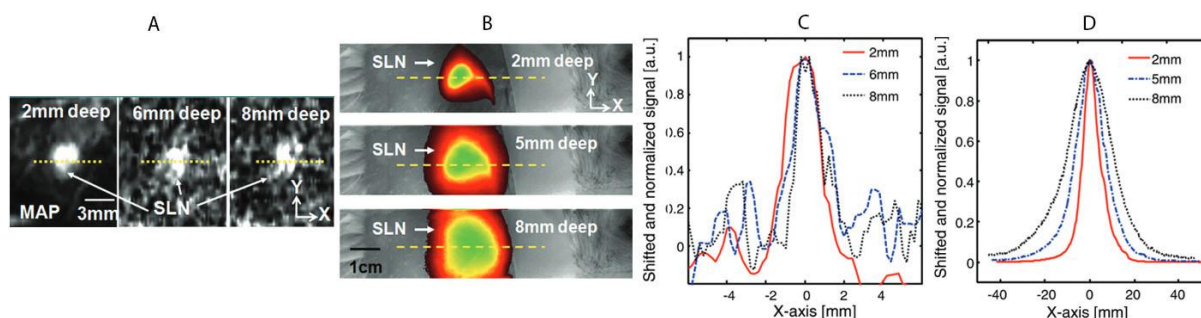


Figure I-53. Imagerie bimodale d'un ganglion sentinelle à l'aide de l'ICG à différentes profondeurs (adapté de [180]).

A : images PA. B : images de fluorescence.

C : profils des images PA. D : profils des images de fluorescence. Les profils ont été tracés le long des pointillés jaunes.

- Bleu Evans

Le bleu Evans (BE) est un autre colorant très connu des biologistes pour vérifier la viabilité cellulaire ou pour sa forte interaction avec les albumines. En photoacoustique, Wang *et al.* ont montré que le complexe BE-albumine formé dans le sérum permet d'accroître sensiblement la sensibilité de l'OR-PAM comparé à l'hémoglobine (Figure I-54, A), et notamment de supprimer le caractère discontinu des images PA.^[181] A cette concentration élevée (6 w%, 100-200 μ L), les molécules libres du BE sont connues pour diffuser hors du système vasculaire. Ce phénomène a pu être suivi par OR-PAM jusqu'à l'obtention d'un plateau au bout de deux heures (Figure I-54, B). L'apparition de taches sombres peut être observée et ces dernières correspondent aux glandes sébacées dans lesquels BE ne diffuse pas.

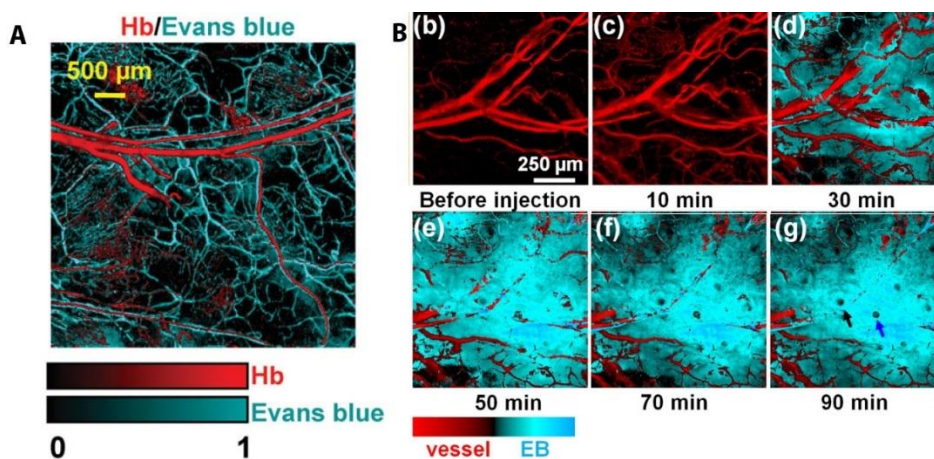


Figure I-54. Imagerie PA de la microvascularisation d'une oreille de souris.

A : Image combinée de la réponse PA de l'hémoglobine (en rouge, excitation 570 nm) et du bleu Evans (bleu, 610 nm) immédiatement après injection (6 w%, 200 μ L).^[147]

B : suivie de la diffusion de BE dans le système extravasculaire après injection (6 w%, 100 μ L). Les flèches montrent les glandes sébacées.^[181]

Cette diffusion extravasculaire de BE a été utilisée afin de mesurer la porosité de la barrière hémato-encéphalique, voire d'évaluer de potentielles fuites créées par des traumatismes crâniens ou de mesurer l'efficacité du transfert d'un médicament au travers de cette barrière.^[182,183]

- Bleu de méthylène

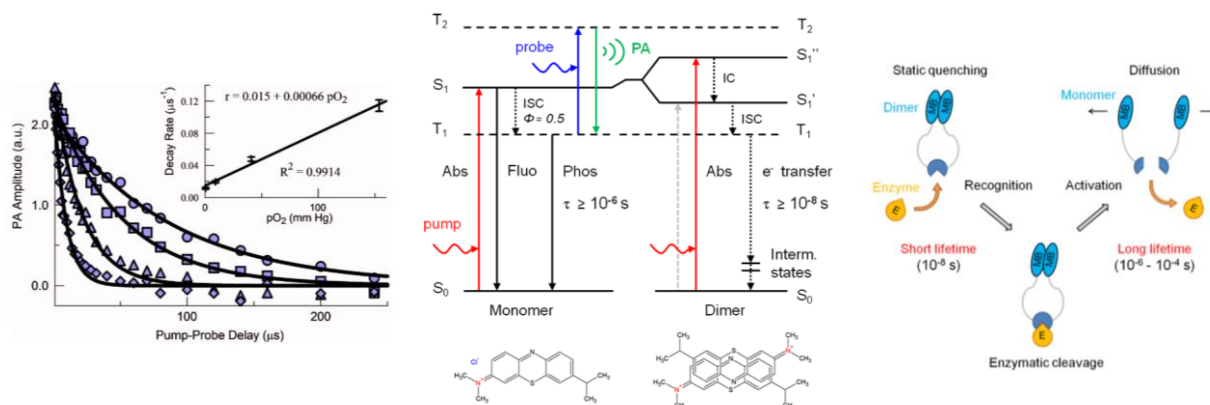


Figure I-55. Imagerie photoacoustique de temps de vie.

Gauche : signal photoacoustique en fonction du délai entre les pulsations pompe et sonde pour différents taux d'oxygène.^[184]

Milieu : présentation de la méthode pompe-sonde sur le monomère et dimère de bleu de méthylène.^[185]

Droite : application de l'imagerie photoacoustique de temps de vie pour suivre le clivage enzymatique d'une sonde.^[185]

Outre les applications déjà mentionnées comme la localisation de ganglions sentinelles, Ashkenazi *et al.* ont utilisé les propriétés de photosensibilisateur du bleu de méthylène pour mesurer la concentration en dioxygène grâce à l'imagerie photoacoustique de temps de vie (Figure I-55, gauche).^[184] En effet, le bleu de méthylène possède une croissance intersystème efficace et le temps de vie de son état triplet dépend de la concentration en dioxygène. Par une méthode pompe-sonde, il est possible d'estimer le temps de vie du colorant en mesurant la force du signal photoacoustique généré par une absorption à l'état excité en fonction de la durée entre l'impulsion pompe (650 nm, pour exciter les molécules) et l'impulsion sonde (800 nm, pour générer l'effet photoacoustique par absorption à l'état excité). A 800 nm, l'absorption à l'état excité est quatre fois plus forte que l'absorption depuis l'état fondamental, le signal acoustique n'est donc généré que s'il reste des molécules à l'état excité. Avec le même système, les auteurs peuvent aussi distinguer un monomère de bleu de méthylène (temps de vie long) d'un dimère (temps de vie court) et potentiellement suivre la dissociation de dimères de bleu de méthylène, par exemple, par l'action d'une enzyme sur la sonde enzymatique (Figure I-55, milieu et droite).^[185]

Ainsi, ces trois chromophores commerciaux bien connus, possèdent une absorption dans le rouge voire dans le proche infrarouge et sont considérés comme inoffensifs. Ces avantages leur ont permis d'être utilisés pour de nombreuses démonstrations du potentiel de la photoacoustique. Cependant, ces chromophores possèdent quelques défauts qui peuvent limiter leurs applications finales : moyennement fonctionnalisables, décalage hypsochrome de l'absorption lors de l'agrégation et surtout photodégradation rapide sous les puissances lasers élevées nécessaires pour la photoacoustique. Même si, comme nous l'avons vu, certains de ces défauts peuvent être contournés, voire donner lieu à de nouvelles applications, il reste crucial de synthétiser de nouveaux agents de contraste plus performants pour l'imagerie photoacoustique. De nombreuses familles de colorants organiques sont déjà connues suite à la recherche de nouveaux colorants et composés luminescents et ont pu être adaptées à la photoacoustique.

- Cyanines

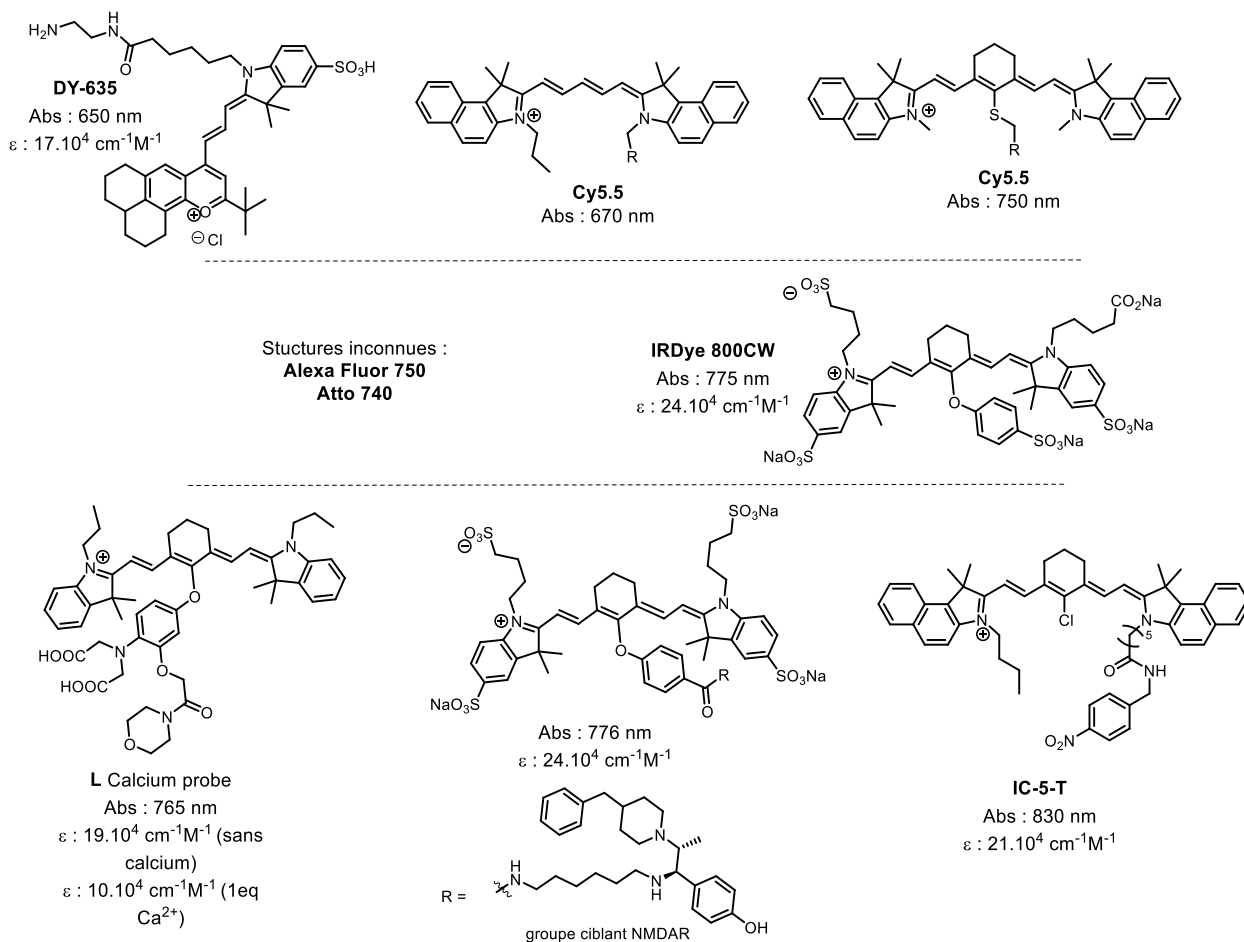


Figure I-56. Structure et propriétés optiques des cyanines utilisées en PA.^[186–191]

Disposant de fortes absorptions dans le proche infrarouge, les cyanines sont des candidats prometteurs pour l'imagerie PA (Figure I-56). De nombreuses cyanines sont déjà commercialisées pour l'imagerie de fluorescence et ont pu être rapidement utilisées pour l'imagerie PA : Alexa Fluor 750, Atto 740, Cy5.5, Cy7, DY-635, IRDye800 CW et bien sûr, l'ICG dont nous avons déjà parlé ci-dessus.^[186–188] Néanmoins, ces cyanines commerciales ont été conçues pour l'imagerie de fluorescence et possèdent généralement des rendements quantiques de fluorescence modérés à forts ce qui peut diminuer la génération de chaleur et donc le signal PA. De plus, leur tendance à s'agréger en milieu physiologique peut limiter le taux de dopage au sein de nanoparticules et donc la réponse PA. Ce dernier point oblige les chercheurs à choisir une méthode de vectorisation adéquate comme par exemple le greffage des cyanines sur des brins d'ADN ou diluées dans une matrice de pluronic F127 stabilisée par une couche de silice.^[192,193]

Certaines cyanines ont aussi été utilisées sous leur forme moléculaire comme sondes appliquées à la détection d'espèces biologiques. Ainsi, Mishra *et al.* ont développé une sonde avec une réponse photoacoustique proportionnelle à la quantité de calcium, **L** (Figure I-57).^[189] Ils ont utilisé une cyanine commerciale, l'IR780, et l'ont couplée avec une partie pouvant chélater préférentiellement l'ion Ca^{2+} . Les auteurs expliquent que cette chélation perturbe la conjugaison entre l'aniline et la cyanine, ce qui diminue presque de moitié l'absorption du composé et donc la réponse photoacoustique. Cependant cette explication ne nous semble pas satisfaisante : l'ajout d'un ether ou d'un thioether sur la position centrale

de la cyanine ne modifie que très peu les propriétés optiques et une action sur cette aniline ne devrait pas avoir autant d'influence.^[194] De plus, la conjugaison entre l'aniline et la cyanine donnée par les auteurs (Figure I-57) entraînerait un oxygène dépassant la règle de l'octet. L'aniline n'est donc pas conjuguée avec la cyanine. Malgré le manque de clarté du mécanisme, l'ajout d'EDTA permet de restaurer l'absorption en libérant le groupe chélatant.

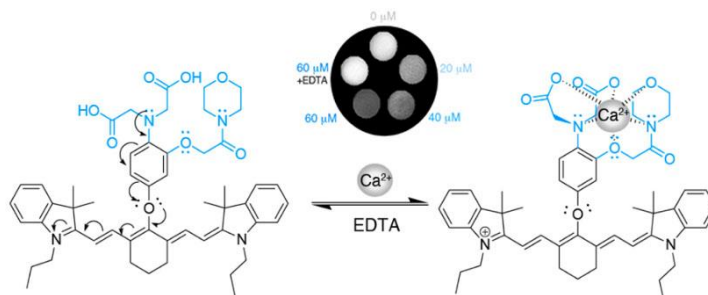


Figure I-57. Sonde PA à calcium (adapté de ^[189]).

Avec un système similaire, les mêmes auteurs ont introduit un groupement ciblant les récepteurs du N-méthyl-D-aspartate (NMDAR) afin de suivre l'addition de glutamate aux récepteurs postsynaptiques (Figure I-56). Leur sonde peut se lier *in cellulo* aux récepteurs postsynaptiques de neurones. Les neurones lavés restent visibles par fluorescence et photoacoustique. L'ajout de glutamate éteint le signal en remplaçant la sonde qui part ensuite lors du lavage.^[190]

Enfin, afin d'améliorer la photostabilité des cyanines, Onoe *et al.* ont développé une cyanine asymétrique **IC-5-T** avec un groupement désactivateur d'état triplet afin de réduire la production de dioxygène singulet (Figure I-56).^[191] Ils ont montré que l'ajout d'une amine nitrobenzylique sur l'un des bras de leur cyanine permet d'augmenter la photostabilité de moitié sans modifier les autres propriétés optiques ni l'affinité du colorant avec l'albumine qui donne la solubilité dans le sang et le ciblage vers des tumeurs.

• Squaraines

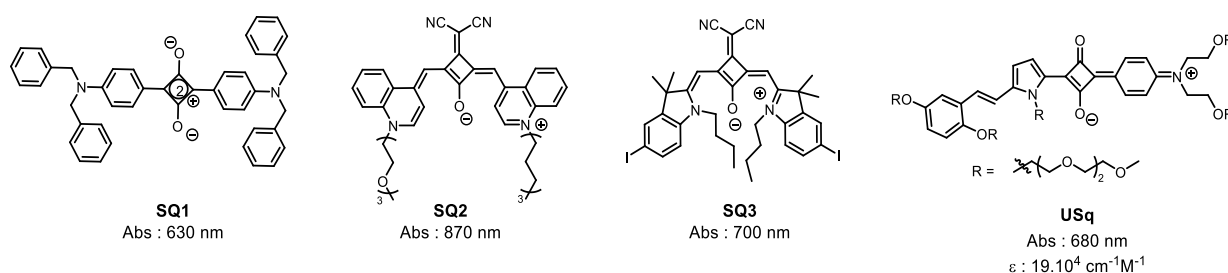


Figure I-58. Structure et propriétés optiques des squaraines utilisées en PA.^[195–198]

Les squaraines sont des colorants connus pour s'agréger facilement. La méthode de solubilisation doit donc être contrôlée avec soin pour éviter une perte des propriétés optiques. Ainsi, An *et al.* ont choisi de vectoriser leur squaraine **SQ1** dans des nano-complexes squaraine-albumine d'environ 100 nm de diamètre (Figure I-59, gauche).^[195] Cependant, cette approche mène à une modification importante de l'absorption qui passe d'une fine bande à 630 nm à deux bandes larges centrées sur 532 nm et 740 nm. Cela démontre la présence d'agrégats H et d'agrégats J à l'intérieur du nano-complexe. Bien que cela

permette de pouvoir générer un signal PA sur une gamme spectrale importante, la présence d'agrégats entraîne souvent une baisse importante de l'absorption par rapport aux molécules libres. Néanmoins, cette absorption large leur permet de réaliser de l'imagerie PA *in vivo* du foie et d'une tumeur de souris et de montrer que le ratio signal sur bruit est grandement amélioré à 740 nm par rapport à 532 nm.

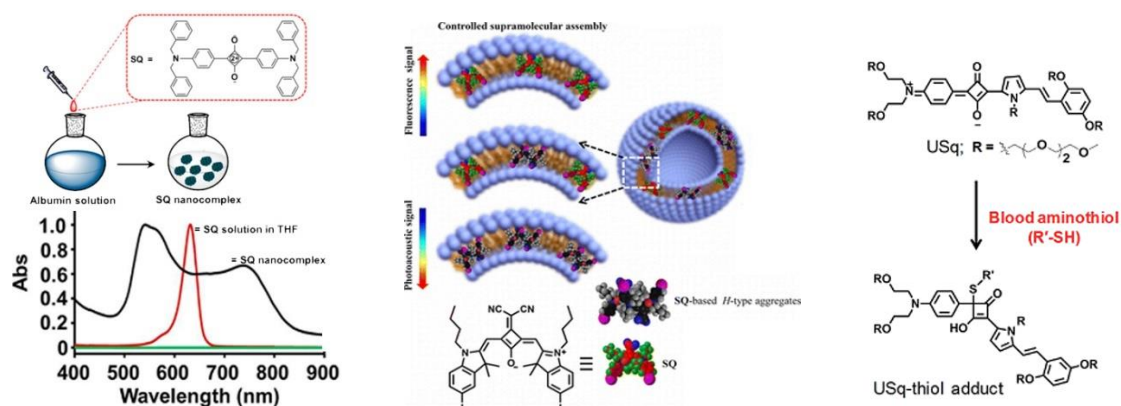


Figure I-59. Formulation de squaraines pour l'imagerie PA.

Gauche : nano-complexes albumine-squaraine **SQ1** et les absorptions du nano-complexe (noir) et de la squaraine en solution dans le THF (rouge). Adapté de [195]

Milieu : schéma de squaraines **SQ3** incorporées dans un liposome et variations des propriétés optiques en fonction du taux de dopage. Adapté de [197]

Droite : sonde moléculaire à thiols basée sur une squaraine.[198]

L'incorporation de squaraines dans des micelles a aussi été utilisée afin de vectoriser le colorant. En utilisant une squaraine fluorescente, **SQ2**, et du pluronic F127, Sreejith *et al.* ont obtenu des micelles pour l'imagerie bimodale fluorescence/PA.[196] Cette approche leur permet de conserver les propriétés optiques de la squaraine : l'absorption reste fine et n'est décalée de manière hypsochrome que de 30 nm au rapport au DMSO, probablement à cause du changement de polarité. De plus, **SQ2** reste fluorescente au sein des micelles alors que la fluorescence était presque totalement éteinte dans un mélange 90:10 eau/DMSO. Similairement, Zhang *et al.* ont incorporé **SQ3** dans la double couche hydrophobe d'un liposome de phospholipides.[197] En faisant varier le ratio massique squaraine/phospholipides, le liposome était fluorescent ou juste absorbant (Figure I-59, milieu). En effet, lorsque le taux de dopage devient trop élevé, les squaraines s'agrègent dans la double couche. Cette agrégation H provoque une extinction de la fluorescence mais aussi une augmentation drastique du signal PA car l'énergie n'est plus « perdue » par fluorescence. Ainsi, en fonction du taux de dopage, les auteurs ont pu utiliser leurs liposomes pour de l'imagerie de fluorescence de cellule et de tumeurs ou pour de l'imagerie PA de tumeurs.

Enfin, les squaraines ont aussi été utilisées avec une approche moléculaire comme sondes pour détecter la présence d'aminothiol (**USq**) (Figure I-59, droite).[198] Dans ce cas, la solubilité aqueuse est apportée par des groupements polyéthylènes glycols PEG) qui permettent à la squaraine de ne pas s'agréger dans des mélanges eau/DMSO avec jusqu'à 96 % d'eau. Dans ce dernier mélange, **USq** présente une forte bande d'absorption, vers 660 nm, ainsi qu'une fluorescence intense à 700 nm (27 % de rendement quantique dans le DMSO). L'addition nucléophile d'un thiol comme le glutathion provoque l'apparition d'une nouvelle bande de fluorescence à 520 nm et la disparition de la fluorescence dans le NIR. De même le signal photoacoustique à 680 nm disparaît lorsque les auteurs ajoutent du glutathion. Ces observations se reproduisent *in vivo* lors de l'imagerie d'une souris à jeun (peu de thiols) et d'une souris ayant mangé (production de thiols).

- Porphyrines et phthalocyanines

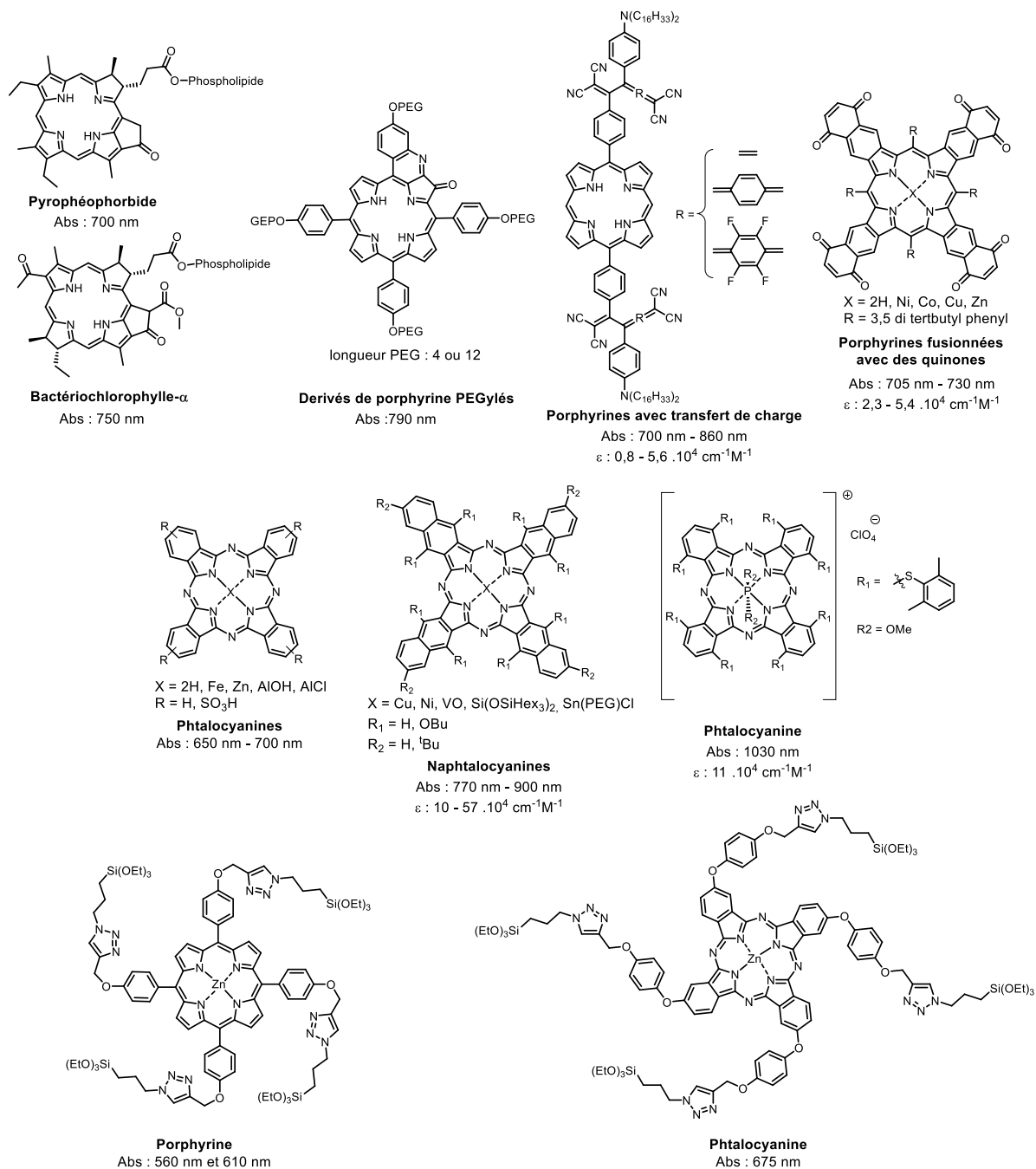


Figure I-60. Structure et propriétés optiques des phthalocyanines et des porphyrines utilisées en PA. [199–213]

Les porphyrines, phthalocyanines et leurs dérivés ont aussi été utilisés pour la photoacoustique (Figure I-60). Ainsi Zheng *et al.* ont utilisé des dérivés naturels de porphyrines tels que la pyropheophorbide ou la bactériochlorophylle- α présentant des bandes Q dans le rouge ou le NIR. Les auteurs les ont encapsulées dans des liposomes ou dans des microbulles pour de l'imagerie multimodale : ultrasons, PA et fluorescence.^[201–203] Paproski *et al.* ont choisi d'encapsuler la pyropheophorbide dans des nanogouttes de perfluorobutane.^[199] Erfanzadeh *et al.* ont utilisé un dérivé de porphyrine non métallée avec des groupement PEG pour la solubilité en milieu aqueux et ont multiplié par quatre le signal PA à 790 nm par rapport au sang.^[200] Li *et al.* ont synthétisés une famille de porphyrines avec un transfert de charge pour l'imagerie PA et la thérapie photothermique.^[204] L'ajout d'un transfert de charge a permis un décalage des

bandes Q vers le rouge. La meilleure porphyrine a été encapsulée dans des liposomes et testé dans des fantômes.

Une des limitations majeures du diagnostic photoacoustique avec des porphyrines et des phtalocyanines est leur tendance à générer des espèces oxygénées réactives, notamment lorsque le cycle est métallé. Cette production de ROS peut avoir un intérêt thérapeutique, mais peut aussi engendrer une mort cellulaire non voulue ou la dégradation du colorant. Afin de limiter la production de ROS mais aussi d'empêcher une désactivation radiative, Banala *et al.* ont synthétisé des porphyrines fusionnées avec des quinones.^[205] Ces porphyrines libres et métallées (Co, Cu, Ni, Zn) présentent une absorption panchromique avec leur bande Q entre 710 et 740 nm et des coefficients d'absorption molaire entre 20 000 et 80 000 cm⁻¹M⁻¹ dans le dichlorométhane. Parmi ces porphyrines, celle complexée avec du Zinc présente les meilleurs résultats de génération de PA. Les auteurs ont donc vérifié sa biocompatibilité, puis ont réalisé l'imagerie *in vivo* d'une souris. N'étant pas soluble dans l'eau, la porphyrine a dû être injectée dans un mélange PBS/PEG₃₀₀ 70:30.

L'utilisation de phtalocyanines (Pcs) se justifie par des bandes Q généralement beaucoup plus intenses que celles des porphyrines et donc une absorption NIR plus élevée. Ainsi Olivo *et al.* ont utilisé des Pcs et des acides tetrasulfoniques Pcs libres ou complexées avec du Zinc ou du chlorure d'aluminium pour de la tomographie PA *in vivo*.^[206,207] Le meilleur résultat a été obtenu pour l'acide tetrasulfonique Al(III)-Pc. Des agrégats d'albumine humaine-Fe(II)-Pc pour l'imagerie PA couplée avec thérapie photothermique ont été développés par Jia *et al.*^[208] La forte accumulation dans les tumeurs de ces complexes en fait de bons agents pour imager puis soigner des tumeurs *in vivo* dans le petit animal.

Des Pcs avec des systèmes π étendus ont aussi été synthétisés. Bézière *et al.* ont utilisé des naphtalocyanines complexés avec du silicium.^[209] La fluorescence et surtout la génération d'oxygène singulet de cette naphtalocyanine a poussé Duffy *et al.* à étendre la série avec du cuivre, nickel et de l'oxyde de vanadium.^[210] Ces naphtalocyanines possèdent des coefficients d'absorption supérieurs à 2.10⁵ cm⁻¹M⁻¹ avec des absorptions entre 775 et 850 nm. La Ni(II)-naphtalocyanine produit plus de signal PA que la naphtalocyanine complexée par du silicium de Bézière *et al.*, ou que des cyanines commerciales comme la Cy7 ou l'IRDye 800CW, tout en absorbant 100 nm plus loin dans le NIR. Enfin, une naphtalocyanine complexée avec de l'étain a été synthétisée par Lovell *et al.*^[211] L'attachement de groupements PEG sur l'étain a permis de multiplier par quatre le temps de circulation dans le sang des Sn(IV)-naphtalocyanines co-solubilisées avec du polysorbate 20.

Lovell *et al.* ont aussi synthétisé une phtalocyanine phosphorée avec une absorption au-delà de 1000 nm.^[212] Un tube contenant 30 mM de cette P-Pc dans du polysorbate 80 pur a pu être détecté au travers de 11,6 cm de poitrine de poulet ou de l'autre côté d'un bras humain ce qui constitue un record de profondeur pour de la tomographie PA.

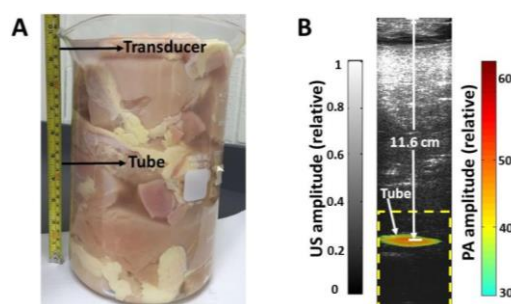


Figure I-61. Détection par tomographie PA d'un tube de P-Pc au travers de 11,6 cm de tissus ex vivo.^[212]
Photo (A) et images ultrasons et PA (B) du tube entouré de tissus.

Afin améliorer la formulation aqueuse de porphyrines et de phtalocyanines de zinc, Mauriello-Jimenez *et al.* ont incorporé des groupements siloxanes sur ces cycles aromatiques.^[213] Une condensation en conditions douces permet d'obtenir des nanoparticules d'environ 100-200 nm de diamètre. L'absorption est légèrement décalée de manière bathochrome, signe d'une agrégation J. Les nanoparticules ont pu être excitées à deux photons pour de l'imagerie par fluorescence et de la thérapie photodynamique et, pour les nanoparticules de phtalocyanine, pour la PA à 700 nm.

- BODIPY et autres complexes de Bore

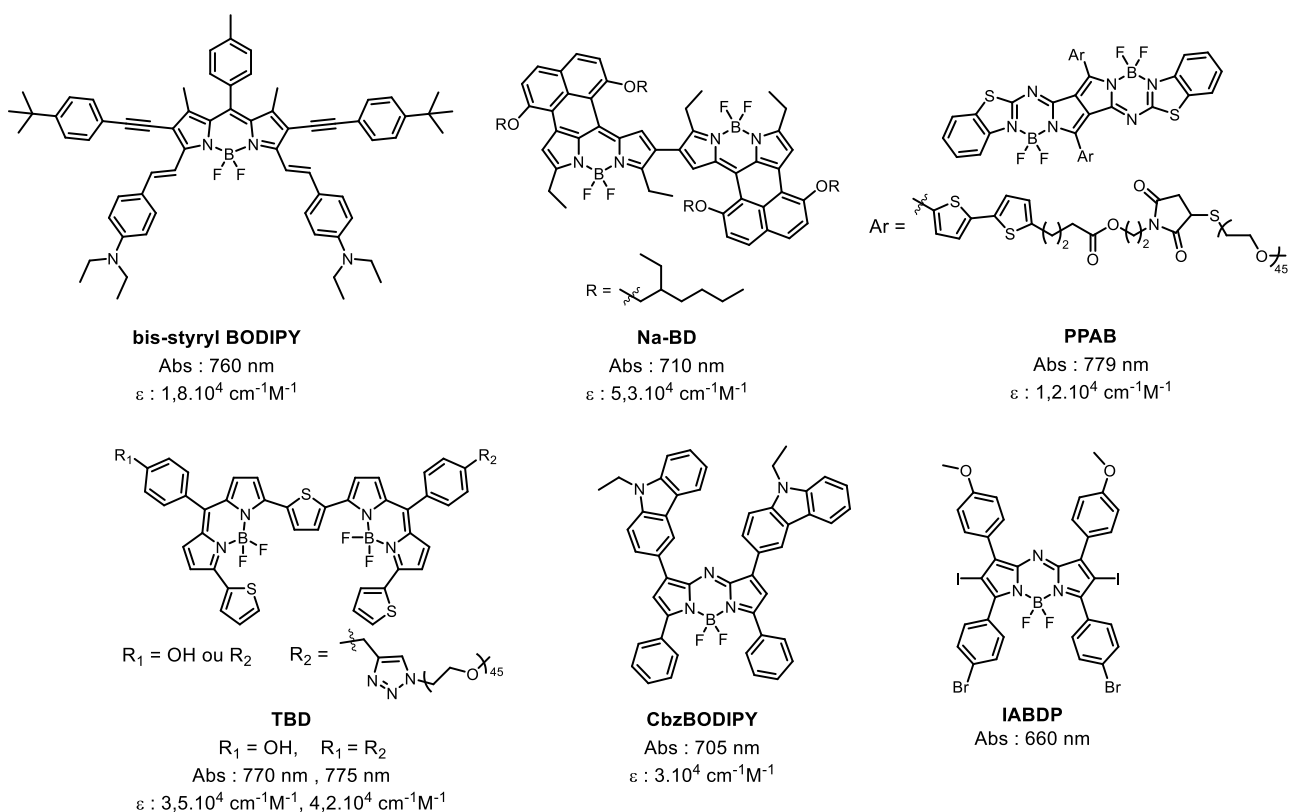


Figure I-62. Structure et propriétés optiques des complexes de bore utilisés en PA.^[214–218]

Similairement aux cyanines, la famille des BODIPY est caractérisée par une absorption fine et intense et a été excessivement étudiée pour l'imagerie de fluorescence. Cette fluorescence peut être désactivée lors de la formulation en nanoparticules. C'est le cas d'un bis-styryl BODIPY, dont les nanoagrégats stabilisés par du DSPE-mPEG₅₀₀₀ sont complètement non fluorescents.^[214] Les auteurs, Hu

et al., ont utilisé ces nanoparticules pour l'imagerie PA couplée à la thérapie photodynamique de tumeurs *in vivo*.

Afin d'obtenir une absorption dans la fenêtre biologique, d'autres BODIPY avec des systèmes π étendus ont été synthétisés. Par exemple, Ni *et al.* ont conçu un dimère de BODIPY-naphtalènes, **Na-BD**, avec une absorption à 700 nm, soit 200 nm plus loin que celle du monomère.^[215] Ce dimère peut être encapsulé dans une matrice d'albumine bovine réticulée par du glutaraldéhyde et génère un signal PA autour de 700 nm. L'utilisation de pyrrolopyrrole permet aussi d'étendre le système π . Ainsi Miki *et al.* ont synthétisé un aza-BODIPY basé sur un pyrrolopyrrole **PPAB** ainsi qu'un dimère de BODIPYs liés par un thiophène **TBD** avec des absorptions autour de 775 nm.^[218] La solubilité aqueuse est obtenue en greffant des PEGs ou de l'acide hyaluronique.

D'autres aza-BODIPY ont aussi été synthétisés par Gawale *et al.* et par Tang *et al.* Les premiers ont étendu le système π avec des carbazoles, **CbzBODIPY**, et ont obtenu des maxima d'absorption vers 700 nm.^[216] Tang *et al.* ont utilisé des nanoparticules cubiques d'un aza-BODIPY halogéné **IABDP** pour de l'imagerie PA couplée à une thérapie thermique et photodynamique.^[217]

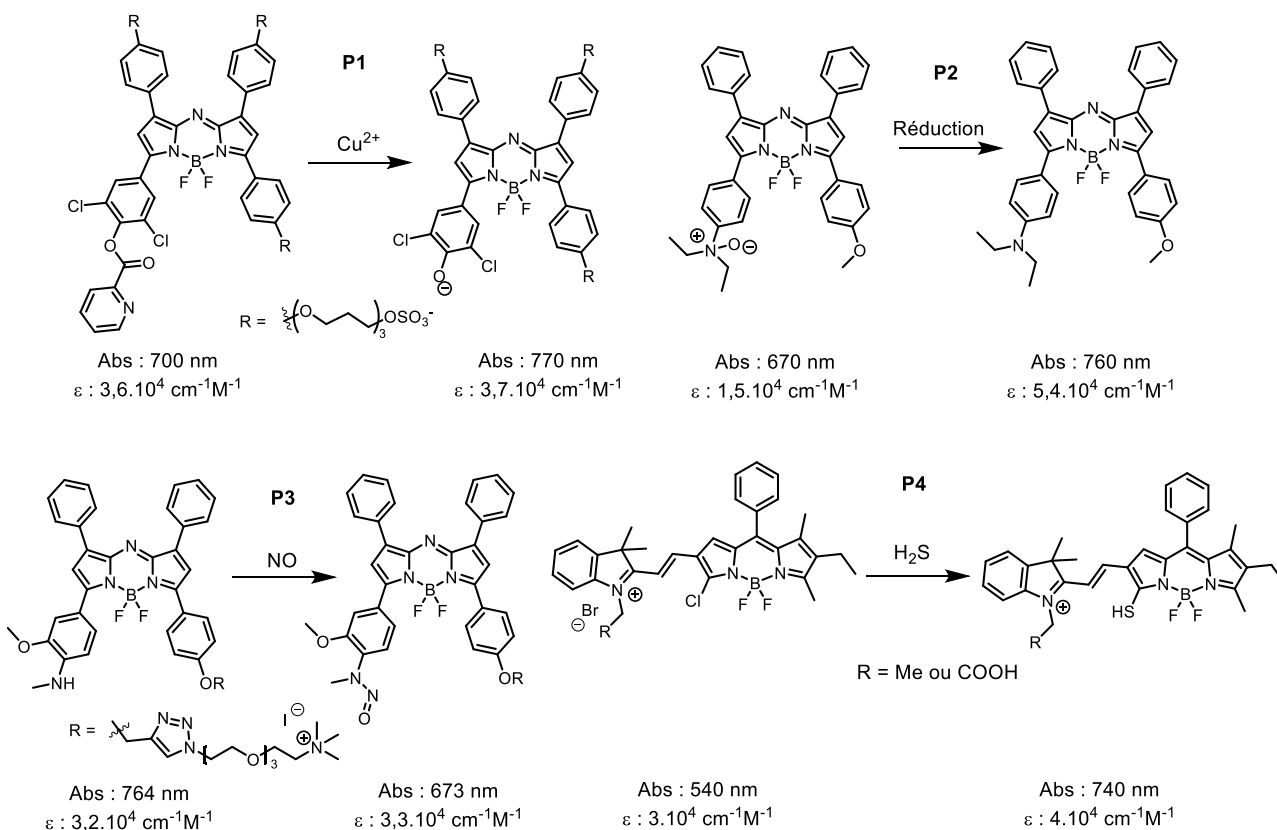


Figure I-63 Sondes PA basées sur des complexes de bore.^[219–222]

Enfin, plusieurs sondes basées sur des BODIPY ont été réalisées (Figure I-63). Ces sondes sont basées sur un changement de longueur d'onde d'absorption lorsque la sonde interagit avec la cible. Cette interaction peut être le clivage d'une partie de la sonde, comme c'est le cas pour la sonde de Chan *et al.* basée sur un ester picolonique **P1** qui peut être hydrolysé en présence de cuivre (II).^[219] L'absorption ainsi que le maximum PA passent alors de 680 nm à 750 nm.

Une autre méthode pour modifier l'absorption du chromophore est la modification d'une de ses fonctions chimiques par un biomarqueur. Ainsi les mêmes auteurs ont aussi créé une sonde réductible en l'absence de dioxygène afin de mesurer l'hypoxie, **P2**.^[220] Cette sonde est basée sur un N-oxyde qui, en l'absence de dioxygène, peut être réduit par le fer du cytochrome P450. Le caractère donneur de l'amine est alors restauré et l'absorption est décalée de manière bathochrome de 90 nm, générant un signal PA à 770 nm. Les mêmes auteurs ont aussi réalisé une série de sondes afin de détecter le monoxyde d'azote, **P3**.^[221] En effet, l'ajout d'une molécule de NO sur l'azote terminal décale l'absorption de la sonde de 60 à 90 nm vers le bleu. Le ratio entre les bandes d'absorption avant et après réaction permet de quantifier la quantité de NO.

Enfin, le biomarqueur peut aussi s'additionner sur le système π . Par exemple NaSH ou H₂S qui effectue la substitution nucléophile aromatique d'un chlore sur le cœur du BODIPY **P4** ce qui entraîne l'apparition d'une bande d'absorption à 780 nm.^[222]

- Polymères π -conjugués

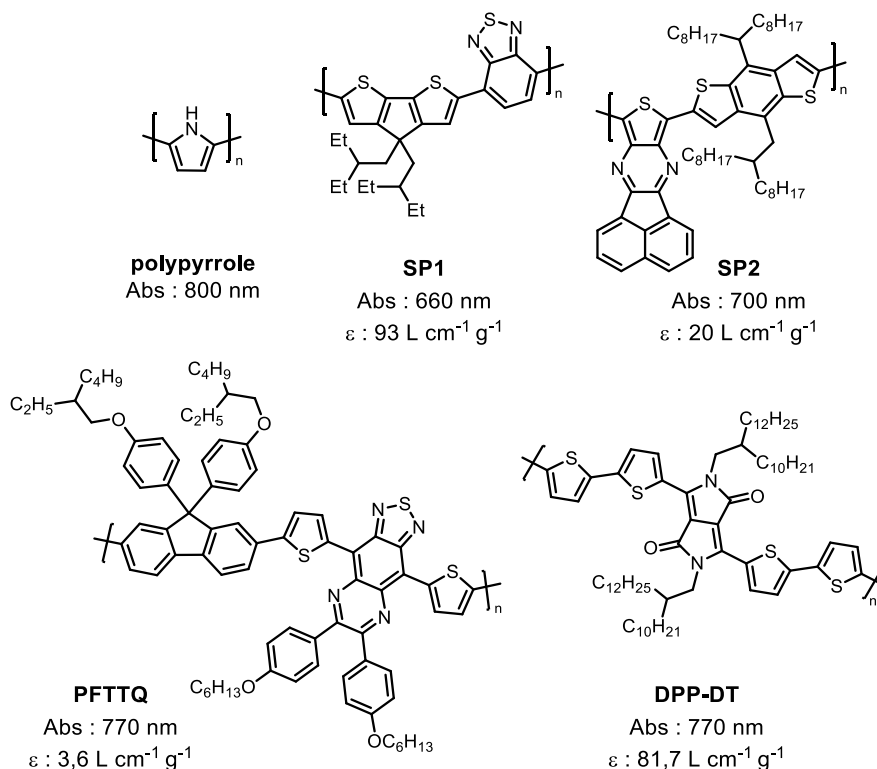


Figure I-64. Structure et propriétés optiques des polymères organiques utilisés en PA.^[223–226]

La polymérisation de monomères conjugués permet une réduction du gap électronique et donc un décalage des propriétés optiques vers le rouge. De plus, dans l'eau, ces polymères ont souvent tendance à s'auto-organiser en nanoparticules afin de minimiser les interactions avec le solvant. La stabilité de ces nanoparticules peut être améliorée en ajoutant un groupement hydrophile sur la chaîne du polymère ou un agent tensioactif dans la solution.

Le premier exemple de polymère pour l'imagerie PA est le **polypyrrole** avec une absorption large autour de 800 nm.^[223] Le pyrrole est polymérisé dans l'eau en présence de poly-vinyl alcool comme

stabilisateur et de FeCl_3 pour initier la réaction et a pu être testé par Zha *et al.* *in vivo* pour augmenter le contraste de l'imagerie PA d'un cerveau de souris.

Pu *et al.* ont utilisé des polymères semiconducteurs déjà connus en photovoltaïque avec de fortes absorptions dans le rouge lointain, **SP1** et **SP2**.^[224] Ils ont montré qu'à masse égale, ces systèmes étaient nettement plus performants que des SWCNTs ou des nanobâtonnets d'or pour l'imagerie PA et ont pu les utiliser pour l'imagerie bimodale PA et fluorescence de ganglions sentinelles. De plus, l'ajout d'une cyanine IR775S sensible aux ROS (notamment ONOO^- et OCl^-) au sein de la nanoparticule de **SP1** a permis la création d'une sonde ratiométrique aux ROS pour l'imagerie PA (Figure I-65, A). Cette sonde a pu être testée *in vitro*, *in cellulo* et *in vivo* avec des accroissements du ratio PA polymère/cyanine respectivement de 25, 7,3 et 2,7 (Figure I-65, B).

Liu *et al.* ont synthétisé un polymère non émissif avec une absorption large entre 700 nm et 850 nm puis l'ont formulé dans des nanoparticules en le co-précipitant avec du DSPE-PEG₂₀₀₀.^[225] Ces nanoparticules sont beaucoup plus résistantes au photoblanchiment que les nanobâtonnets d'or sous excitation à 800 nm et une fluence de 15 mJ/cm². Similairement, Chen *et al.* ont développé des polymères de pyrrolopyrroledicétone **DPP-DT** liés par des thiophènes.^[226] La solubilité dans l'eau est améliorée en coprécipitant du polystyrène PEGylé. Les nanoparticules ont ensuite été utilisées pour de la thérapie photothermique couplée à l'imagerie PA afin de soigner des tumeurs (Figure I-65, C).

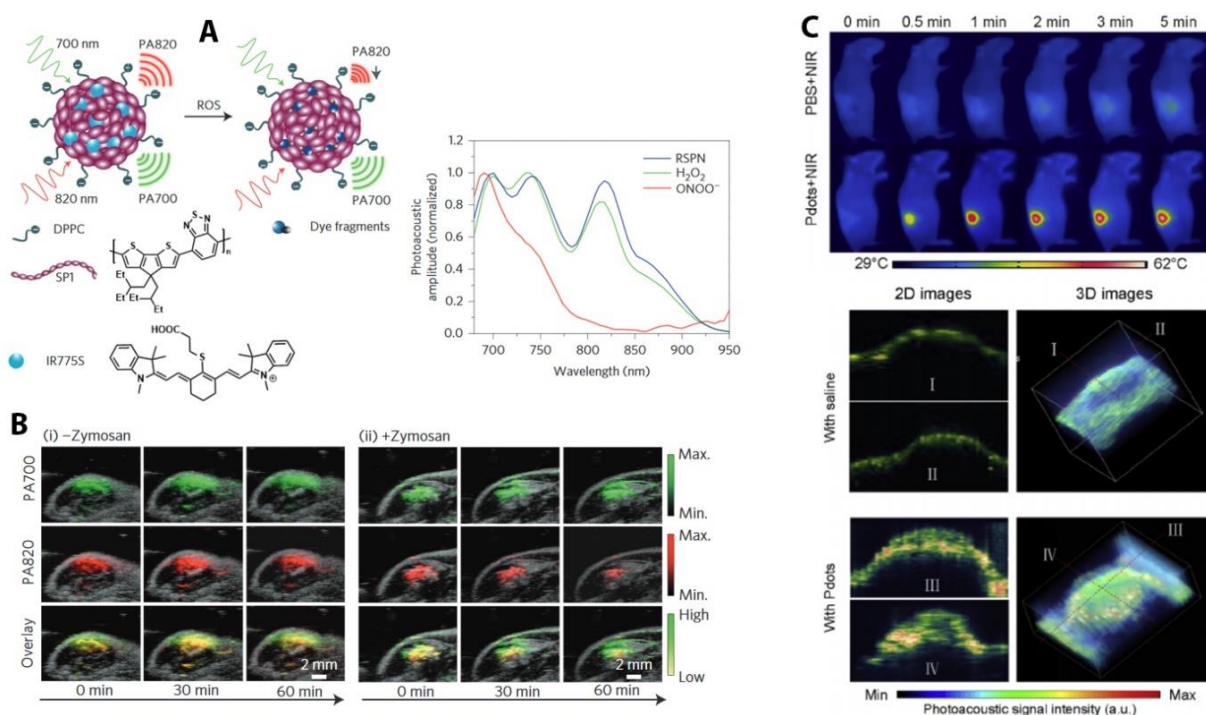


Figure I-65. Imagerie PA avec des polymères semiconducteurs.

A : Sonde ratiométrique aux ROS basée sur un couple absorbant polymère **SP1**/cyanine et les spectres PA de la nanoparticule seule ou en présence de ROS (Adapté de ^[224]).

B : imagerie PA *in vivo* sans (gauche) et avec (droite) traitement au zymosan pour produire des ROS.^[224]

C : Imagerie thermique et photoacoustique d'une tumeur contenant **DPP-DT**.^[226]

- Chromophores à transfert de charge

Les exemples de PA avec des chromophores à transfert de charge sont relativement peu nombreux (Figure I-66). En effet, la force de leur absorption est considérée comme étant relativement faible ($< 10^5 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$). Cependant, cette absorption est du même ordre de grandeur que celle de nombreux exemples détaillés ci-dessus (BODIPY, bandes Q des porphyrines...). De plus, l'assemblage de nombreux chromophores dans une nanoparticule permet l'obtention d'objets avec des absorptions comparables à celles des nanoparticules inorganiques. Par exemple Fan *et al.* ont réalisé des agrégats de perylènediimide **PDI** coprécipité avec du DSPE-mPEG₅₀₀₀ pour l'imagerie photoacoustique.^[227] Bien que le coefficient d'absorption molaire d'un chromophore ne soit que de $2.10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$, celui d'une nanoparticule a été estimé à $2.10^8 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$.

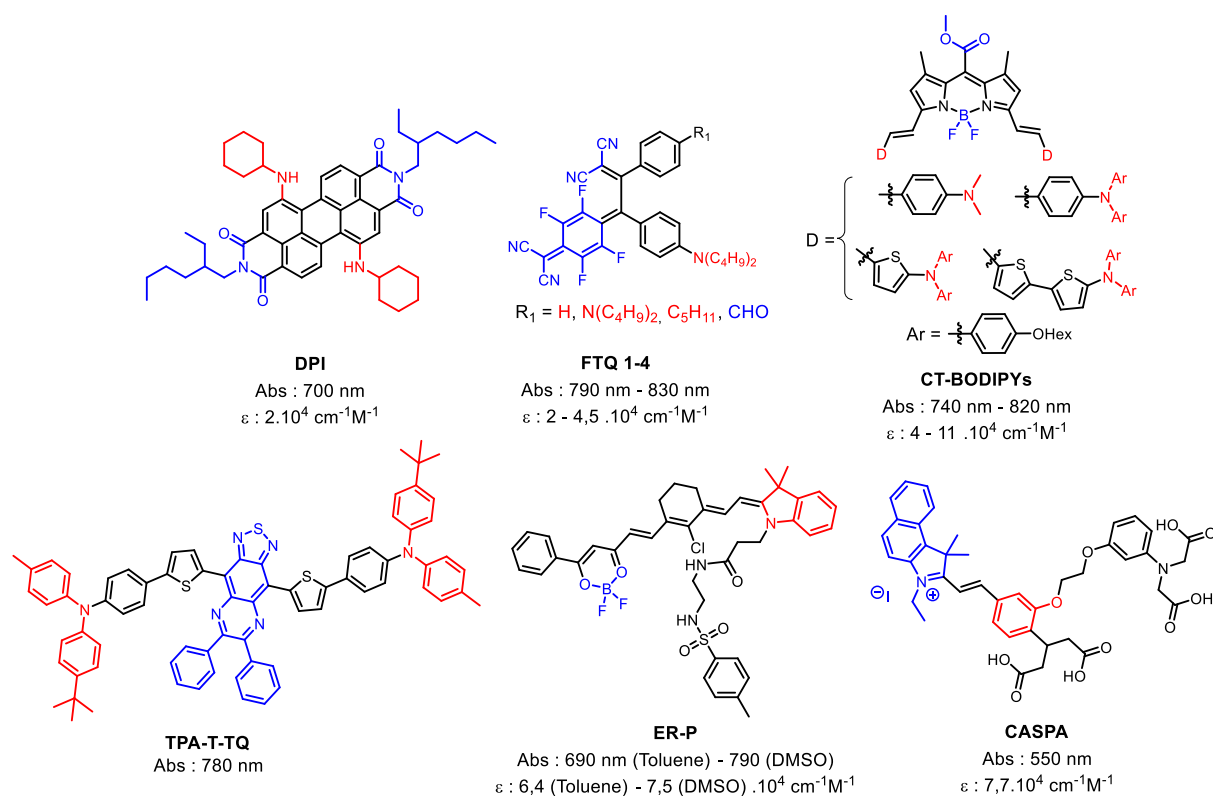


Figure I-66. Structure et propriétés optiques des colorants à transfert de charge utilisés en PA.^[227-232]

Plusieurs autres structures présentant un transfert de charge ont été testées. Xu *et al.* ont synthétisé quatre chromophores, **FTQ1-4**, absorbant autour de 800 nm en faisant réagir de la tétrafluorotétracyanoquinodiméthane sur différents alcynes.^[228] Ni *et al.* décrivent un transfert de charge au travers d'un cœur BODIPY.^[229] A accepteur constant, ils ont étudié l'absorption et la PA de différents donneurs : diméthylamine ou diarylamine au travers d'un pont phényle, thiophène ou bithiophène. Le passage d'un donneur diméthylamine à un donneur diarylamine et d'un pont phényle au pont bithiophène a permis de décaler l'absorption de plus de 60 nm vers le rouge au prix d'une absorption deux fois plus faible. Malgré des coefficients d'absorption plus faibles, les composés avec un pont conjugué thiophène ont montré une réponse nettement meilleure que ceux avec un phényle et que l'ICG. Enfin B. Z. Tang *et al.* ont synthétisé un quadripôle D-A-D avec deux triphénylamine-thiophènes liés à une thiadiazoloquinoxaline, **TPA-T-TQ**.^[230] Les nanoagrégats de ce colorant ont démontré une photostabilité

et une stabilité aux ROS bien meilleures que celle de l'ICG ainsi qu'une plus grande génération de PA et ont pu être utilisés pour de la thérapie photothermique couplée à de l'imagerie PA.

Enfin, quelques sondes ont été conçues autour d'une structure D-A. La première est une sonde ratiométrique **ER-P** dont le ratio de signal PA à 800 nm et 700 nm varie avec la polarité du milieu.^[231] Cette sonde est basée sur un transfert de charge entre un indole et un cétole complexé par BF₂ et possède une variation d'absorption de plus de 100 nm entre le toluène et le DMSO. Grâce à cette sonde, les auteurs ont pu suivre la variation de la polarité dans le foie d'une souris diabétique. La polarité augmente avec l'évolution du diabète puis rediminue après guérison. Mishra *et al.* ont synthétisé une hemicyanine sensible au calcium **CASPA**.^[232] Le doublet non liant de l'atome d'azote donneur participe à la chélation du Ca²⁺ ce qui entraîne un décalage significatif de l'absorption vers le bleu et donc une baisse du signal PA. Cette sonde a permis une imagerie bimodale PA et fluorescence du cerveau de larves de poisson zèbre, sans et avec neurostimulant, augmentant la concentration en Ca²⁺.

d) Relation structure-photoacoustique

Comme nous venons de le voir, de nombreux colorants ont été utilisés avec succès pour générer un signal PA. Dans cet état de l'art de la littérature, comparer les agents de contraste les uns aux autres semble difficile au vu du nombre de paramètres pouvant varier dans les expériences de PA : type et puissance laser (souvent non précisés), type et nombre de détecteurs, formulation (moléculaire, nanoparticules, liposomes, ...), concentration, ...

Nous pouvons donc nous demander quels sont les paramètres à maximiser pour qu'un colorant ait une bonne réponse PA. Deux paramètres viennent à l'esprit : le coefficient d'absorption molaire (proportionnel au nombre de photons qui seront absorbés par le chromophore) et l'efficacité de conversion thermique (pourcentage de photons dont l'énergie sera dissipée par voie thermique). En effet, le signal PA $q(\nu)$ est souvent donné par l'équation (I-17) :^[233]

$$q(\nu) \propto \Gamma \eta_{th} \mu_a F \quad (I-17)$$

Avec :

- Γ : le paramètre de Grüneisen qui rend ici compte de l'expansion thermique des tissus.
- η_{th} : l'efficacité de conversion thermique
- μ_a : le coefficient d'absorption optique, en cm⁻¹
- F : la fluence optique locale, en J.cm⁻²

Ainsi, le signal photoacoustique est supposé augmenter linéairement avec le coefficient d'absorption molaire, la concentration du colorant, l'efficacité thermique du colorant et la puissance du laser. Comme l'efficacité thermique est liée aux désexcitations non radiatives, plus les rendements quantiques de fluorescence et de génération d'oxygène singulet/phosphorescence seront faibles, plus η_{th} devrait être élevé. Cependant plusieurs études comparant le signal PA de différents colorants montrent que le signal obtenu n'est pas proportionnel au produit $\eta_{th} \epsilon$ (à conditions identiques).^[204,228]

Une des explications pour ces divergences a été proposée par Rochford *et al.* : la présence d'effets non-linéaires et notamment d'absorption à l'état excité qui peuvent accroître le signal PA lorsque la fluence du laser est suffisamment importante.^[234] En effet, le groupe de Rochford a étudié l'activité PA de

plusieurs colorants BODIPY et curcumine-BF₂ et a remarqué qu'un des BODIPY, ((MeOPh)₂BODIPY) générait un signal PA beaucoup plus fort que les autres malgré son rendement quantique élevé (et donc une efficacité thermique supposément faible).

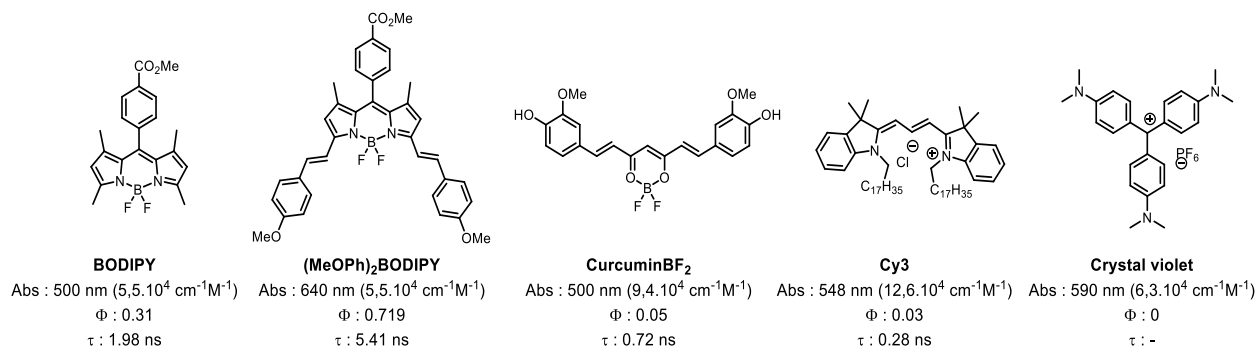


Figure I-67. Structure et propriétés optiques des colorants étudiés par Rochford et al.^[234]

Pour expliquer les signaux PA de cette série, les auteurs ont effectué des mesures de z-scan optique et photoacoustique et ont mesuré les taux de réponse en fonction de la puissance laser. Il s'est avéré que le BODIPY possédait un temps de vie long (5,4 ns) et une absorption à saturation inversée, c'est-à-dire, une absorption à l'état excité supérieure à l'absorption à l'état fondamental. Cette absorption à l'état excité confère à ce chromophore une forte non-linéarité de l'absorption et du signal photoacoustique avec la puissance laser. Ainsi, à basse fluence laser, le signal PA de tous les composés est sensiblement identique alors qu'à forte fluence, les chromophores avec un temps de vie long et une forte absorption à l'état excité produisent beaucoup plus de signal.

A la suite de cette étude, Rochford *et al.* donnent une nouvelle relation entre le signal PA et les différents coefficients d'absorption :

$$q(\nu) \propto \Gamma \eta_{th} \mu_{a,f} F + \Gamma \mu_{a,e1} F^2 + \Gamma \mu_{a,e2} F^3 + \dots \quad (I-18)$$

Avec :

- $\mu_{a,f}$: le coefficient d'absorption optique à l'état fondamental, en cm⁻¹
- $\mu_{a,ei}$: le coefficient d'absorption optique à l'état excité i, en cm⁻¹

Ils ont ensuite étendu l'étude à une large gamme de colorants et ont identifié trois catégories de colorants :^[235,236]

- Les absorbeurs linéaires ($\tau \ll \tau_{laser}$), dont le faible temps de vie de l'état excité ne permet pas d'absorption à l'état excité.
- Les absorbeurs saturables ($\varepsilon_e < \varepsilon_g$, $\tau > \tau_{laser}$), dont l'absorption baisse à haute puissance laser car l'état fondamental est dépeuplé et l'état excité est peu absorbant.
- Les absorbeurs à saturation inverse ($\varepsilon_e > \varepsilon_g$, $\tau > \tau_{laser}$), qui présentent une forte absorption à l'état excité lorsque la puissance laser devient importante.

Ainsi l'ingénierie de colorants absorbant dans le NIR avec un état excité à long temps de vie et à absorption élevée et avec une relaxation non radiative $S_n \rightarrow S_1$ peut être prometteuse pour l'imagerie PA. Notamment pour l'imagerie *in vitro* car les fluences nécessaires pour observer cette augmentation non-linéaire sont pour l'instant nettement supérieures aux taux autorisés pour l'imagerie *in vivo*. Finalement,

malgré les nombreuses études sur des agents de contraste organiques, le lien entre la structure et la génération de signal reste assez opaque.

D. Objectifs de cette thèse

Ce manuscrit est consacré à la synthèse et à l'étude de nouveaux chromophores dipolaires pour les imageries de fluorescence et photoacoustique.

La première partie concerne la conception de fluorophores émissifs à l'état solide dans la première fenêtre biologique. Comme nous l'avons vu dans ce chapitre d'introduction, il existe déjà de nombreux colorants dipolaires émettant à l'état solide. Cependant, leurs propriétés optiques à l'état solide sont difficilement prédictibles à partir de leur structure. En effet, de faibles modifications de structures peuvent entraîner des décalages de plus de 100 nm du maximum d'émission voire une extinction de la fluorescence à l'état solide. Ces variations proviennent d'un contrôle des propriétés optiques par l'arrangement et les interactions intermoléculaires à l'état solide. Afin d'améliorer la prédictibilité de la fluorescence à l'état solide, nous souhaitons concevoir de nouveaux groupements pouvant induire des propriétés de fluorescence solide pour des chromophores à transfert de charge. Ces groupements seront basés sur des fonctions encombrantes, hors du plan du chromophore, afin de limiter les interactions intermoléculaires à l'état solide, voire forcer une agrégation J. Dans un second objectif, nous souhaitons concevoir des chromophores possédant une absorption à deux photons dans la seconde fenêtre biologique et une émission dans la première fenêtre. En effet, la possibilité d'une excitation dans NIR-II est très attractive pour l'imagerie de fluorescence et permettrait d'améliorer la profondeur d'imagerie et de diminuer le bruit de fond.

Ainsi, dans le Chapitre II, nous présenterons trois études sur la conception et la synthèse d'un groupement donneur, accepteur et d'un pont conjugué puis les propriétés de chromophores dipolaires synthétisés à partir de ces nouveaux groupements. Dans un premier temps, nous avons remplacé le donneur triphénylamine par une triphénylphosphine et nous avons étudié l'influence de cette substitution sur les propriétés optiques en solution et à l'état solide. Puis, nous présenterons l'ingénierie de nouveaux groupements électroattracteurs pour l'émission à l'état solide. Ces groupements accepteurs sont basés sur un cycle 2,5-dihydrofuran encombré et permettent l'obtention de plusieurs fluorophores aux poudres fortement émissives dans la fenêtre biologique. Enfin, nous nous sommes intéressés à un pont π conjugué dithiénopyrrole. Ce pont étendu et faiblement aromatique permet un décalage bathochrome de l'absorption et de l'émission par rapport à un pont fluorène par exemple.

Par la suite, dans le Chapitre III, nous présenterons la formulation en nanoagrégats et en nanoparticules pluronic/silice des chromophores les plus remarquables de la partie précédente. Dans ce chapitre, nous parlerons d'abord d'optimisation de la synthèse de nanoagrégats par la méthode de nanopréciipitation. En utilisant les conclusions de cette optimisation, nous présenterons la synthèse de nanoagrégats pour l'imagerie cellulaire avec nos chromophores. Ensuite, nous avons conçu des co-agrégats composés d'un donneur et d'un accepteur d'énergie afin d'utiliser le phénomène de transfert d'énergie de type Förster pour restaurer la fluorescence en agrégats de certains chromophores émettant

autour de 800 nm. Enfin, nous avons étudié l'encapsulation de nos chromophores dans des nanoparticules composés de micelles de pluronic stabilisées par une couche de silice.

La seconde partie de cette thèse est consacrée à l'imagerie photoacoustique. L'objectif de cette thèse sera l'obtention des premières images photoacoustiques de notre groupe. Pour cela, nous devrons décaler l'absorption des chromophores jusque 660 nm et 808 nm, longueurs d'onde des diodes lasers du microscope photoacoustique que nous avons à disposition.

Ainsi, dans le Chapitre IV, nous présenterons tout d'abord la synthèse et l'étude de deux séries de chromophores basées sur un pont π conjugué composé d'un ou de deux thiophènes. Nous présenterons aussi des chromophores préalablement synthétisés par notre groupe qui possèdent des absorptions dans la gamme recherchée. Puis, nous montrerons les études photoacoustiques sur ces chromophores, d'abord en solution dans le chloroforme afin d'identifier la gamme de concentration visible par photoacoustique, ensuite en nanoagrégats dans des circuits de microfluidique et enfin *in vivo* pour l'imagerie de la vascularisation d'oreille de souris.

Chapitre II. Synthèse de nouveaux fluorophores émissifs à l'état solide dans la fenêtre biologique

Comme nous l'avons vu dans le chapitre d'introduction, les interactions entre chromophores en phase condensée sont multiples. Elles proviennent d'interactions coulombiennes, des forces de van der Waals, des interactions d'attraction et de répulsion des orbitales ou encore de différentes interactions spécifiques. La somme de ces interactions crée un arrangement particulier des chromophores les uns par rapport aux autres à l'état solide. Au sein de cet arrangement, la proximité entre chromophores et leur disposition va influencer leurs propriétés optiques de manière positive ou négative.

Dans cette partie, nous présenterons trois études dans lesquelles nous avons modifié une partie du chromophore D- π -A afin d'exalter la fluorescence à l'état solide. Dans la première étude, nous nous sommes focalisés sur le groupement électrodonneur et nous avons étudié le remplacement de l'atome d'azote par un atome de phosphore. Dans un second temps, nous avons conçu une alternative encombrée du groupement accepteur **TCF**. Enfin, nous nous sommes intéressés à un pont π conjugué dithiénylpyrrole encombré.

A. Un groupement triphénylphosphine comme donneur

1. L'utilisation de phosphore dans la littérature

L'incorporation d'hétéroatomes dans une structure π conjuguée peut permettre l'exaltation des propriétés électroniques. Ainsi, de nombreuses études rapportent l'incorporation d'atomes d'azote, d'oxygène, de soufre, de silicium, de bore...

Bien que juste en dessous dans la classification périodique, le phosphore a été beaucoup moins étudié que l'azote. La versatilité du phosphore en fait néanmoins un atome intéressant pour la conception de fluorophores. Déjà, sa géométrie pyramidale unique permet notamment des interactions $\sigma^*-\pi^*$ lorsqu'il est incorporé dans des cycles conjugués, ce qui permet un abaissement de la LUMO.^[237] De plus, son doublet non-liant peut être fonctionnalisé par oxydation par un élément de la colonne 16 ou par la complexation avec un métal (Au, Pd, ...) donnant lieu à un contrôle extrêmement fin des propriétés électroniques des dérivés organophosphorés.^[238]

La grande majorité des molécules conjuguées contenant des atomes de phosphore concernent soit la famille des phospholes (généralement oxydés) ou celle des oxydes de phosphine, notamment pour

la conception d'OLEDs bleues ou blanches. La Figure II-1 présente quelques exemples d'oxydes de phosphine ou de phospholes émettant en couches minces ou dans des cristaux.

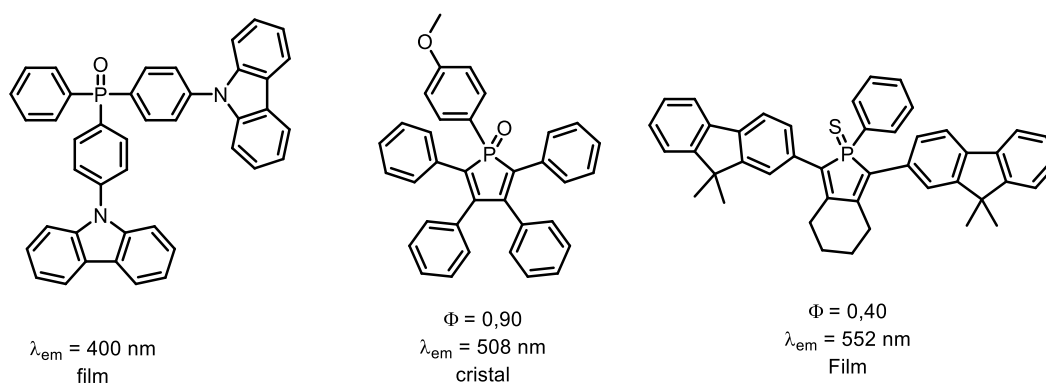


Figure II-1. Exemples d'oxydes de phosphine et phospholes émettant à l'état solide pour les OLEDs.^[239–241]

Ainsi, de nombreux oxydes de phosphine conjugués à des groupements aromatiques tels que des carbazoles ou des fluorènes ont été synthétisés, afin de servir d'émetteurs pour des OLEDs phosphorescentes bleues ou d'hôtes pour des OLEDs vertes ou rouges.^[239] Ils ont permis de réaliser des OLEDs avec des efficacités quantiques externes proches de la valeur maximale théorique. Cependant, il a été montré que la liaison C-P était chimiquement moins stable que la liaison C-N notamment à l'état excité ou pour des espèces chargées. Cela peut limiter la durée de vie des OLEDs et donc diminuer leur champ d'applications.^[242] Similairement, les propriétés d'émission à l'état solide des phospholes ont aussi été étudiées en vue d'une utilisation comme émetteurs pour des OLEDs.^[240,241] Il a aussi été montré que certains phospholes et oxydes de phosphole présentaient des propriétés d'AIE.^[243] Par exemple, le caractère AIE a par exemple permis à Tanaka *et al.* d'utiliser un conjugué sucre-oxyde de phosphole comme sonde « turn-on » à lectine.^[244]

Concernant l'imagerie, la réactivité de P(III) par rapport à H_2O_2 , aux hyperperoxydes, NO, HNO et autres biomarqueurs a permis la réalisation de nombreuses sondes « off-on ». En effet, la version « off » de ces sondes contient un groupement phosphine, qui coupe la conjugaison ou qui éteint la fluorescence par transfert d'électron photoinduit. L'oxydation de la phosphine en oxyde de phosphine ou une réaction clivant le groupement phosphine permet de retrouver la fluorescence.^[245–247] Dernièrement, quelques exemples de phospholes pour l'imagerie de gouttelettes lipidiques ou pour la microscopie STED ont été publiés.^[248,249]

Dans tous les exemples ci-dessus, dans le fluorophore, le phosphore est à l'état d'oxydation (V). Par la suite, nous allons nous intéresser à la famille des phosphines, avec un atome de phosphore sous sa forme P(III), plus rarement étudiée. Le faible nombre d'études concernant les propriétés optiques de phosphines peut s'expliquer par le fait qu'elles sont généralement considérées comme peu stables à l'air ou en solution, ce qui limite les rendements synthétiques, les études spectroscopiques et les applications finales. Néanmoins, il est possible de protéger l'atome de phosphore vis-à-vis de l'oxydation en impliquant son doublet non liant dans une conjugaison. Ainsi, la triphénylphosphine, le BINAP et de nombreuses autres phosphines conjuguées sont connues pour être stables à l'air. Cette stratégie a notamment été employée par Higham *et al.* pour synthétiser des phosphines fluorescentes primaires **Me₂BodPH₂** et tertiaires stables à l'air en les liant à un dérivé de BODIPY (Figure II-2). Ils ont ensuite pu utiliser le caractère complexant de ces phosphines pour la détection de métaux par fluorescence.^[250,251]

La seconde limitation à l'utilisation de phosphine vient du transfert d'électron photoinduit qui a tendance à éteindre un fluorophore proche, comme nous l'avons vu ci-dessus avec les sondes « turn-on » à peroxyde d'hydrogène par exemple. Quelques phosphines polyaromatiques fluorescentes en solution, des **phosphaperylenes** et **HBCP**, ont toutefois pu être synthétisées (Figure II-2).^[252,253] Cependant, le rendement quantique de ces fluorophores n'est pas donné, probablement signe d'une faible fluorescence.

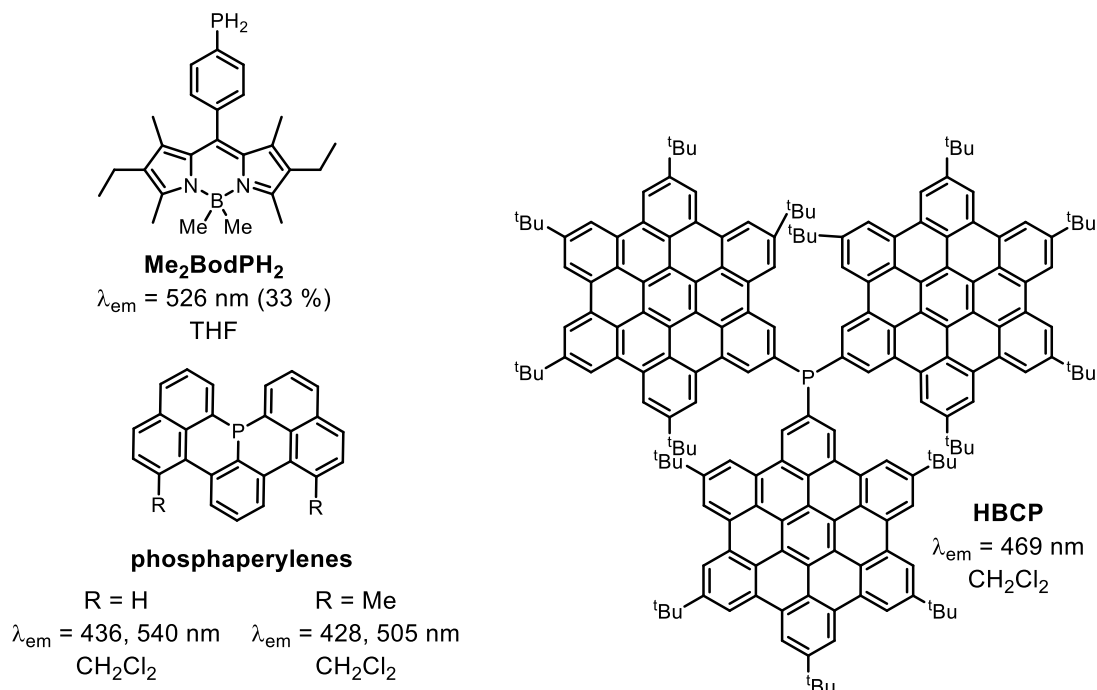


Figure II-2 Phosphines polyaromatiques fluorescentes. ^[250,252,253]

Outre son incorporation dans des fluorophores ou des systèmes polyaromatiques, il est aussi possible d'utiliser le phosphore comme donneur d'électron dans un transfert de charge. Les premiers exemples de cette stratégie ont été synthétisés par Madrigal et Spangler, dès les années 1999. En s'inspirant des études comparant les propriétés d'optiques non-linéaires des composés oxygénés et soufrés, Madrigal et Spangler ont voulu étudier l'impact du remplacement d'atomes d'azote par des atomes de phosphores sur les propriétés optiques, notamment non-linéaires. Leurs études ont surtout porté sur la conception de quadripôles D-D, d'octupôles ainsi que d'un dipôle et ont comparé ces chromophores avec les parents aminés (Figure II-3).^[254-256]

Les auteurs ont observé un décalage hypsochrome important de l'absorption en substituant l'atome d'azote par un atome de phosphore (Figure II-3). Ce décalage atteint 7100 cm⁻¹ dans le cas des quadripôles reliés par un phényle. En effet, malgré la plus forte polarisabilité du phosphore par rapport à l'azote, la capacité du phosphore à donner son doublet non liant est plus faible, à cause de sa géométrie pyramidale. Malheureusement, Madrigal *et al.* n'ont pas étudié la fluorescence des composés.

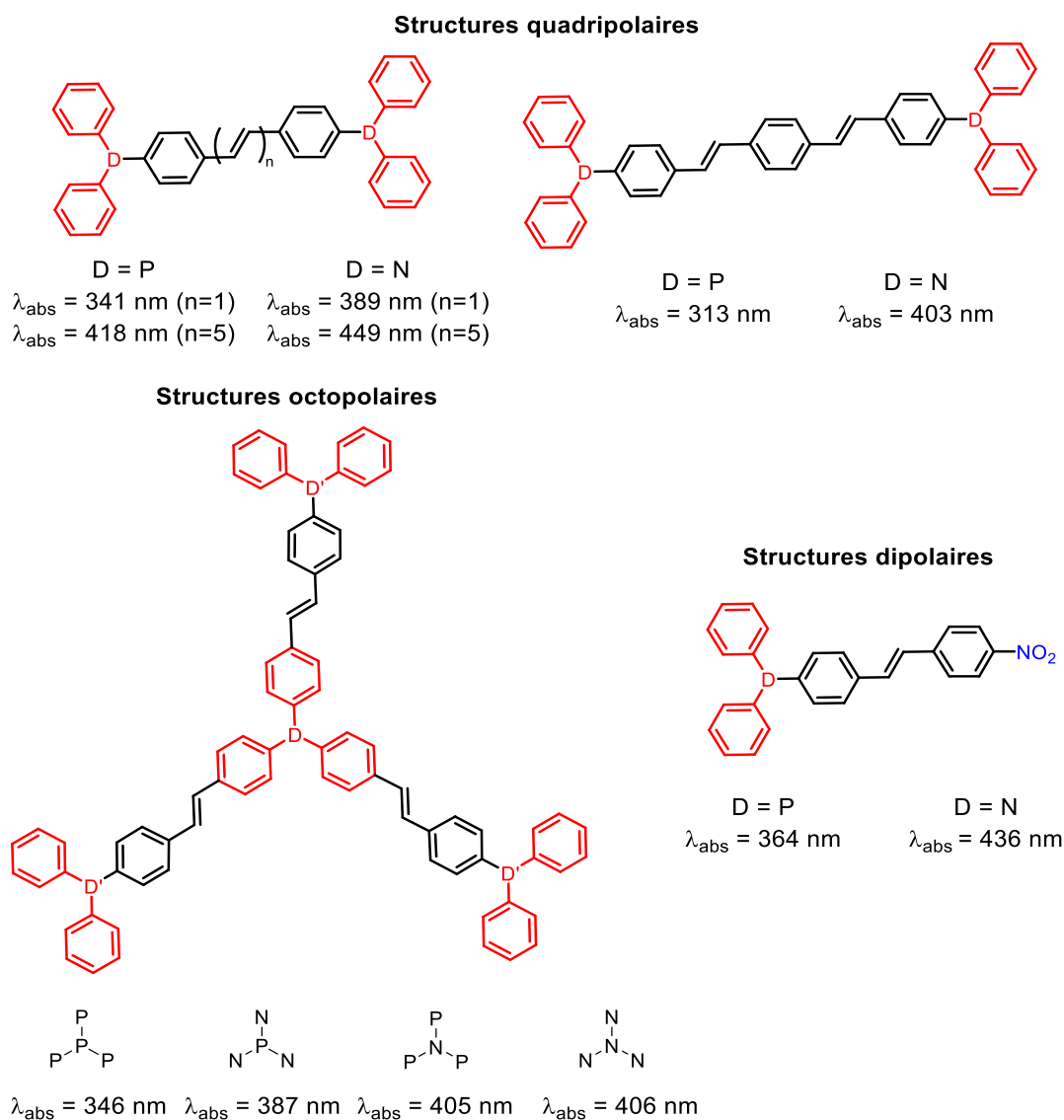


Figure II-3. Structures quadripolaires synthétisées par Madrigal et Spangler.^[254–256]

D'autres groupes ont aussi étudié le transfert de charge entre un donneur phosphoré et un bore (Figure II-4). Ainsi Yuan *et al.* ont étudié un chromophore à transfert de charge entre la diphénylphosphine et un diméthylborane pour la génération de seconde harmonique.^[257] Ce chromophore dipolaire possède une absorption à 340 nm mais les auteurs ne précisent pas le solvant. Agou *et al.* ont montré qu'il était possible d'améliorer les rendements quantiques de fluorescence de phosphines en augmentant la planéité du phosphore.^[258] En effet, les auteurs ont comparé la fluorescence de deux cycles dibenzophosphaborines avec deux substituants sur le phosphore : un phényle **PB-Ph** et un mésityle **PB-Mes** (Figure II-4). Le passage du phényle à un mésityle décale l'absorption de 25 nm vers le rouge et augmente grandement la fluorescence grâce à la diminution du caractère pyramidal du phosphore par la gêne stérique apportée par le groupement mésityle. **PB-Ph** possède deux bandes d'émission qui dépendent de sa concentration. Les auteurs attribuent cela à la fluorescence du monomère (410 nm) et d'un excimère (560 nm). Dans **PB-Mes**, le groupement mésityle empêche la formation d'un excimère. Ce chromophore possède d'ailleurs un grand déplacement de Stokes de $5\,800 \text{ cm}^{-1}$, signe d'une grande variation de géométrie entre les états excité et fondamental. Enfin, il est intéressant de noter que les deux chromophores azotés correspondants

ne présentent aucune différence d'absorption entre eux du fait de la faible influence du substituant sur la planéité de l'azote.

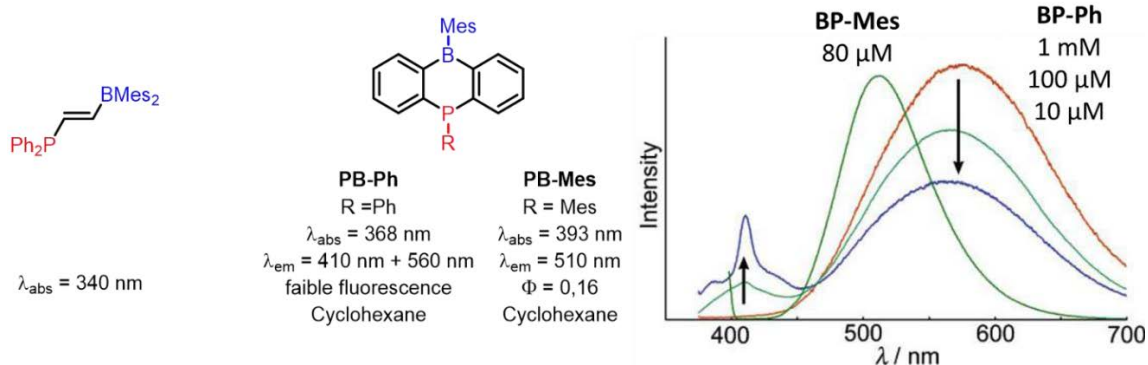


Figure II-4. Chromophores présentant un transfert de charge entre un phosphore et un bore ainsi que les spectres de fluorescence de BP-Ph et BP-Mes dans le cyclohexane à différentes concentrations.^[257,258]

Dernièrement, le groupe de Baumgartner a étudié un analogue phosphoré du bithiophèneimide comme électroaccepteur (Figure II-5).^[259] Cette dicétoimide a été couplé à différents aromatiques par réaction de Huisgen. Les dicétoimides obtenues sont faiblement fluorescentes en solution dans le dichlorométhane (DCM) et à l'état solide. Les rendements quantiques à l'état solide n'ont cependant pas été mesurés. La structure de diffraction aux rayons X (Figure II-5) montre la position hors du plan du cycle de l'atome de phosphore, ce qui diffère des dithiénylphospholes.

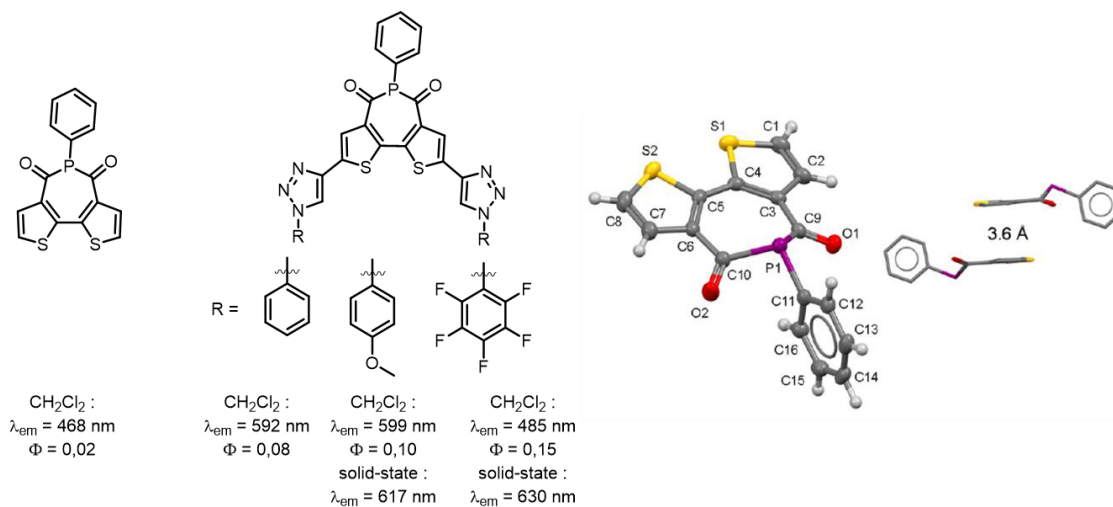


Figure II-5. Structures et propriétés optiques des analogues phosphorés du bithiophèneimide.^[259]

En résumé, malgré le champ de recherche dynamique des phosphines pour la complexation de métaux,^[260] les propriétés électroniques des phosphines ont été très peu étudiées par rapport aux oxydes de phosphine et aux phospholes. De plus, parmi les quelques exemples de phosphines fluorescentes, peu sont des chromophores à transfert de charge, et encore moins utilisent le phosphore comme donneur. Les rares exemples ont montré que :

- Les phosphines ont généralement une absorption fortement décalée de manière hypsochrome par rapport à leurs homologues azotés.
- Elles peuvent avoir un fort déplacement de Stokes lorsqu'elles sont fluorescentes.
- Sans contrainte, le phosphore reste dans une géométrie pyramidale.

Aucune fluorescence à l'état solide de chromophore à transfert de charge utilisant une phosphine comme donneur n'a été reportée. On peut se demander si la géométrie pyramidale particulière du phosphore ne peut pas permettre d'accroître la distance intermoléculaire en augmentant l'encombrement du chromophore, comme cela a été montré sur des phospholes, des oxydes de phosphines ou même sur la triphénylphosphine ?^[261] De plus, est-il possible d'avoir un transfert de charge efficace d'une phosphine vers un accepteur à l'état solide ? Afin d'élucider ces questions, nous nous proposons de synthétiser une famille de chromophores à transfert de charge basés sur des phosphines comme donneurs et de comparer leurs propriétés optiques en solution et à l'état solide aux homologues azotés.

Pour cette étude, nous avons décidé de synthétiser des chromophores dérivés de la triphénylphosphine et de la triphénylamine. Les groupements phényles permettent à la fois de stabiliser la phosphine vis-à-vis de l'oxydation, ainsi que d'augmenter la distance inter-chromophores à l'état solide. Concernant les accepteurs, nous en avons choisi quatre :

- Le 2-dicyanométhylène-3-cyano-4,5,5-triméthyl-2,5-dihydrofurane, **A1** (couramment appelé **TCF**).
- Le 4,5,5'-triméthyl-3-(phénylsulfonyl)furan-2(5H)-one, **A2**.
- Le 4,5,5'-triméthyl-2-oxo-2,5-dihydrofuran-3-carbonitrile, **A3 (MCF)**.
- Le 2-(3,5,5-triméthylcyclohex-2-en-1-ylidène)malononitrile, **A4** (dicyanoisophorone).

Ces accepteurs sont bien connus de notre groupe et ont permis la réalisation de nombreux chromophores pour l'état solide. Ainsi les huit cibles de cette étude sont données dans la Figure II-6.

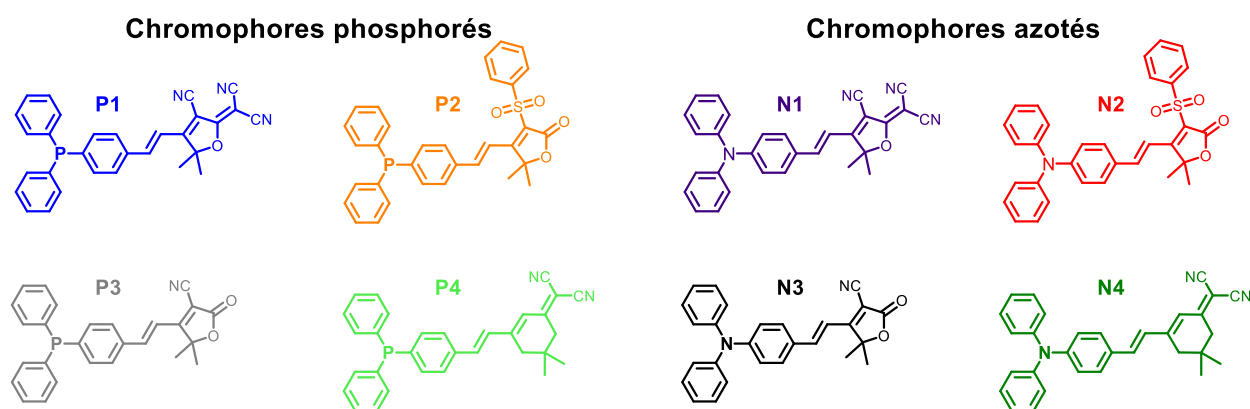


Figure II-6. Chromophores cibles à donneurs phosphorés et azotés.

Parmi ces cibles, les chromophores azotés ont déjà été étudiés par mes prédécesseurs et nous serviront comme références afin de comparer l'influence de la substitution de l'azote par un phosphore sur les propriétés optiques.^[102,103]

2. Synthèse des chromophores

a) Synthèse des donneurs

Les chromophores ont été synthétisés par une condensation de Knoevenagel entre un aldéhyde riche en électrons et un groupement électroaccepteur (Schéma II-1). Pour cela, la première étape est d'obtenir les aldéhydes de la triphénylphosphine et de la triphénylamine.

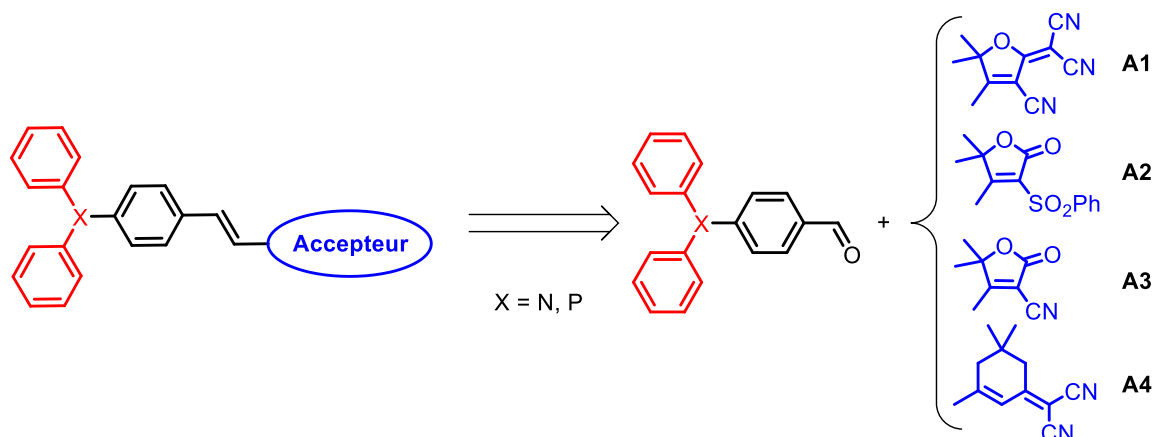


Schéma II-1. Synthèse générale des chromophores azotés et phosphorés.

L'aldéhyde de la triphénylamine, **Ph3N**, avait déjà été synthétisé par réaction de Vilsmeier-Haack sur la triphénylamine selon le Schéma II-2.

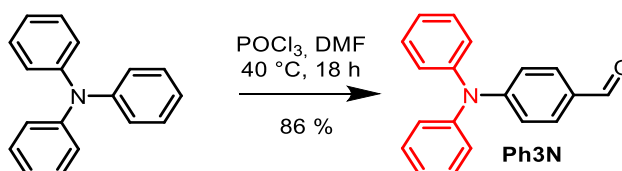


Schéma II-2. Synthèse du 4-(diphénylamino)benzaldéhyde précédemment effectuée au laboratoire.

Concernant la triphénylphosphine, nous avons d'abord tenté un échange Pd-aryl/P-aryl selon le Schéma II-3. Cette réaction est à l'origine une des réactions secondaires observée dans les couplages catalysés au palladium. Cette substitution d'un ou de plusieurs phényles de la triphénylphosphine a permis la synthèse d'un grand nombre de triphénylphosphines fonctionnalisées, notamment de notre cible, la diphénylphosphinebenzaldéhyde.^[262] Nous avons d'abord tenté d'effectuer la réaction sans solvant. Le chauffage à 120 °C permet la fusion de la triphénylphosphine ($T_{\text{fus}} = 80\text{ °C}$) et son utilisation comme solvant, réactif et ligand du palladium. Cependant, cette méthode ne nous a pas permis d'obtenir le produit, même après trois jours de chauffage. L'utilisation du *N,N*-diméthylformamide (DMF) en tant que solvant ainsi que l'ajout d'iodure de sodium nous a permis d'obtenir **Ph3P** avec un rendement de 25 % (Schéma II-3).^[262]

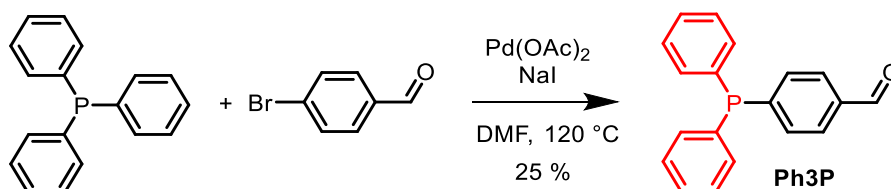


Schéma II-3. Première voie de synthèse du 4-(diphénylphosphino)benzaldéhyde.

A cause de ce rendement modeste couplé au temps de réaction de six jours, excessivement long, nous avons décidé de revenir à la méthode de synthèse classique de **Ph3P** en trois étapes.^[263] L'étape clé de cette seconde voie de synthèse est un échange halogène-lithium sur le 4-bromobenzaldéhyde suivie d'une substitution nucléophile sur la chlorodiphénylphosphine. Le désavantage principal de cette voie de synthèse est la nécessité d'une protection/déprotection du groupement aldéhyde, réactif vis-à-vis du *n*butyllithium (Schéma II-4).

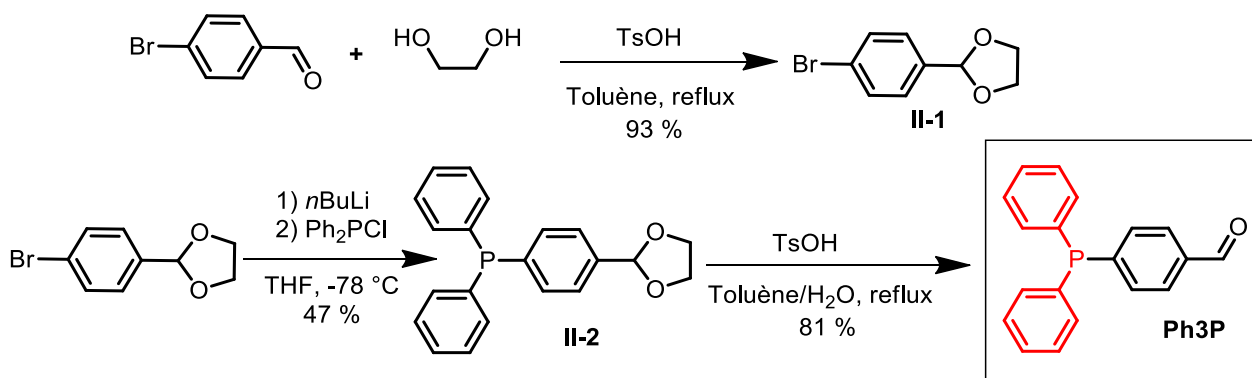


Schéma II-4. Voie de synthèse du 4-(diphénylphosphino)benzaldéhyde.

Par conséquent, l'aldéhyde est protégé par un acétal formé par réaction avec l'éthylène glycol en milieu acide afin d'obtenir **II-1**. Le rendement est amélioré par l'utilisation d'un montage de Dean-Stark, afin d'éliminer l'eau formée pendant la réaction. **II-1** peut ensuite réagir avec du *n*BuLi à -78 °C puis avec la chlorodiphénylphosphine afin de donner **II-2** avec un rendement isolé de 47 %. Le rendement moyen de cette réaction s'explique par une oxydation du produit pendant la réaction et la purification. Cette perte de rendement a été d'autant plus accrue par une tentative de recristallisation dans du méthanol. Enfin, l'acétal est clivé pour obtenir **Ph3P**, avec un rendement global de 35 %. Finalement, cette voie de synthèse ne nous a donné un rendement supérieur que de 10 % par rapport à la voie catalysée au palladium à cause de l'oxydation des produits phosphorés dans les étapes 2 et 3.

b) Synthèse des accepteurs

Parmi les accepteurs choisis, **A1**, **A3** et **A4** ont été préalablement synthétisés au sein de notre groupe.^[103–105] L'accepteur **A2** est synthétisé en deux étapes à partir du bromoacétate d'éthyle selon le Schéma II-5. La première étape est la substitution nucléophile entre le benzènesulfinate de sodium et le bromoacétate d'éthyle afin d'obtenir **II-3**. Ce dernier réagit ensuite avec la 3-hydroxy-3-méthyle-2-butanone avec présence de méthanolate de sodium afin de former **A2**.

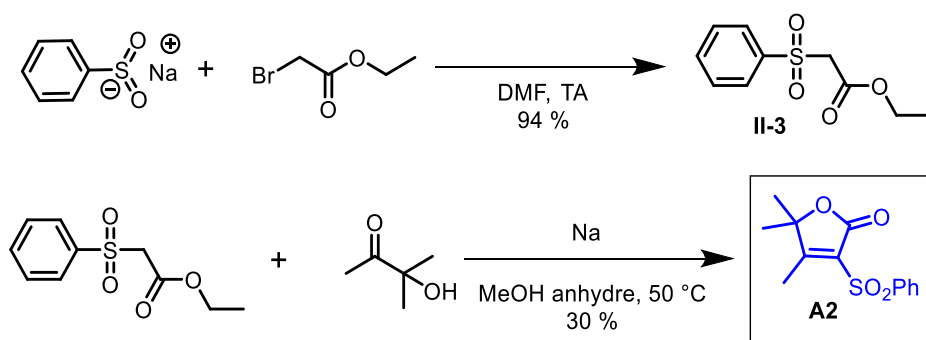


Schéma II-5. Synthèse du groupement accepteur **A2**.

c) Condensation de Knoevenagel

La plupart des chromophores de cette thèse sont synthétisés par condensation de Knoevenagel à partir d'un groupement donneur possédant une fonction aldéhyde et d'un groupement accepteur. Cette réaction est effectuée dans l'éthanol absolu sous irradiation micro-ondes (MW) et est catalysée par l'ajout d'une base, la pipéridine. L'utilisation des MW dans un tube scellé permet un chauffage à la température de 100 °C, supérieure à la température d'ébullition de l'éthanol. De plus, il a été montré que l'irradiation micro-onde permet de diminuer grandement les temps de réaction tout en diminuant la formation de produits secondaires.^[264] L'éthanol étant un mauvais solvant pour ces chromophores, ces derniers peuvent être isolés du milieu réactionnel par simple filtration sur fritté avant purification.

Dans ce cas, la condensation permet d'obtenir **P1-P4** et **N1-N4** à partir des deux aldéhydes **II-1** et **II-2** et des quatre accepteurs **A1-A4** (Figure II-7). Ces fluorophores sont obtenus avec des rendements de 23 % à 83 %, selon le couple donneur/accepteur, après purification par chromatographie.

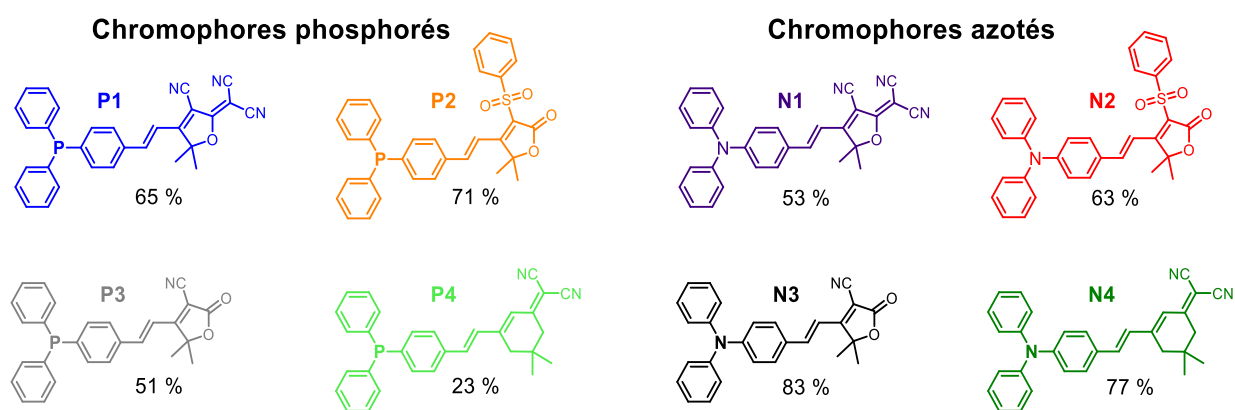


Figure II-7. Structures des fluorophores et rendements des condensations de Knoevenagel.

3. Propriétés spectroscopiques

a) Absorption

L'absorption de cette famille de fluorophores a été évaluée dans l'acétone et est donnée dans la Figure II-8, ainsi que dans le Tableau II-1. Pour plus de clarté, les spectres d'absorptions des composés phosphorés sont représentés avec des lignes pleines et ceux des azotés avec des pointillés.

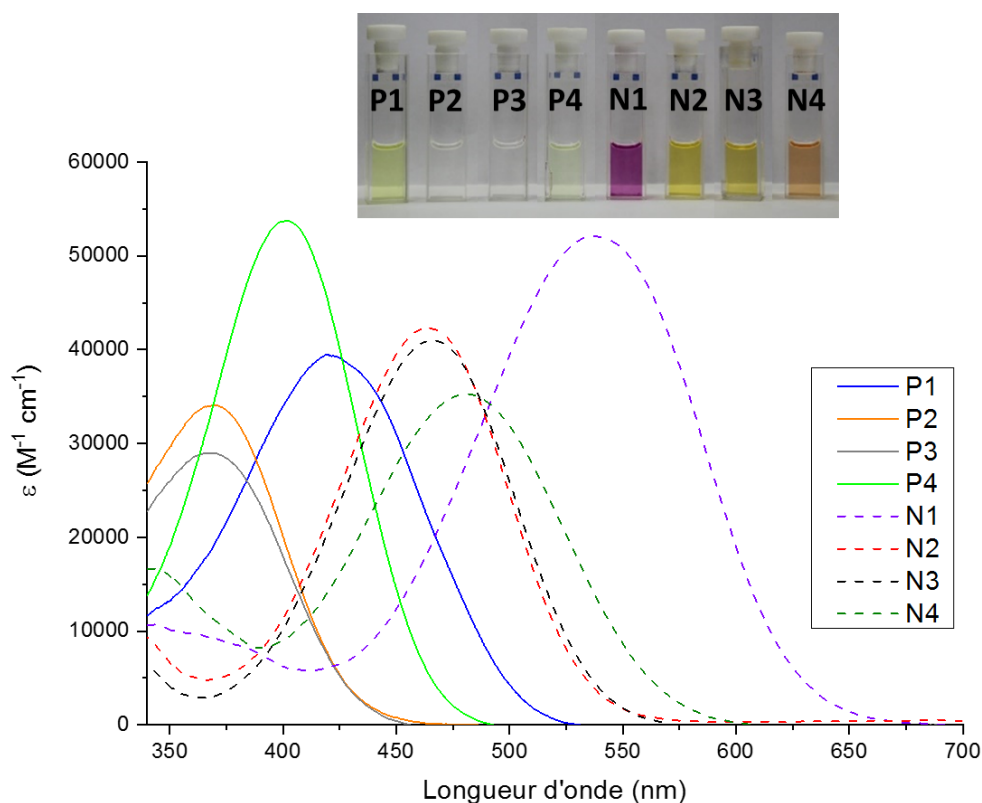


Figure II-8. Absorption des chromophores dans l'acétone.

Comme on pouvait s'y attendre, lors de la substitution de l'azote par un phosphore, l'absorption est fortement décalée de manière hypsochrome. Ainsi, alors que les composés azotés ont des absorptions dans le visible, entre 460 et 540 nm, l'absorption des phosphines est principalement dans l'UV, entre 370 nm et 420 nm. Seul le composé **P1** avec le plus fort accepteur (**TCF**) possède une absorption vraiment dans le visible (Figure II-8).

Les coefficients d'absorption molaire sont compris entre 25 000 $M^{-1}cm^{-1}$ et 55 000 $M^{-1}cm^{-1}$. La substitution n'a pas d'impact réel sur la force de l'absorption, puisque la valeur ϵ diminue de N à P pour trois des composés (**1** à **3**) mais augmente pour le dernier (**4**).

Enfin, les accepteurs **A2** et **A3** sont de force équivalente, comme cela est visible sur la Figure II-8. En effet, les chromophores **N2/N3** et **P2/P3** possèdent des maxima d'absorption identiques deux à deux. Cela provient du caractère électroaccepteur similaire des fonctions cyano et phénylsulfone.

b) Propriétés optiques dans des mélanges eau/acétone

Nous avons étudié la fluorescence des composés dans des mélanges eau/acétone avec des concentrations en colorant de 10^{-5} M.

Contrairement aux amines, les phosphines ne sont pas fluorescentes dans l'acétone. Lorsque la fraction volumique d'eau augmente au-dessus de 0,6/0,7 selon les composés, la précipitation des chromophores entraîne une réapparition de la fluorescence. Par exemple, pour **P2**, la Figure II-9 montre l'émission du composé dans différents mélanges. Entre 0 % et 65 % d'eau (Figure II-9, courbes rouges à cyan), **P2** reste soluble dans le mélange et n'est pas fluorescent. Puis la quantité d'eau devient trop importante et entraîne la précipitation du chromophore hydrophobe et la réapparition d'une fluorescence centrée sur 630 nm. Le maximum de fluorescence est atteint pour 90-95 % d'eau avant que celle-ci ne diminue légèrement de nouveau. Cette chute de fluorescence peut être attribuée à une morphologie différente des nanoagrégats en fonction des conditions initiales de la précipitation.

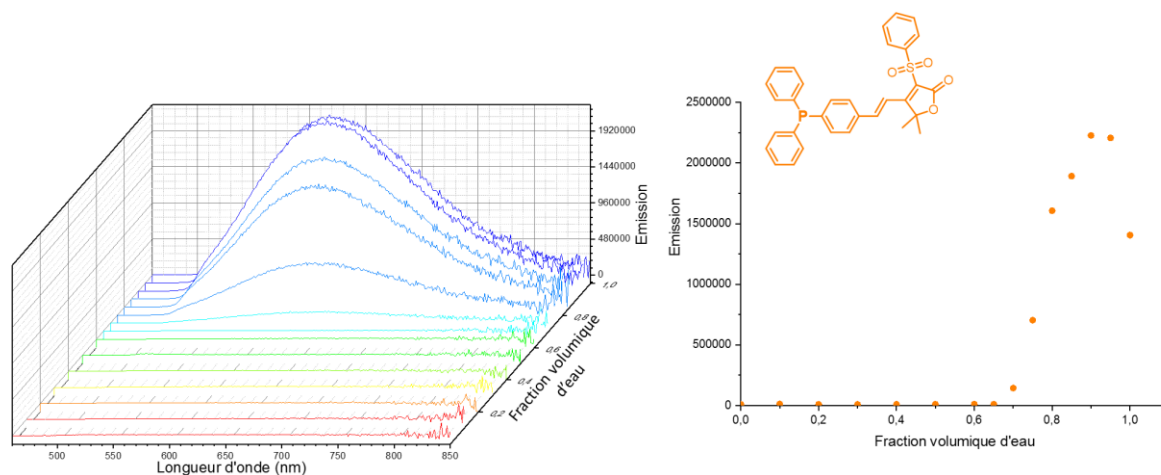


Figure II-9. Fluorescence de **P2** dans différents mélanges eau/acétone.

Afin de comparer les propriétés des agrégats des différents composés, nous avons reporté sur la Figure II-10 les spectres d'absorption et d'émission des chromophores en suspension dans un mélange contenant 90 % volumique d'eau. Comme pour l'absorption dans l'acétone ci-dessus, les propriétés optiques des composés phosphorés sont tracées avec des traits pleins et les composés azotés en pointillés.

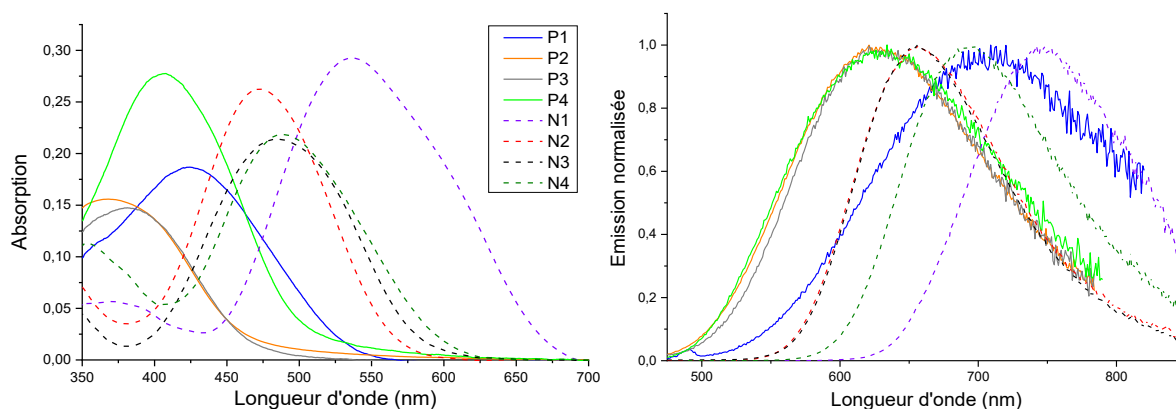


Figure II-10. Absorption et émissions des fluorophores dans un mélange eau/acétone 90:10.

Les spectres d'absorption en nanoagrégats sont légèrement plus larges que ceux dans l'acétone. Lors de l'agrégation, les maxima d'absorption sont généralement légèrement décalés vers de plus grandes longueurs d'onde, signe d'une agrégation J au sein des agrégats (Tableau II-1). La seule exception à cette tendance concerne **N1** dont le maximum est légèrement décalé de manière hypsochrome pendant l'agrégation. Cependant, l'absorption des agrégats de **N1** présente un épaulement sur le côté rouge du spectre. Ainsi les agrégats de **N1** possèdent probablement à la fois des chromophores arrangés selon une agrégation H et d'autres selon une agrégation J.

Concernant l'émission, le décalage hypsochrome lors de la substitution N-P est beaucoup moins marqué qu'en absorption. Effectivement, les décalages en émission sont d'environ 1000 cm^{-1} par rapport aux 5000 cm^{-1} de décalage en absorption. Ces différents décalages entre l'absorption et l'émission sont à l'origine d'une augmentation drastique des déplacements de Stokes lors de la substitution N-P. En effet, les déplacements de Stokes des phosphines sont compris entre $9\,000$ et $11\,000\text{ cm}^{-1}$, soit près du double de deux de leurs homologues azotés. Ces grands déplacements de Stokes sont dus à un fort changement de géométrie entre l'état fondamental et l'état excité, comme nous le verrons par la suite.

Enfin, il est intéressant de noter que **P1**, **P2** et **P3** sont complètement éteints en solution dans l'acétone. La dernière phosphine, **P4**, est peu fluorescente avec un maximum estimé à 590 nm . Grâce aux faibles fluorescences en solution des phosphines, leurs coefficients d'accroissement de fluorescence α lors de l'agrégation sont beaucoup plus grands que ceux des composés azotés. Ces grands coefficients α peuvent être avantageux pour des applications comme sondes « turn-on ». Pour information, ici les coefficients α ont été calculés avec le ratio des maxima d'intensité dans les mêmes conditions et non avec le ratio des rendements quantiques. En effet, les rendements quantiques de **P1**, **P2** et **P3** dans l'acétone sont nuls. La valeur de α pour ces trois colorants correspond donc au ratio signal/bruit de la fluorescence des agrégats à une concentration relativement faible, $10\text{ }\mu\text{M}$. Une augmentation de la concentration devrait donc permettre d'augmenter α .

	Composé	Acétone			Mélange acétone/eau 10:90			
		λ_{abs} (nm)	ϵ (L/mol/cm)	λ_{em} (nm)	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	α	déplacement de Stokes (cm ⁻¹)
Phosphines	P1	420	39 500	-	425	705	90	9 350
	P2	370	34 100	-	370	630	170	11 150
	P3	370	29 000	-	380	625	50	10 300
	P4	400	53 700	(590)	405	635	35	8 950
Amines	N1	537	52 100	740	535	750	8	5 350
	N2	465	42 300	670	470	665	10	6 250
	N3	465	41 000	675	485	655	7	5 350
	N4	480	35 300	710	490	700	0,5	6 100

Tableau II-1. Propriétés optiques des fluorophores phosphorés et azotés en solution dans l'acétone et en agrégats.

Nous avons aussi vérifié si les phosphines devenaient fluorescentes dans des solvants moins polaires. Nous avons donc mesuré la fluorescence de **P1-P4** dans le toluène, apolaire, et dans le DCM, moyennement polaire. Seul **P4** s'est avéré fluorescent dans le toluène avec un maximum de 605 nm et peu fluorescent dans les autres solvants. Les autres phosphines restent totalement éteintes, même dans des solvants plus apolaires.

L'absorption des phosphines est relativement peu solvatochromique avec des variations entre 5 et 20 nm selon les composés entre l'absorption dans l'acétone et l'absorption dans le toluène. La phosphine la plus solvatochromique est **P1** avec une différence d'énergie de 980 cm⁻¹ entre le toluène et l'acétone (Figure II-11).

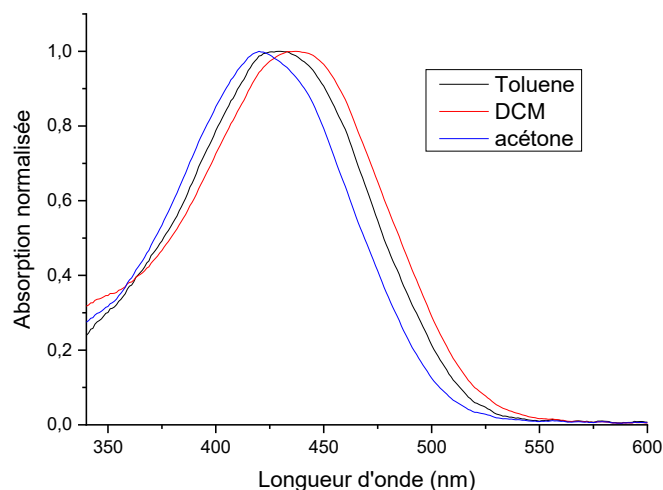


Figure II-11. Solvatochromisme en absorption de **P1**.

c) Fluorescence en poudre

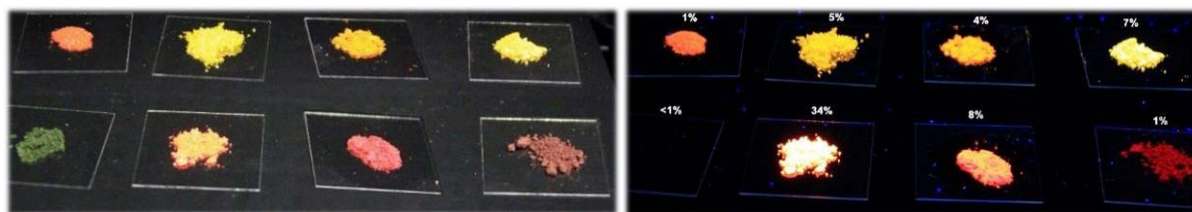


Figure II-12. Photographies des poudres sous lumière blanche (gauche) et sous lumière UV (droite).
Haut : **P1**, **P2**, **P3**, **P4**. Bas : **N1**, **N2**, **N3**, **N4**.

Les huit chromophores de cette étude possèdent une fluorescence sous forme de poudre (Figure II-13 Figure II-12 et Figure II-13). Tout comme en agrégats, le décalage hypsochrome des phosphines par rapport aux analogues azotés est relativement faible, sauf entre **P4** et **N4**. En effet, les phosphines possèdent des maxima d'émission en poudre entre 620 nm et 685 nm alors que les composés azotés émettent entre 635 nm et 750 nm. La fluorescence lointaine de **N1** et **N4** à 750 nm peut être attribuée à la fois aux transferts de charge importants vers **A1** et **A4**, mais aussi à un probable arrangement J au sein de la poudre. Enfin, le composé **P1** présente deux maxima d'émission d'intensités semblables à 650 nm et 685 nm. Cela provient probablement de la présence de deux motifs d'agrégation différents au sein de la poudre.

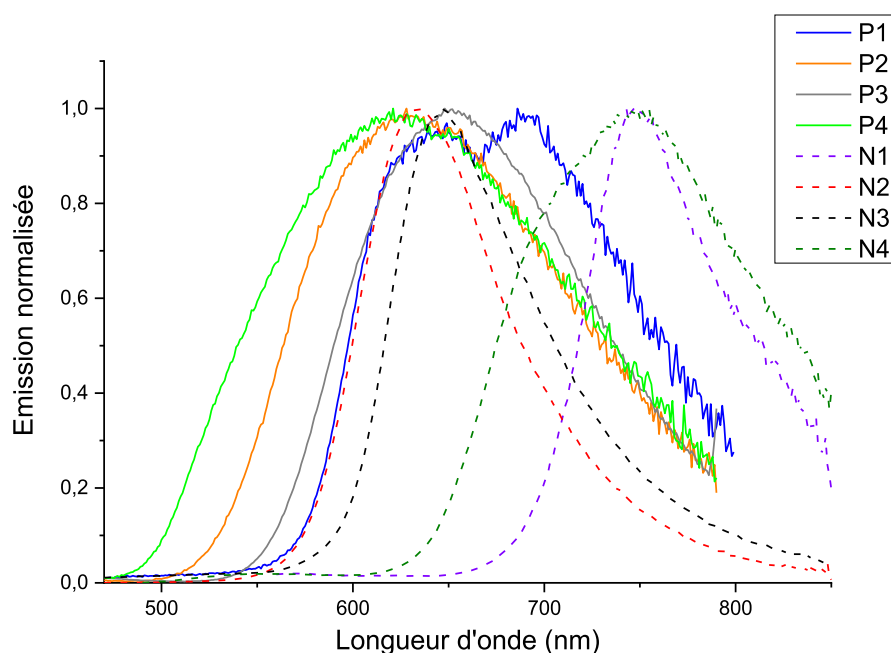


Figure II-13. Fluorescence en poudre des fluorophores.

Les rendements quantiques de fluorescence des poudres ont été mesurés à l'aide d'une sphère d'intégration et sont résumés dans le Tableau II-2.

Parmi les composés azotés, les colorants **N1** et **N4** sont faiblement fluorescents, avec un rendement inférieur ou égal à 1 %. Entre les deux accepteurs les moins forts, **N2** possède une fluorescence très intéressante avec un rendement quantique de 34 % à 635 nm, quatre fois plus grand que celui du chromophore avec l'accepteur **A3**.

Les composés phosphorés possèdent des rendements quantiques de l'ordre de quelques pourcents. **P4** est le colorant le plus fluorescent mais est aussi le moins décalé vers le rouge, avec un maximum à 620 nm. Parmi les autres composés, le rendement quantique diminue au fur et à mesure que le maximum d'émission se décale de manière bathochrome. Enfin, dans la série des phosphines, la différence de fluorescence entre accepteurs **A2** et **A3** est négligeable, contrairement aux composés azotés.

Les propriétés spectroscopiques des chromophores sont résumées dans le Tableau II-2.

		Acétone			Mélange Acétone/eau 10:90				Poudre	
	Composé	λ_{abs} (nm)	ε (M ⁻¹ cm ⁻¹)	λ_{em} (nm)	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	α	déplacement de Stokes (cm ⁻¹)	λ_{em} (nm)	ϕ (%)
Phosphines	P1	420	39 500	-	425	705	90	9 350	650+685	1
	P2	370	34 100	-	370	630	170	11 150	630	5
	P3	370	29 000	-	380	625	50	10 300	650	4
	P4	400	53 700	(590)	405	635	35	8 950	620	7
Amines	N1	540	52 100	740	535	750	8	5 350	750	< 1
	N2	465	42 300	670	470	665	10	6 250	635	34
	N3	465	41 000	675	485	655	7	5 350	645	8
	N4	480	35 300	710	490	700	0.5	6 100	750	1

Tableau II-2. Propriétés optiques des chromophores azotés et phosphorés en solution, en agrégats et en poudre.

4. Rationalisation des propriétés

Pour pouvoir rationaliser ces résultats spectroscopiques, nous avons effectué des calculs théoriques sur ces chromophores en solution dans l'acétone et nous avons obtenu plusieurs structures à l'état solide par diffraction des rayons X.

a) Modélisation théorique

Pauline Colinet et Tanguy Le Bahers à l'ENS de Lyon ont modélisé cette série de chromophores par DFT et TD-DFT afin de mieux comprendre les propriétés optiques de ces composés.

Plusieurs fonctionnelles ont été comparées dans le but d'obtenir des transitions calculées les plus proches des transitions expérimentales. Ainsi, quatre fonctionnelles ont été examinées : deux fonctionnelles hybrides à séparation de portée, CAM-B3LYP et wB97xD et deux fonctionnelles hybrides globales, avec respectivement 25 % et 54 % de contribution Hartree-Fock, PBE0 et M062X.

Une première étude a été réalisée sur l'absorption des chromophores **P1-P4** et **N1-N4** en solution dans l'acétone. Le Tableau II-3 récapitule pour chaque fluorophore l'énergie, en eV, de la transition

d'absorption obtenue expérimentalement ainsi que la différence d'énergie entre la transition calculée et la transition expérimentale.

	Energie de transition expérimentale (eV)	PBE0	CAM-B3LYP	wB97xD	M062X
		Différence d'énergie avec l'expérimental (eV)			
P1	2,95	0,38	0,03	0,09	0,00
P2	3,35	0,43	0,02	0,10	0,01
P3	3,35	0,49	0,01	0,05	0,04
P4	3,10	0,40	0,08	0,03	0,09
N1	2,30	0,04	0,24	0,31	0,20
N2	2,67	0,12	0,24	0,33	0,19
N3	2,67	0,19	0,16	0,25	0,13
N4	2,56	0,30	0,09	0,17	0,04
Différence moyenne		0,29	0,11	0,17	0,09

Tableau II-3. Comparaison entre l'énergie de la transition d'absorption calculée par différentes fonctionnelles et celle obtenue expérimentalement.

La fonctionnelle donnant la meilleure différence moyenne pour l'absorption de cette série de composés est **M062X**. Cette fonctionnelle modélise très bien les propriétés des phosphines et **N4** mais donne une erreur non négligeable pour **N1**, **N2** et **N3**.

Les transitions d'émission ont été calculées par TD-DFT. Cependant, aucune des fonctionnelles n'a donné de résultats satisfaisants, les différences moyennes étaient d'environ 0,5 eV. Pour les phosphines, cela peut s'expliquer par l'utilisation comme valeur expérimentale de la fluorescence en agrégats dans un mélange eau/acétone. Néanmoins, même les composés azotés n'ont pas donné des résultats concluants.

La fonctionnelle **M062X** a été choisie pour la suite de l'étude.

L'optimisation des structures a donné des résultats plus intéressants. La modélisation a montré une variation structurale importante entre l'état fondamental et l'état excité pour les phosphines. En effet, à l'état fondamental, les structures optimisées des chromophores dans l'acétone donnent des angles entre les liaisons P-C d'environ 102° (Tableau II-4). Lors du passage à l'état excité, la planéité du phosphore augmente avec des angles pouvant atteindre 110° et une somme des trois angles atteignant 330° (Figure II-14). Seul le composé **P4** ne présente aucune modification d'angles entre ses structures optimisées à l'état fondamental et à l'état excité. **P4** étant le seul composé présentant une fluorescence en solution dans l'acétone, ce mouvement intramoléculaire participe probablement à la désexcitation non radiative des phosphines **P1-P3**, non fluorescentes en solution.

	Etat fondamental				Etat excité			
	a	b	c	Somme	a	b	c	Somme
P1	101,9	102,9	103,7	308,5	106,9	108,1	107,4	322,4
P2	102,1	102,8	103,4	308,3	110,6	111,0	109,6	331,2
P3	101,8	102,8	103,4	308	110,5	111,0	109,8	331,3
P4	102,0	102,9	103,3	308,2	101,9	103,0	104,5	309,4
Moyenne	102,0	102,9	103,5	308,3	107,5	108,3	107,8	323,6
N1	121,4	121,2	117,3	359,9	121,1	120,9	118,0	360
N2	121,2	121,0	117,7	359,9	120,8	120,8	118,4	360
N3	121,3	121,0	117,7	360	121,0	120,7	118,3	360
N4	121,0	121,1	117,9	360	121,1	121,1	117,8	360
Moyenne	121,2	121,1	117,7	360	121,0	120,9	118,1	360

Tableau II-4. Valeurs calculées des angles C-P-C et C-N-C a, b et c dans l'état fondamental et l'état excité. c représente l'angle entre les deux phényles et a et b les angles entre un phényle et le reste du système π .

La même étude sur les composés modèles azotés montre que l'atome d'azote est plan dans ses états fondamental et excité. Ces chromophores ne présentent donc aucune variation des angles C-N-C lors de l'absorption d'un photon (Tableau II-4).

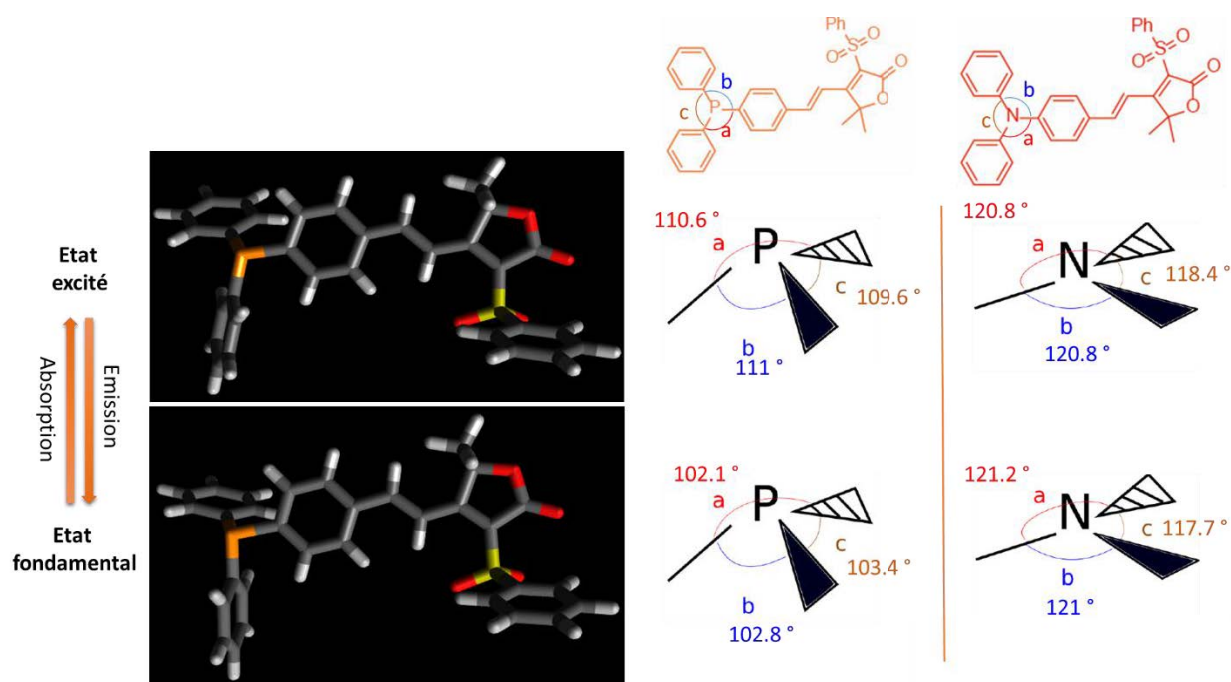


Figure II-14. Structure optimisée de **P2** et valeur des angles C-P-C et C-N-C de **P2** et **N2** à l'état fondamental (bas) et à l'état excité (haut).

Par la suite, les variations de densité électronique lors de la transition d'absorption ont été calculées. La Figure II-15 représente la variation de la densité électronique pour **N1** et **P1**. Les lobes rouges (respectivement bleus) représentent un appauvrissement (enrichissement) de la densité électronique lors de la transition. Dans le cas des phosphines, le transfert de charge provient surtout du doublet non liant du phosphore. Ce dernier est d'ailleurs fortement localisé d'un côté du plan. Au contraire, dans le cas de

N1, il y a une forte contribution des orbitales des phényles et le doublet de l'azote est réparti des deux côtés du plan du chromophore.

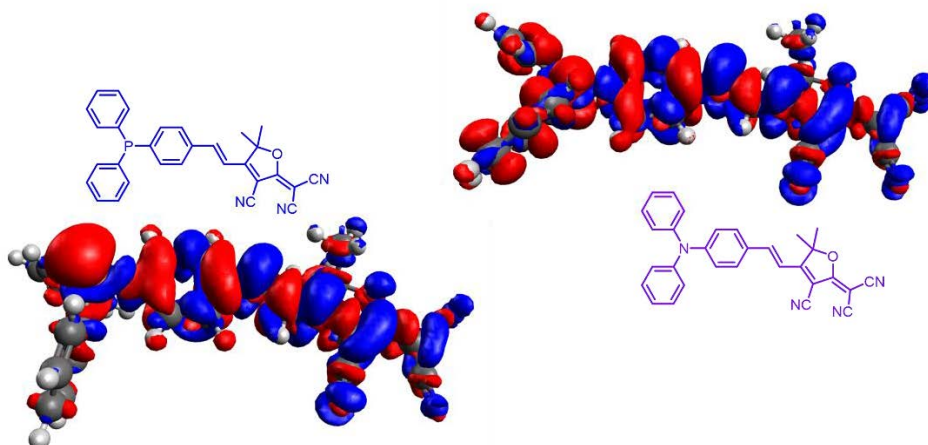


Figure II-15. Variation de densité électronique lors d'une transition électronique de **P1** (gauche) et de **N1** (droite).

A partir de ces variations de densité électronique, il est possible de calculer les barycentres des variations positives et négatives lors du transfert de charge et de définir D_{CT} la distance entre ces deux barycentres (Tableau II-5). D_{CT} est liée à la distance du transfert de charge lors de la transition et peut être utilisée comme un indice qualitatif du transfert de charge.^[265]

Phosphines		Amines		Différence N – P (Å)
	D_{CT} (Å)		D_{CT} (Å)	
P1	3,9	N1	4,3	0,4
P2	4,0	N2	4,2	0,2
P3	4,1	N3	4,3	0,2
P4	3,9	N4	4,9	1,0
Moyenne P	4,0	Moyenne N	4,4	

Tableau II-5. Distance de transfert de charge lors d'une transition au sein des phosphines et des amines.

Lors de la substitution de l'atome d'azote par un atome de phosphore, lors du transfert de charge, la distance moyenne entre les barycentres des charges diminue d'environ 0,4 Å. Ces résultats montrent que le transfert de charge se fait sur une plus longue distance pour les composés azotés, notamment pour le composé **N4**. Cela provient probablement de la plus grande planéité des composés azotés qui permet un meilleur transfert de charge, mais aussi de la participation au transfert de charge des orbitales des phényles de la diphenylamine.

b) Structure par diffraction des rayons X

Afin de rationaliser les propriétés d'émission à l'état solide des phosphines, nous avons obtenu des cristaux de certains fluorophores par diffusion lente d'un non-solvant dans une solution concentrée en colorant. Les mesures de diffraction des rayons X (DRX) sur cristaux nous ont permis l'obtention des structures des chromophores à l'état solide.

Pour les phosphines, seul **P1** a donné des cristaux de qualité suffisamment élevée pour la DRX. Concernant les fluorophores azotés, des structures DRX de **N3** et **N4** avaient déjà été obtenues et nous avons réussi à obtenir des cristaux pour **N2**.^[101,102,266] Les fines aiguilles obtenues pour **N1** ne nous ont pas permis d'obtenir de structure.

Nous prendrons **N4** comme structure azotée modèle. En effet, même si l'arrangement intermoléculaire diffère d'un composé à un autre, nous allons principalement raisonner sur la conformation intramoléculaire des composés. La Figure II-16 montre la conformation d'une molécule de **N4** dans le cristal ainsi qu'une molécule d'acétonitrile, co-cristallisée avec **N4**. Le système π est relativement plan. Une légère torsion de 10° est observée entre les deux plans formés par les liaisons doubles et les nitriles (premier plan, en bleu) et l'atome d'azote et un phényle de la triphénylamine pour le deuxième plan (non représenté). De plus, la planéité de triphénylamine est similaire aux résultats obtenus dans les calculs théoriques en solution, avec une somme des trois angles C-N-C entre ses liaisons de $359,5^\circ$, quasiment égale aux 360° d'une géométrie trigonale planaire. Ainsi, le doublet non liant de l'azote est en parfaite position pour interagir avec le reste du système π .

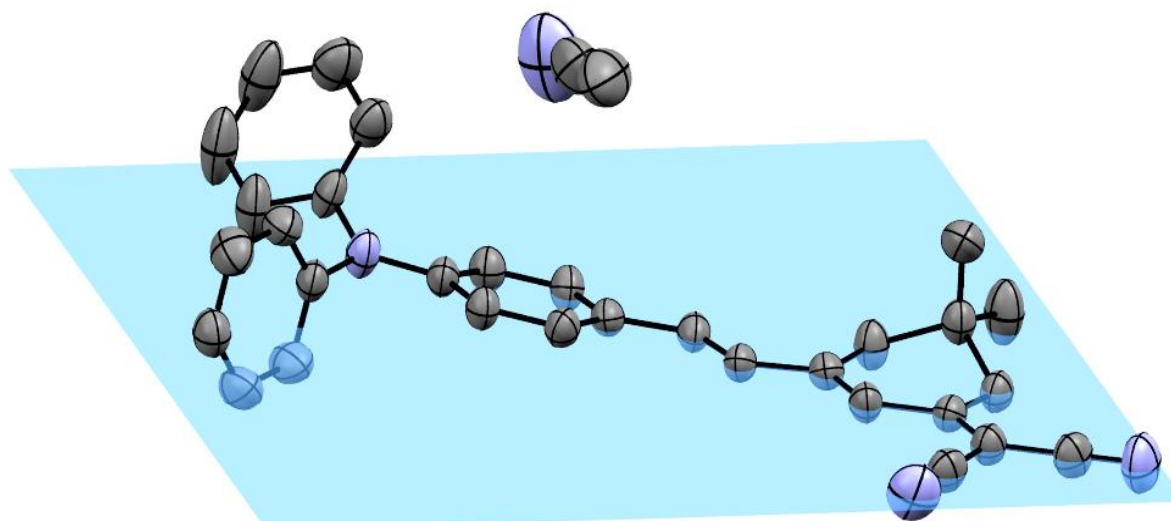


Figure II-16. Structure DRX d'une molécule de **N4**. Pour plus de clarté, les atomes d'hydrogène ne sont pas représentés.

L'arrangement intermoléculaire de **N4** est représenté dans la Figure II-17. Pour plus de clarté, les atomes d'hydrogène et les molécules d'acétonitrile ne sont pas représentés. L'arrangement est créé par des interactions C-H $\cdots$ π ainsi que des interactions N $\cdots$ H. Les molécules de **N4** sont disposées en dimères, séparés d'une distance de $3,5 \text{ \AA}$. L'arrangement H de ces dimères explique la faible fluorescence des cristaux de ce composé.

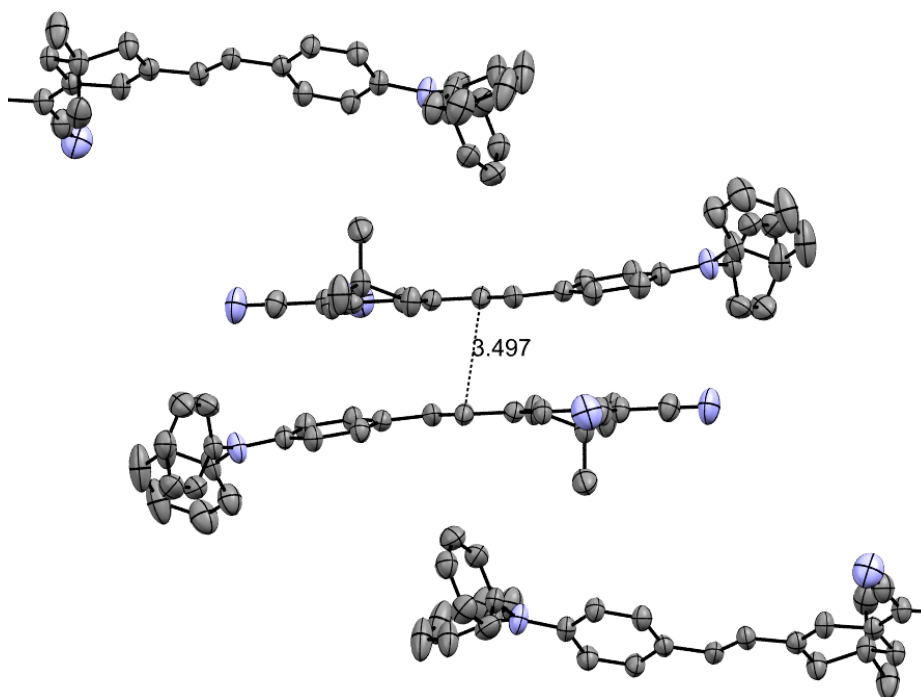


Figure II-17. Arrangement intermoléculaire de **N4** selon l'axe cristallographique *a*. Pour plus de clarté, les atomes d'hydrogène et les molécules d'acétonitrile ne sont pas représentés.

Ci-dessus, nous avons présenté **N4** comme référence des composés azotés. Dans les autres cristaux, l'arrangement intermoléculaire et la planéité du système π peut varier légèrement mais une observation reste constante pour tous les chromophores azotés conjugués : la géométrie trigonale plan de l'atome d'azote et la très bonne possibilité d'interaction du doublet non liant avec le reste du système π .

Qu'en est-il des composés phosphorés ? N'ayant que la structure DRX de **P1** nous allons baser notre raisonnement sur celle-ci et supposer que les conclusions principales s'appliquent aussi aux autres phosphines. La conformation **P1** à l'état solide est représentée dans la Figure II-18, toujours en omettant les atomes d'hydrogène. L'observation la plus marquante est la géométrie pyramidale du phosphore qui est conservée malgré la conjugaison et l'état solide. Les angles entre les liaisons P-C sont en moyenne de 101° avec une somme de 304° , très proche des valeurs théoriques à l'état fondamental en solution dans l'acétone (103° et une somme de 308°). Les liaisons P-C mesurent $1,83 \text{ \AA}$ soit bien plus que les liaisons N-C ($1,4 \text{ \AA}$) de **P4**. La structure de **P1** comporte aussi plus de torsion avec tout d'abord un angle d'environ 40° entre le doublet non liant (dont la position est estimée comme étant le quatrième sommet de la pyramide) et la perpendiculaire au cycle phényle. De plus, la structure comporte un angle d'environ 12° entre le plan du phényle (représenté en bleu) et celui du groupement accepteur. Ainsi, la position du doublet non liant du phosphore entraîne une conjugaison moins importante de celui-ci avec le reste du système π par rapport au doublet non liant d'un azote.

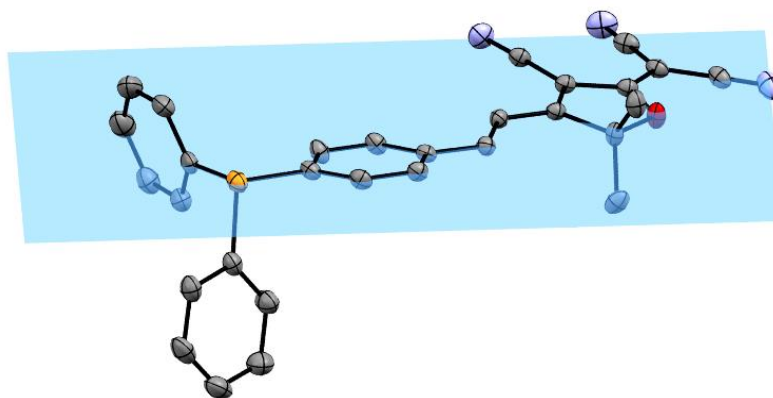


Figure II-18. Structure DRX d'une molécule de **P1**. Pour plus de clarté les atomes d'hydrogène ne sont pas représentés.

Concernant l'arrangement intermoléculaire de **P1**, les chromophores sont aussi arrangés en dimères tête-bêche avec un arrangement global en chevron selon l'axe cristallographique *a* (Figure II-19). La distance intermoléculaire des dimères est de 3,44 Å, soit légèrement inférieure que pour **N4**. Cela semble provenir de la géométrie pyramidale du phosphore, qui place les deux phényles du même côté du plan de la molécule. Cet encombrement stérique d'un unique côté ouvre la possibilité à des interactions π - π via l'autre côté.

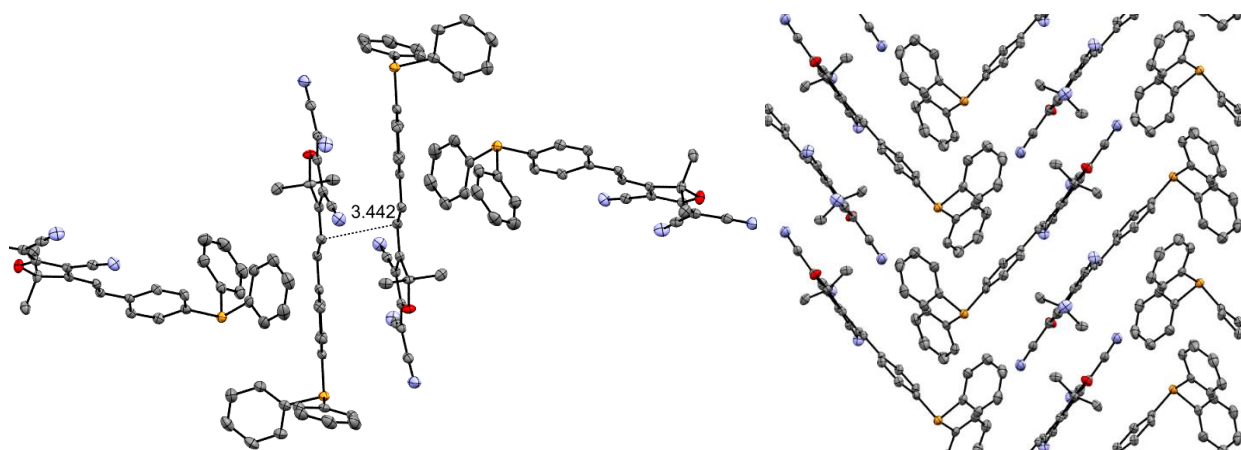


Figure II-19. Arrangement intermoléculaire de **P1** au sein d'une maille (gauche) et avec les chromophores voisins (droite). Pour plus de clarté les atomes d'hydrogène ne sont pas représentés.

En résumé, les différences entre les propriétés optiques des composés azotés et phosphorés proviennent principalement de la différence de géométrie autour du donneur. La conjugaison plus faible des phosphines entraîne un moins bon transfert de charge et donc un décalage hypsochrome des propriétés optiques. A l'état excité, une planification du système π augmente probablement la conjugaison au prix d'un fort coût énergétique, ce qui se traduit par d'un déplacement de Stokes important et par une faible fluorescence en solution.

5. Stabilité

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction de cette partie, les phosphines sont connues pour s'oxyder facilement. Qu'en est-il pour nos chromophores, est-ce que l'implication du doublet non liant dans la conjugaison permet de protéger la phosphine face à l'oxydation ?

En poudre, nous n'avons observé aucune oxydation des phosphines pendant deux ans. En première approche visuelle, la coloration des poudres n'a pas varié. Pour nous assurer de l'absence d'oxyde de phosphine, nous avons mesuré des RMN du proton et du phosphore du composé **P2** deux ans après sa synthèse. Ces deux spectres confirment notre supposition puisque le pic caractéristique de l'oxyde de phosphine, généralement situé vers 28-29 ppm, n'est pas observé par RMN ^{31}P (Figure II-20). Le spectre de RMN ^1H de **P2** est aussi identique au spectre obtenu deux années auparavant.

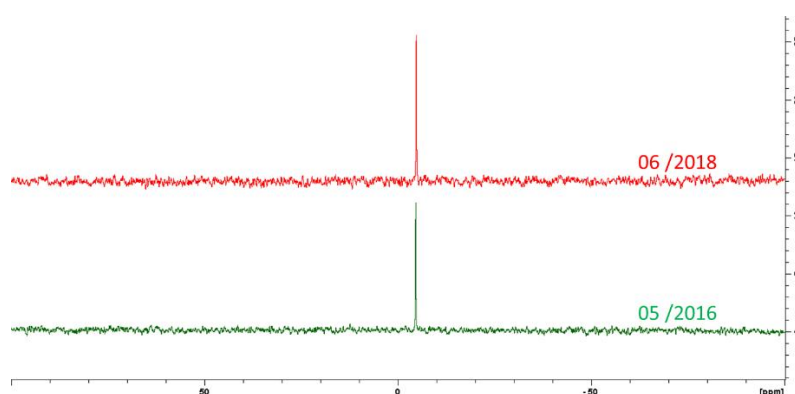


Figure II-20. Stabilité de **P2** en poudre : spectres RMN ^{31}P dans CDCl_3 en 2016 et en 2018.

Cependant, cette protection n'est pas parfaite puisque nous avons remarqué que les solutions de phosphines dans l'acétone perdaient leur couleur après quelques semaines, signe de l'oxydation et du décalage hypsochrome des propriétés optiques.

6. Bilan

Dans cette étude nous avons synthétisé de nouveaux chromophores basés sur un transfert de charge entre une diphénylphosphine et différents accepteurs. Les propriétés optiques de ces chromophores ont été comparées à celle de leurs homologues azotés.

Nous avons montré que les phosphines étaient très peu fluorescentes en solution, mais qu'elles présentaient une fluorescence intéressante en agrégats. En particulier, les agrégats des phosphines ont montré des valeurs de déplacements de Stokes parmi les plus élevées à notre connaissance (en moyenne $10\,000\text{ cm}^{-1}$). Ces valeurs proviennent essentiellement d'un décalage hypsochrome de l'absorption des phosphines par rapport aux composés azotés. Ce décalage émane de la géométrie pyramidale du phosphore qui abaisse son caractère donneur. Par des calculs théoriques, nous avons montré que l'absorption des phosphines entraîne une augmentation de la planéité du phosphore. Ce mouvement explique probablement la faible fluorescence des phosphines en solution. De plus, les phosphines

présentent des coefficients d'accroissement de fluorescence, lors du passage en agrégats, supérieurs d'un ordre de grandeur par rapport aux coefficients des amines correspondantes. Le meilleur composé possède un vrai caractère « turn-on » à 630 nm lors de sa précipitation avec une multiplication de la fluorescence par 170 à 10 μ M et pourrait donner lieu à une sonde précipitante intéressante.

Toutes les poudres des chromophores phosphorés et azotés se sont révélées être fluorescentes. A part pour **N2**, les rendements quantiques restent modestes. Des structures ont été obtenues par diffraction des rayons X sur des cristaux des fluorophores. Ces structures ont confirmé les géométries, pyramidale pour les phosphines et trigonale plan pour les amines. L'encombrement spécifique d'un côté du plan du chromophore par la géométrie pyramidale du phosphore ne s'est pas montré particulièrement intéressant pour la fluorescence à l'état solide puisqu'il conduit à un arrangement dos à dos des chromophores. Néanmoins, l'arrangement intermoléculaire de **P1** montre une disposition en chevron, favorable pour l'émission solide.

Enfin, nous avons vérifié la stabilité des phosphines face à l'oxydation dans le temps. Bien que la conservation des chromophores en solution conduise à leur lente oxydation, les poudres se sont révélées être stables pendant deux ans.

B. Un nouveau groupement électroaccepteur

1. Nouveaux accepteurs et nouveaux chromophores

a) *Phénylsulfone, un groupement intéressant*

Afin de présenter l'origine de cette étude, nous allons revenir aux colorants **N2** et **N3** présentés dans la partie précédente et plus particulièrement sur leurs groupements électroaccepteurs. Les groupements -CN et -SO₂Ph possèdent une force électroacceptrice similaire avec des paramètres de Hammett σ_p respectivement de 0,66 et 0,68.^[267] Ainsi, en solution dans le DCM, les deux fluorophores possèdent les mêmes maxima d'absorption et d'émission à 480 nm et 655 nm. Seul changement, un coefficient d'absorption molaire légèrement plus grand pour **N3** (**N2/N3** : 31 000/38 000 M⁻¹cm⁻¹) et un rendement quantique plus grand pour **N2** (9 %/6 %). En revanche, à l'état solide, **N2** possède un rendement quantique de 34 % à 635 nm, cinq fois plus grand que celui de **N3**. Cette différence de fluorescence peut être expliquée par les structures DRX des chromophores.

La structure cristalline obtenue pour **N3** montre un dimère avec une distance de 3,7 Å entre les deux molécules et un angle de glissement de 50° (Figure II-21). Parmi les deux chromophores, l'un est complètement plan alors que le deuxième possède une forte torsion de 32° entre l'accepteur (plan bleu) et le reste du système π (non représenté). A plus grande échelle, les dimères sont organisés en rangées de chevrons.

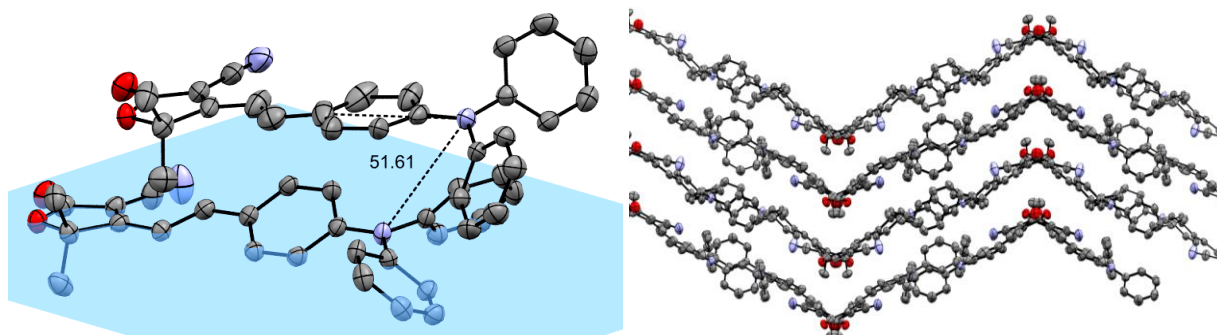


Figure II-21. Structure DRX du dimère de **N3** (gauche) et arrangement en chevrons au sein du cristal (droite).

Il est possible que la torsion de la seconde molécule du dimère limite la fluorescence de celle-ci. Une possibilité de transfert d'énergie de la molécule plane vers la molécule tordue expliquerait alors la fluorescence moyenne de **N3** à l'état solide.

Dans le cas de **N2**, le groupement phényle de l'accepteur est quasiment orthogonal au plan du chromophore. La gêne stérique apportée par ce phényle ainsi que ceux du donneur diphénylamine donne aux chromophores une disposition tête-bêche au sein de la maille. La courte distance d'environ 3,2 Å entre les plans des deux chromophores est compensée par un glissement le long du petit axe de la molécule. Ainsi les deux chromophores ne sont pas l'un au-dessus de l'autre et ne forment que peu d'interactions π - π ensemble.

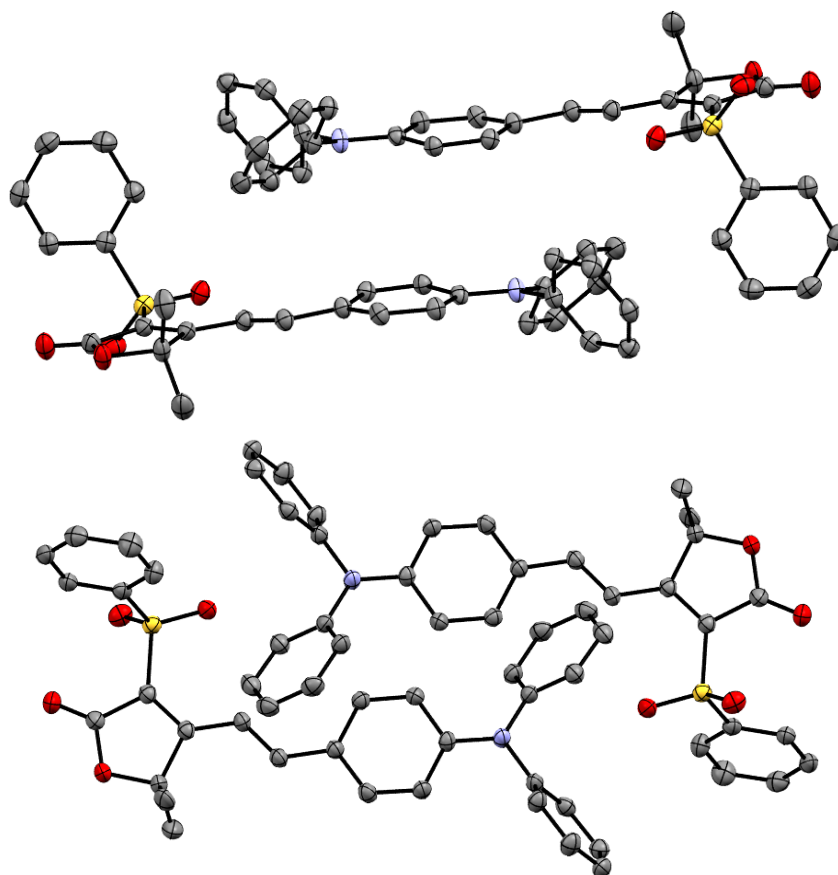


Figure II-22. Vue de côté (haut) et vue du dessus (bas) des molécules voisines de **N2** au sein d'une maille.

Comme nous l'avons vu, la géométrie particulière de l'accepteur **A2** est intéressante pour la fluorescence à l'état solide. Cependant, à cause de la terminaison en lactone de **A2**, sa force électroacceptrice reste modérée. Même avec un donneur relativement fort comme la diphenylamine, la longueur d'onde d'émission de **N2** est en dehors de la fenêtre biologique à l'état solide.

Dans le but de décaler vers le rouge les propriétés optiques des chromophores contenant **A2**, nous voulons remplacer la terminaison lactone en dicyanométhylène. Ainsi l'objectif de cette partie sera la synthèse d'un nouveau groupement électroaccepteur à mi-chemin entre les excellentes propriétés à l'état solide de **A2** et la force électroacceptrice du **TCF** (Figure II-23).

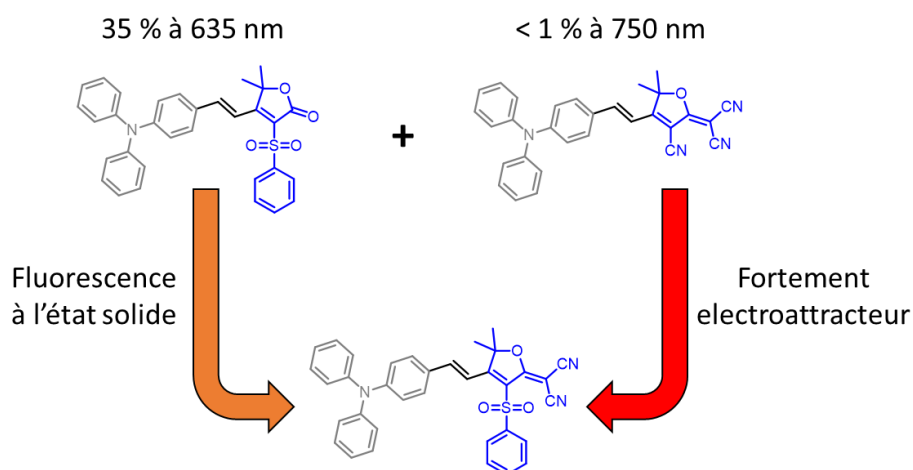


Figure II-23. Conception d'un nouvel électroaccepteur à partir de deux accepteurs connus. Ici représenté avec la triphénylamine comme donneur.

La voie de synthèse directe de ce nouveau groupement électroaccepteur consisterait en une fonctionnalisation de la lactone selon une réaction de type Knoevenagel. Cependant, il a été largement montré que cette lactone était complètement inerte, même lors de tentatives d'activation avec de la pipéridine ou TiCl_4 .^[264] Une autre voie de synthèse doit donc être trouvée.

b) Variations autour du cycle 2,5-dihydrofurane

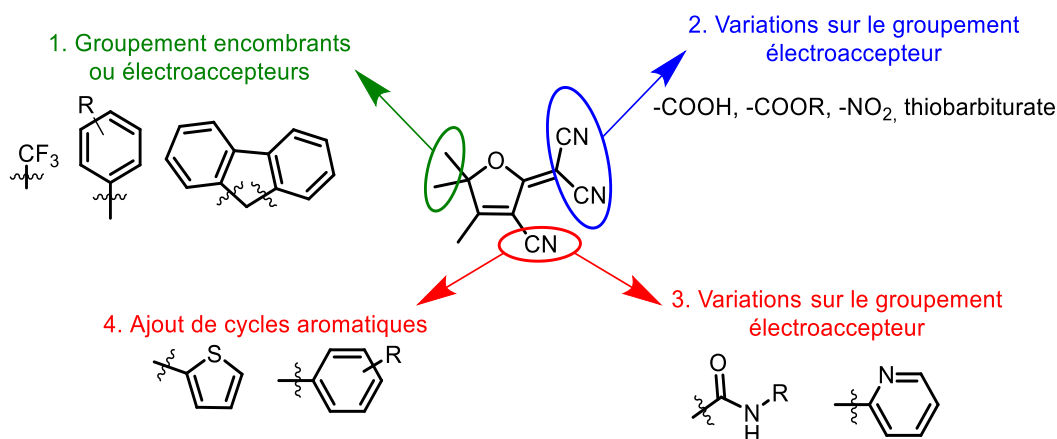


Figure II-24. Variations sur l'accepteur tricyanofurane dans la littérature.

Les cycles 2,5-dihydrofuranes ont été principalement utilisés pour deux applications : le ciblage de récepteurs en chimie médicinale et la synthèse de groupements électroaccepteurs.^[268,269] Afin de moduler les propriétés de la plateforme **TCF**, trois sites de fonctionnalisation peuvent être visés. Le groupement diméthyle peut être remplacé par des groupements encombrants, solubilisants ou avec un caractère inductif électroattracteur (Figure II-24, voie verte).^[270] La force électroacceptrice peut aussi être modulée par modification du groupement dicyanométhylène (voie bleue) ou du groupement nitrile (rouge). Dans notre cas, nous souhaitons effectuer une substitution du nitrile (voie rouge) mais, comme nous le verrons, la voie de synthèse employée pourrait aussi nous permettre de modifier les groupements dicyanométhylène et diméthyle.

Cette voie de synthèse repose sur la synthèse du groupement **TCF** proposée par Melikian *et al.* en 1995. La condensation d'une α -hydroxycétone avec deux équivalents de malononitrile donne le **TCF** en passant par une iminolactone **i** (Schéma II-6).^[271] Contrairement à la lactone, cette iminolactone est assez réactive pour réagir avec le deuxième équivalent de malononitrile afin de former la terminaison dicyanométhylène.

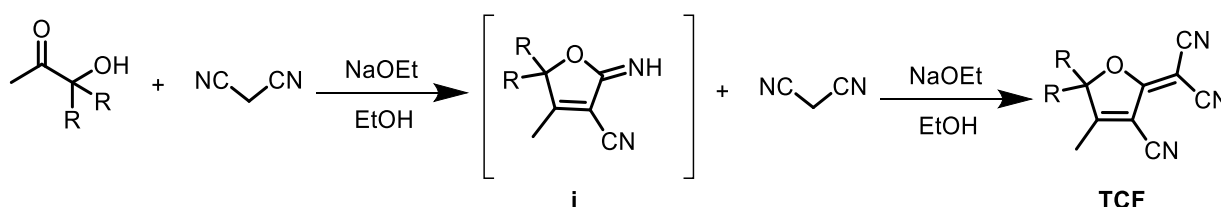


Schéma II-6. Synthèse du groupement **TCF** par Melikian *et al.*^[271]

Par la suite, Villemin *et al.* ont décrit qu'il était possible d'effectuer la réaction sous irradiation micro-ondes, mais surtout qu'il était possible ainsi d'isoler cette iminolactone.^[272] Une fois isolée, l'iminolactone reste réactive envers le malononitrile ou peut être hydrolysée en lactone.

Enfin, en 2002, Jen *et al.* ont utilisé cette méthode pour synthétiser divers dérivés du **TCF** (Schéma II-7).^[264] A partir de l'iminolactone **i**, de différents dérivés du malononitrile et de l'acide thiobarbiturate, ils ont obtenu des dérivés, **i1**, **i2** et **i3**, avec une modification sur la terminaison dicyanométhylène. De plus, les auteurs donnent un unique exemple de dérivé avec substitution du nitrile, **i5**. Dans cet exemple, la réaction de 2-pyridineacétonitrile sur l' α -hydroxycétone leur permet d'obtenir l'iminolactone modifiée **i4** qui a ensuite pu réagir avec un équivalent de malononitrile pour donner le groupement accepteur avec une 2-pyridine, **i5** (Schéma II-7). Malheureusement, les auteurs n'ont jamais publié de chromophores avec les accepteurs synthétisés.

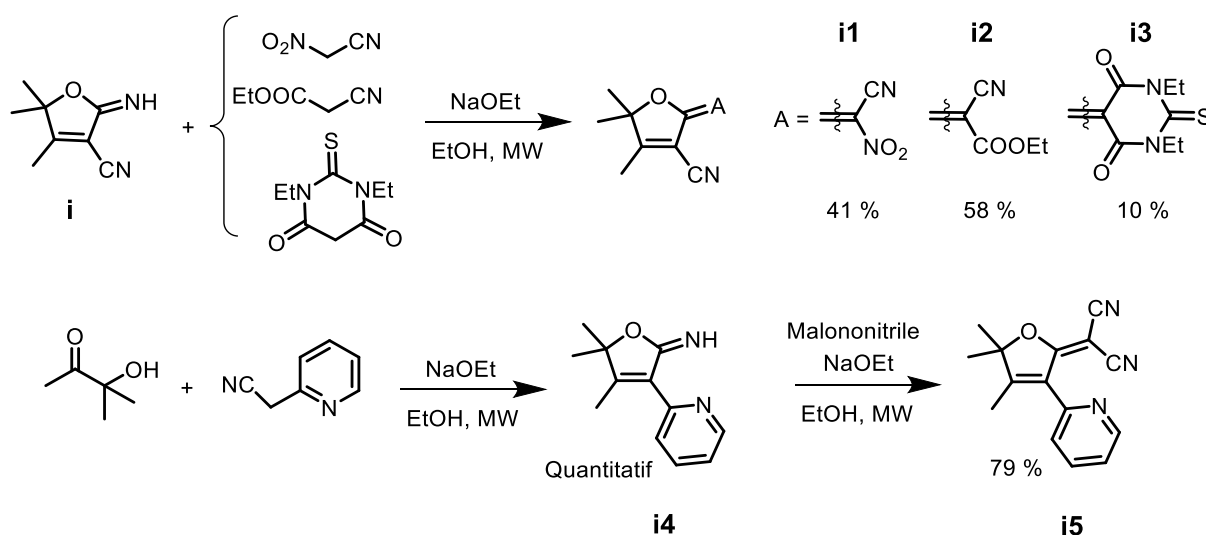


Schéma II-7. Synthèse de dérivés du TCF par Jen et al.[264]

Depuis ce dernier article en 2002, cette méthodologie n'a pas été reprise pour synthétiser de nouveaux groupements électroaccepteurs pour des applications en électro-optique ou pour la synthèse de colorants.

c) Premiers essais

Afin de synthétiser ce nouveau groupement électroaccepteur, nous avons décidé de suivre la voie utilisée par Jen *et al.* pour synthétiser **i5**, présentée dans le Schéma II-7.

Cependant, nous n'avons observé aucune réaction entre le (phénylsulfonyl)acétonitrile et la 3-hydroxy-3-méthyle-2-butanone dans les conditions décrites (NaOEt/EtOH , huit minutes d'irradiations micro-ondes à 20W). L'utilisation de diverses bases (K_2CO_3 , NaH), de divers solvants (méthanol, toluène, THF) et de diverses température (TA, 45°C, 80°C, 100°C) n'a pas permis d'obtenir l'iminolactone correspondante. En effet, en fonction des conditions de réaction, nous avons observé deux scénarii différents. Si la réaction était faite à température ambiante, la faible solubilité du (phénylsulfonyl)acétonitrile dans les alcools ou dans le toluène ne lui permettait pas de réagir. Même si le (phénylsulfonyl)acétonitrile était préalablement dissous à chaud, sa précipitation était observée quelques heures plus tard. Lorsque le milieu réactionnel était chauffé par voie classique ou par utilisation de micro-ondes, un solide blanc précipitait. Ce solide a été identifié par MS et par RMN ^1H comme pouvant correspondre au dimère du (phénylsulfonyl)acétonitrile (Schéma II-8). Nous n'avons cependant pas tenté de caractériser davantage ce solide.

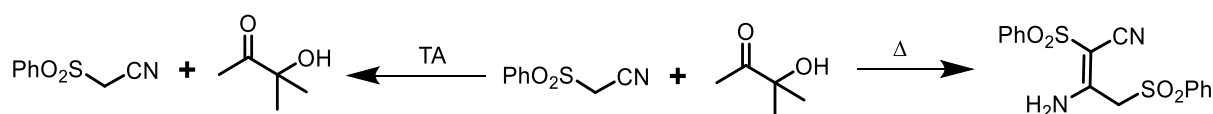


Schéma II-8. Tentatives de réaction entre le (phénylsulfonyl)acétonitrile et l'α-hydroxycétone.

Dans un deuxième temps, afin de vérifier qu'il était possible de l'isoler, nous avons synthétisé l'iminolactone **i** par réaction de l' α -hydroxycétone avec le malononitrile avec un rendement de 51 %. Nous avons ensuite voulu faire réagir **i** avec divers analogues du malononitrile. Cependant, le (phénylsulfonyl)acétonitrile, mais aussi le bis(phénylsulfonyl)méthane se sont encore une fois révélés inactifs envers cette iminolactone (Schéma II-9).

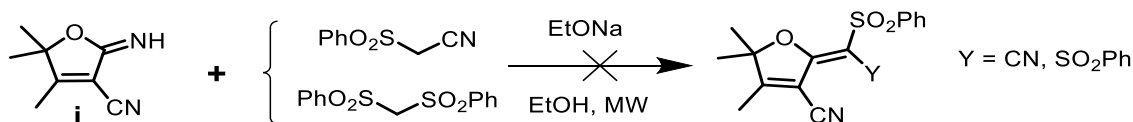


Schéma II-9. Tentatives de réaction entre **i** et les dérivés phénylsulfone.

Un rapide retour vers la littérature nous a appris que les réactions de Knoevenagel avec des sulfonylacétonitrile étaient possibles sur des aldéhydes aromatiques mais compliquées avec les aldéhydes aliphatiques et qu'aucune réaction n'était observée sur les cétones.^[273] Cette faible réactivité des analogues sulfonylés du malononitrile est expliquée comme provenant de la stabilisation du carbanion par le groupement phénylsulfonyl, en particulier pour le bis(phénylsulfonyl)méthane. Néanmoins cette hypothèse de stabilisation du carbanion n'explique pas la formation du dimère observé.

Un unique exemple contournant ce problème a été décrit par Torres *et al.* Les auteurs ont montré qu'il était possible de faire réagir le bis(phénylsulfonyl)méthane, ainsi que des (perfluorosulfonyl)acétonitrile, sur une cétone selon le Schéma II-10.^[274] Dans leur synthèse, la formation du carbanion par l'action du butyllithium est suivie par une transmétallation vers un réactif de Grignard. L'addition nucléophile de ce Grignard sur la cétone ne permet pas l'élimination totale de l'atome d'oxygène pour former la double liaison voulue. L'adduit formé est stabilisé par TiCl_4 puis est déprotoné par la N-méthylmorpholine qui permet l'élimination de $\text{TiCl}_3(\text{OH})$ et la formation de la liaison double.

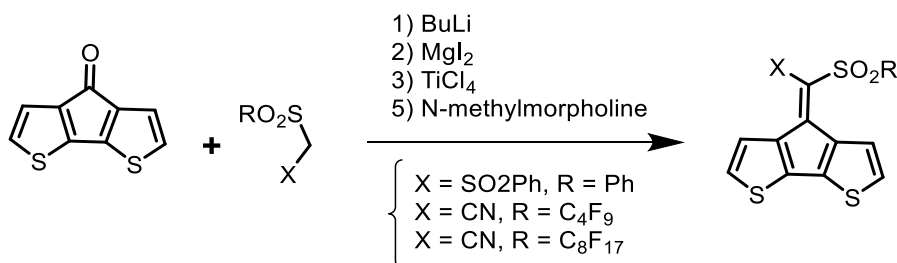


Schéma II-10. Méthode de réaction type Knoevenagel proposé par Torres *et al.*^[274]

d) Synthèse finale

Plutôt que de suivre cette stratégie complexe, nous avons préféré utiliser le thioéther correspondant qui devrait moins stabiliser le carbanion. Ainsi le (phénylthioéther)acétonitrile **II-4** a été synthétisé par la réaction entre le thiophénol et le chloroacétonitrile en milieu basique (Schéma II-11). Ce composé s'est avéré beaucoup plus réactif que les sulfones puisque la formation de l'iminolactone **II-5** s'est déroulée sans encombre avec un rendement de 95% en moins de 30 minutes.

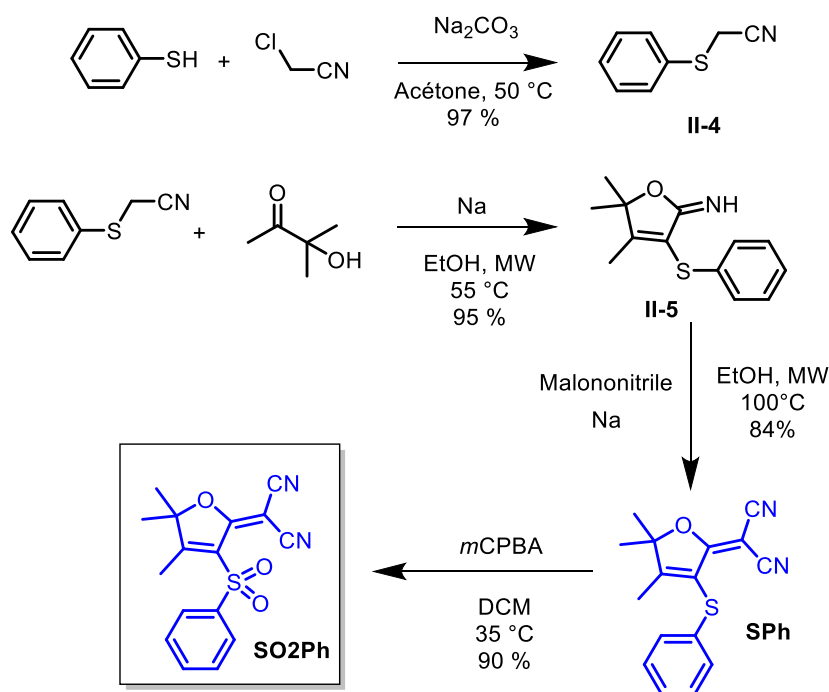


Schéma II-11. Synthèse de l'accepteur.

Nous avons ensuite fait réagir l'iminolactone **II-5** avec le malononitrile afin de transformer l'imine en groupement dicyanométhylène. Cette réaction est en compétition avec une réaction consommant le malononitrile, probablement sa dimérisation et la précipitation du dimère. Cependant, en rajoutant plusieurs fois un équivalent de malononitrile, jusqu'à la consommation totale de l'iminolactone, il a été possible d'obtenir **SPh** avec un excellent rendement de 84% par rapport à l'iminolactone. La réaction peut être facilement suivie par ^1H RMN par le déblindage du groupe méthyle exocyclique entre 2,05 ppm pour **II-5** et 2,2 ppm pour **SPh**, signe de l'augmentation du caractère électroaccepteur du groupement.

Enfin le thioéther est oxydé en sulfone à l'aide de l'acide métachloroperbenzoïque (*m*CPBA). L'oxydation du sulfure en sulfoxyde se fait en quelques minutes contrairement à l'oxydation du sulfoxyde à la sulfone qui a nécessité 60 heures malgré un chauffage à 35°C et l'utilisation de trois équivalents de *m*CPBA. Ici aussi, la réaction est suivie par RMN jusqu'à la disparition du thioéther puis du sulfoxyde (2,40 ppm) pour obtenir la sulfone (2,60 ppm). La purification est effectuée en dissolvant le brut dans un minimum d'acétate d'éthyle et par précipitation quasi-sélective de la sulfone avec du pentane. Le solide blanc obtenu est lavé avec de l'éthanol froid afin d'éliminer les traces d'oxydant restant. Cette voie de synthèse nous permet d'obtenir l'accepteur **SO2Ph** avec un rendement global de 70 %.

Un autre avantage de cette voie de synthèse est qu'elle nous permet aussi de contrôler le degré d'oxydation de l'accepteur. Ainsi, l'accepteur thioéther est particulièrement intéressant comme nous le verrons par la suite. Cette synthèse nous a donc permis d'isoler deux nouveaux accepteurs, **SPh** et **SO2Ph** (Figure II-25).

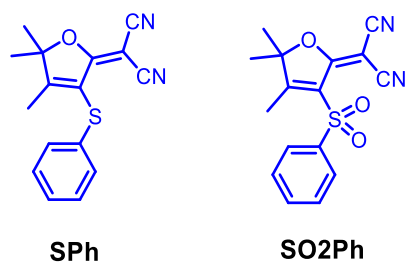


Figure II-25. Structure des deux nouveaux groupes électroaccepteurs.

Le sulfoxyde est plus difficile à isoler car il se dégrade complètement lors de la purification sur colonne de chromatographie. Nous présenterons dans le Chapitre II.B.4 comment nous avons pu obtenir des fluorophores avec un groupement sulfoxyde afin d'étudier leurs propriétés optiques.

e) Synthèse des premiers chromophores

Une fois les groupements accepteurs isolés, nous avons pu sélectionner des donneurs afin de synthétiser de nouveaux fluorophores. L'objectif de cette partie étant la fluorescence à l'état solide, nous avons donc sélectionné des donneurs qui avaient déjà donné de bons résultats de fluorescence à l'état solide.^[103–105] Nous avons choisi plusieurs donneurs azotés basés sur un groupement carbazole ou *N,N*-diphénylamine (Figure II-26).

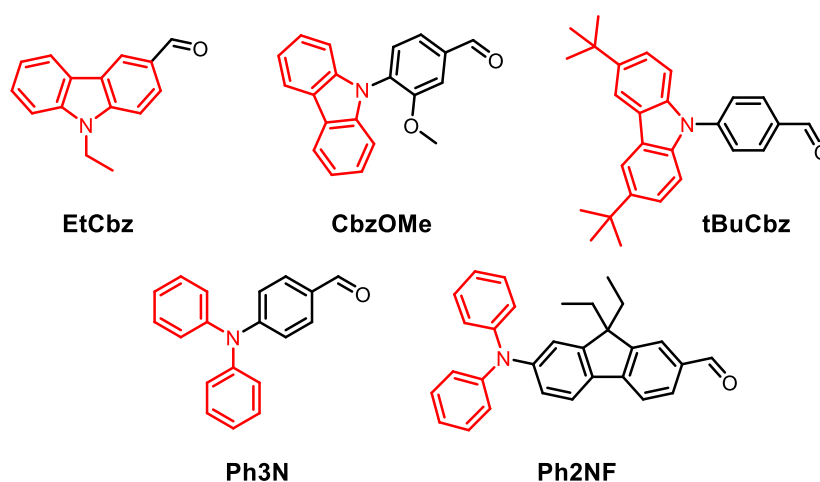


Figure II-26. Structure des donneurs basés sur des groupements carbazoles et *N,N*-diphénylamine.

La synthèse de **Ph3N** a déjà été décrite dans la partie précédente. **EtCbz** est commercial. La synthèse de **CbzOMe** et de **tBuCbz** correspond à un couplage en milieu basique entre le carbazole et le 4-fluoro-3-méthoxybenzaldéhyde pour le premier et le 3,6-di-*tert*-butylcarbazole **II-6** et le 4-fluorobenzaldéhyde pour **tBuCbz** (Schéma II-12).^[104] **II-6** est préalablement synthétisé par une alkylation de Friedel-Crafts sur le carbazole catalysée par ZnCl_2 .

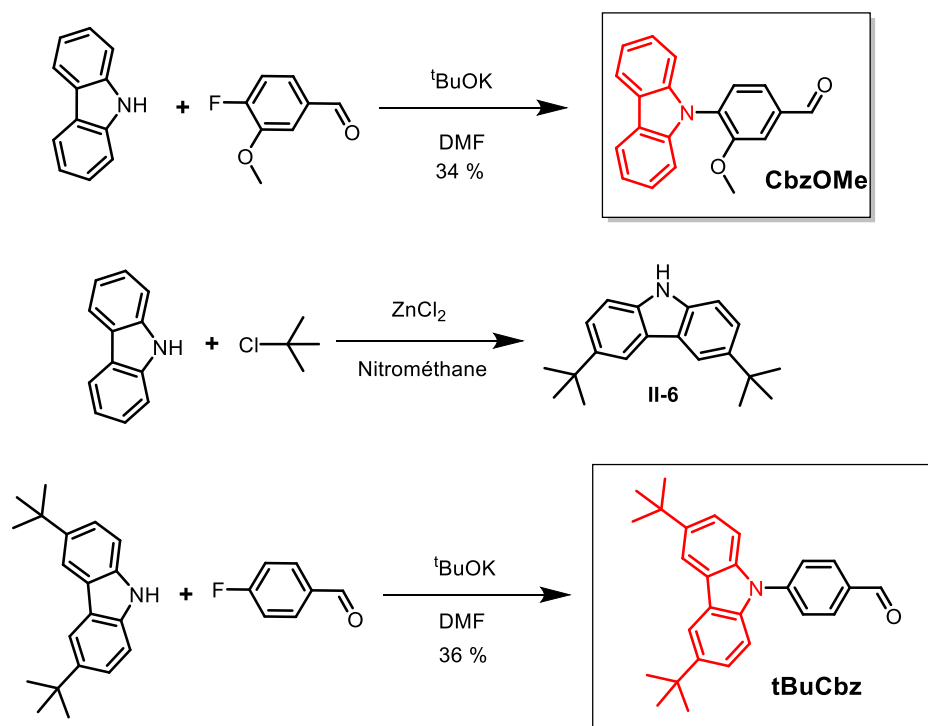


Schéma II-12. Synthèse de **CbzOMe** et de **tBuCbz**.

Enfin, **Ph2NF** est synthétisé en 4 étapes à partir du fluorène selon le Schéma II-13.^[105] Le 2,7-dibromofluorène **II-7** est obtenu par dibromation du fluorène. La déprotonation de **II-7** par NaOH suivie de la substitution nucléophile sur du bromoéthane permet d'obtenir **II-8**. Ce composé est alors formylé par un échange halogène-lithium suivi de l'ajout de *N*-formylmorpholine afin d'obtenir **II-9**. Enfin, la réaction de Buchwald-Hartwig avec la *N,N*-diphénylamine permet l'obtention de **Ph2NF**.

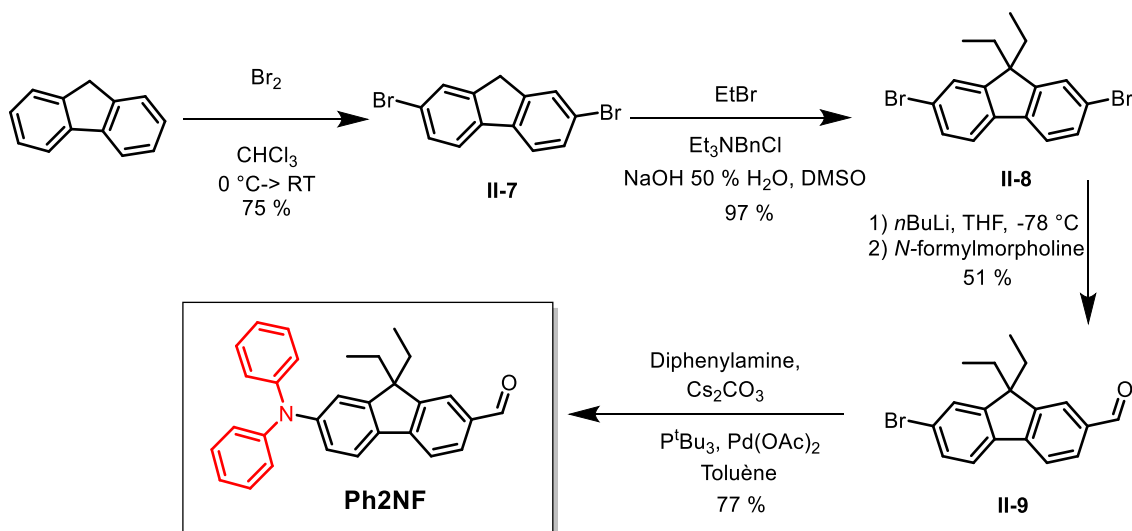


Schéma II-13. Synthèse de **Ph2NF**.^[105]

En plus de ces cinq donneurs, nous avons voulu utiliser un donneur plat afin de voir si l'accepteur était une condition suffisante pour obtenir de bonnes propriétés à l'état solide. Le 9-julolidinecarboxaldéhyde **Jul** a donc été synthétisé par la réaction de Vilsmeier-Haack avec un excellent rendement de 85 % selon le Schéma II-14.

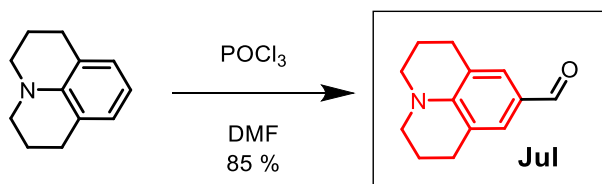


Schéma II-14. Synthèse de **Jul**.

Une fois les donneurs identifiés et synthétisés, les fluorophores ont été synthétisés à l'aide d'une condensation de Knoevenagel entre ces aldéhydes et nos deux nouveaux accepteurs (Schéma II-15).

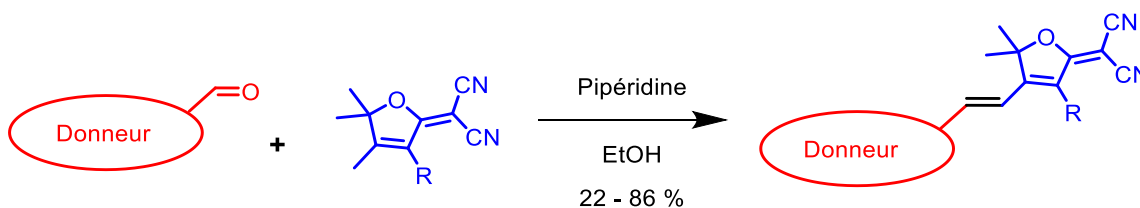


Schéma II-15. Synthèse des chromophores par condensation de Knoevenagel.

Les chromophores ont tous été recristallisés dans l'éthanol afin d'obtenir les formes cristallines des poudres (sauf pour les chromophores basés sur **tBuCbz**, peu cristallins à cause des *tert*-butyls).

Les fluorophores et les rendements après purification sont reportés dans la Figure II-27. Nous n'avons pas tenté d'optimiser ces réactions, ni de récupérer la fraction, parfois non négligeable, de chromophore dans les filtrats. Ainsi, ces rendements peuvent largement être améliorés. Une chute du rendement est globalement observée entre l'accepteur **SPh** et l'accepteur **SO2Ph**, sauf pour les composés issus de la triphénylamine.

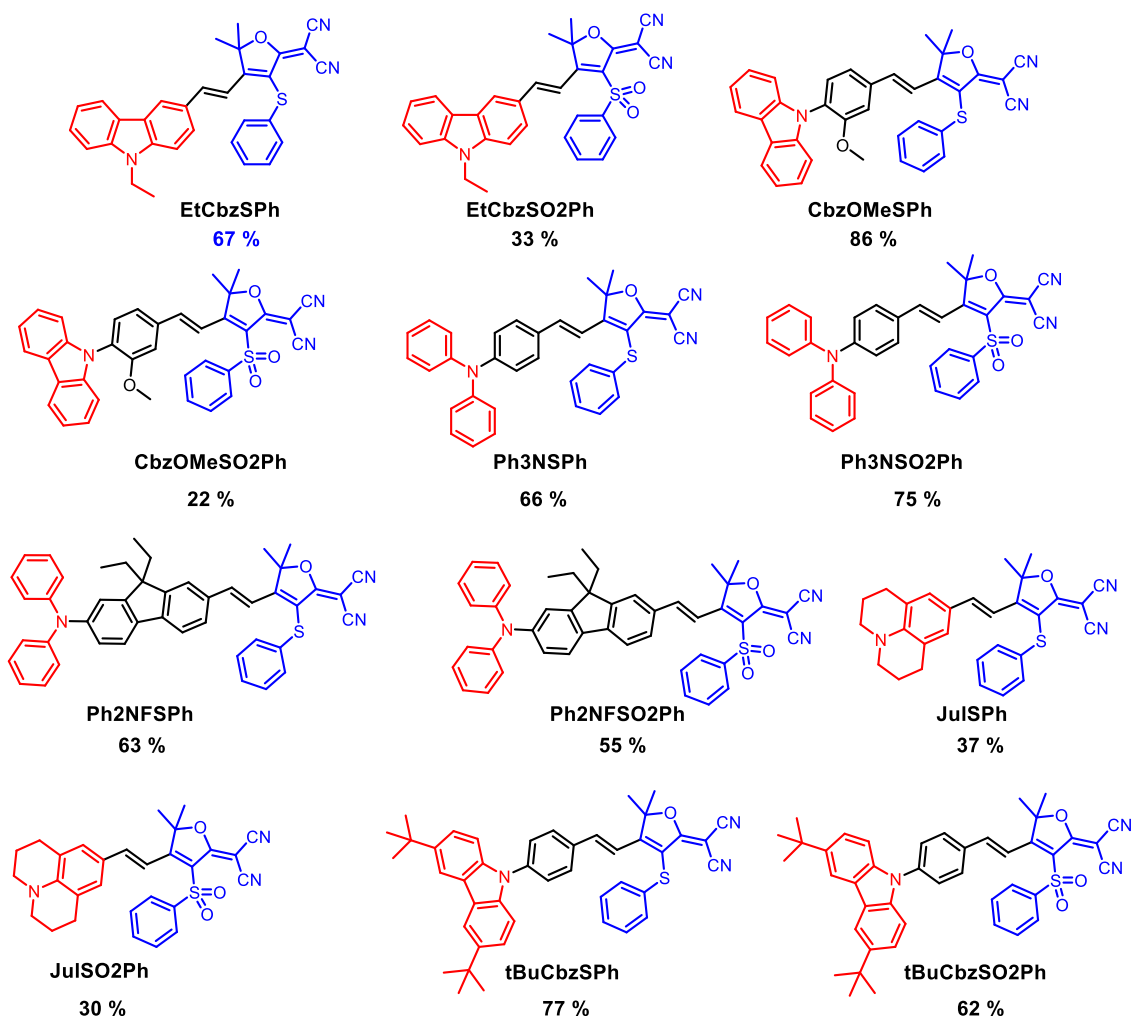


Figure II-27. Structure des chromophores synthétisés et rendements des condensations de Knoevenagel.

2. Propriétés optiques en solution

Dans cette partie, nous présenterons les propriétés optiques en solution organique, puis sous forme de poudre, de chromophores basés sur les accepteurs **SPh** et **SO₂Ph**. L'étude spectroscopique dans des mélanges eau/acétone ainsi que la conception de nanoparticules et de nanoagrégats avec ces composés seront présentées dans le Chapitre III.

a) Absorption et fluorescence dans le chloroforme

Les spectres et les coefficients d'absorption molaire des composés ont été mesurés dans le chloroforme et sont représentés dans la Figure II-28. Pour cette partie, nous avons utilisé des couleurs proches pour les deux fluorophores présentant le même donneur avec la couleur foncée correspondante

à l'accepteur **SPh** et la couleur claire pour **SO2Ph** (par exemple bleu pour **EtCbzSPh** et cyan pour **EtCbzSO2Ph**).

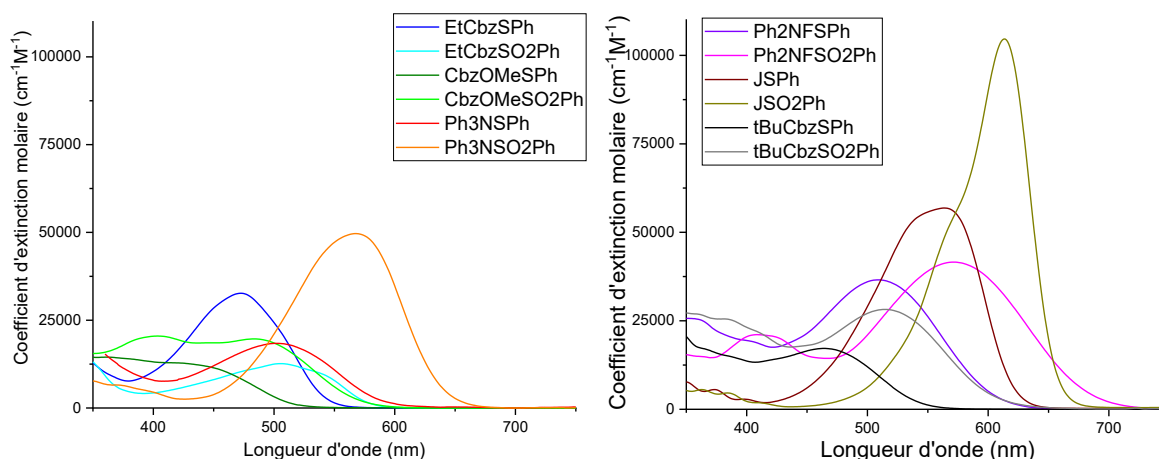


Figure II-28. Coefficient d'absorption molaire des chromophores dans le chloroforme.

Les maxima d'absorption de cette famille sont compris entre 420 nm et 620 nm et couvrent donc une large gamme du visible.

A même donneur, l'oxydation du sulfure en sulfone de l'accepteur entraîne un décalage bathochrome conséquent de l'absorption d'environ 30-60 nm. Cela est cohérent avec l'augmentation de la force électroacceptrice et donc du transfert de charge. En effet, le paramètre de Hammett σ_p augmente de 0,07 pour **SPh** à 0,68 pour **SO2Ph**. A accepteur constant, l'accroissement de la force du donneur permet aussi de décaler l'absorption vers le rouge, à l'exception du donneur **CbzOMe**. A première vue, la force donatrice de **CbzOMe** devrait être similaire à **tBuCbz** et pourtant l'absorption des fluorophores basés sur **CbzOMe** est décalée de 30-45 nm vers le bleu par rapport aux composés avec **tBuCbz**. Comme nous le verrons plus tard, cette différence provient probablement de l'écart à la planéité de **CbzOMe**. En effet, à cause du groupement méthoxy du phényle central, le carbazole ne peut pas être plan. La conjugaison est donc moins efficace dans les fluorophores avec **CbzOMe**, ce qui explique le décalage hypsochrome des propriétés par rapport à ce qui est attendu.

L'ordre final de force donatrice est donc **CbzOMe** < **tBuOMe** $\approx$ **EtCbz** < **Ph3N** < **Ph2NF** < **Jul**.

La plupart des coefficients d'absorption molaire sont compris entre 12 000 et 50 000 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, soit des valeurs typiques des chromophores à transfert de charge. Les composés basés sur la julolidine forment l'exception de cette série avec des valeurs beaucoup plus grandes : 56 850 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ pour **JulSPh** et 104 600 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ pour **JulSO2Ph**. Cela s'explique par un caractère cyanine important au sein de ces fluorophores. Ce caractère cyanine se voit particulièrement dans le spectre d'absorption de **JulSO2Ph** qui possède l'épaule vibronique et la finesse caractéristique des cyanines. Il provient de la force donatrice de la julolidine qui est particulièrement élevée pour un pont conjugué si court, ce qui a pour effet de délocaliser efficacement la charge sur le système π du chromophore.

Il est intéressant de noter que le passage de **SPh** à **SO2Ph** augmente généralement de manière significative le coefficient d'absorption molaire. Ainsi, les valeurs de ϵ peuvent être multipliées par un facteur deux, par exemple entre **JulSPh** et **JulSO2Ph** ou entre **Ph3NSPh** et **Ph3NSO2Ph**.

Fluorophore	λ_{abs} (nm)	ϵ ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)	λ_{em} (nm)	ϕ (%)	$\Delta\nu$ (cm^{-1})
EtCbzSPH	473	32 700	590	0,5	4 050
EtCbzSO2Ph	506	12 650	605	0,7	3 250
CbzOMeSPH	420	12 800	625	11	7 700
CbzOMeSO2Ph	484	20 500	705	4	6 400
Ph3NSPh	502	18 400	650	7	4 550
Ph3NSO2Ph	568	49 650	710	12	3 500
Ph2NFSPH	510	36 550	725	37	6 000
Ph2NFSO2Ph	572	41 600	810	30	4 900
JulSPH	564	56 850	635	5	2 000
JulSO2Ph	614	104 600	655	9	1 000
tBuCbzSPH	464	17 200	650	10	6 200
tBuCbzSO2Ph	515	28 200	730	< 1	5 700

Tableau II-6. Propriétés optiques des chromophores dans le chloroforme.

La fluorescence en solution des chromophores dans le chloroforme a été mesurée et les courbes de fluorescence sont reportées sur la Figure II-29, sauf pour **tBuCbzSO2Ph** à cause de sa faible fluorescence. Les valeurs des maxima d'émission et des rendements quantiques sont reportées dans le Tableau II-6. La majorité des fluorophores présente une bande d'émission large et sans structure, caractéristique de composés à transfert de charge intramoléculaire. Les bandes d'émission de **JulSPH** et de **JulSO2Ph** se démarquent par leur finesse. Les maxima d'émission dans le chloroforme couvrent une large section du visible et du proche IR entre 580 nm et 810 nm.

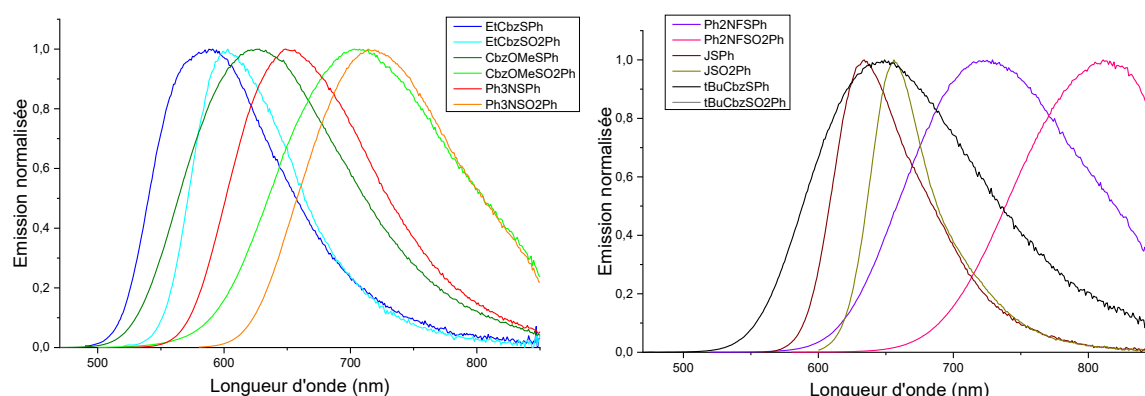


Figure II-29. Spectre d'émission normalisé des chromophores dans le chloroforme.

A donneur identique, le passage de l'accepteur **SPh** à **SO2Ph** entraîne un décalage bathochrome similaire au décalage en absorption. Les déplacements de Stokes sont relativement grands (jusqu'à $7\,700\text{ cm}^{-1}$), notamment pour les composés basés sur les donneurs **CbzOMe**, **Ph2NF** et **tBuCBz**. Ces six chromophores présentent des écarts d'environ 200 nm entre le maximum d'absorption et le maximum

d'émission, signe d'une variation importante entre les états fondamental et excité. A l'inverse, les déplacements de Stokes des composés basés sur la Julolidine sont de l'ordre de grandeur de 1000-2000 cm^{-1} (40-70 nm) ce qui est cohérent avec leur fort caractère cyanine observé sur l'absorption et leur bande d'émission fine. La Figure II-30 montre la différence de déplacement de Stokes entre les composés **Ph2NFSO2Ph** et **JulSO2Ph**.

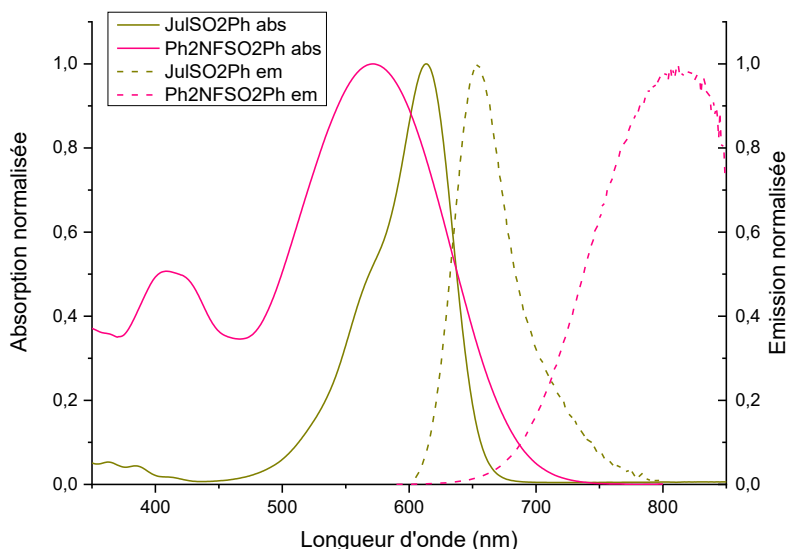


Figure II-30. Comparaison entre les déplacements de Stokes de **JulSO2Ph** et de **Ph2NFSO2Ph**. Les spectres d'absorption (respectivement émission) sont représentés avec des traits pleins (pointillés).

Ainsi, à cause de son faible déplacement de Stokes, bien que l'absorption de **JulSO2Ph** soit la plus décalée vers le rouge, son émission à 655 nm se situe au niveau des émissions des donneurs bien plus faibles.

Malheureusement, il n'existe pas de référence parfaite pour la détermination des rendements quantiques de fluorescence de ces chromophores. En effet, idéalement les références doivent pouvoir être excitées aux mêmes longueurs d'onde que nos chromophores mais aussi émettre dans la même gamme de longueur d'onde. Or, la quasi-totalité des références possède des déplacements de Stokes faibles et donc ne peuvent pas avoir une absorption ET une émission identique à nos chromophores. Nous avons choisi de conserver une excitation identique car la puissance de la lampe dépend de la longueur d'onde. Cependant, il reste une erreur provenant des fortes corrections apportées aux spectres dans le rouge lointain à cause de la mauvaise sensibilité du détecteur dans cette gamme de longueur d'onde. Les rendements quantiques ont été mesurés en comparaison avec le rubrène ($\lambda_{\text{exc}} \approx 490$ nm, 27 % dans MeOH), le crésyl violet ($\lambda_{\text{exc}} \approx 580$ nm, 55 % dans MeOH) pour **JulSPh**, **JulSO2Ph** et **Ph3NSO2Ph** ou encore le styryl 9M ($\lambda_{\text{exc}} \approx 600$ nm, 54 % dans CHCl_3) pour **Ph2NFSO2Ph**. Si les deux premières références sont bien connues,^[275,276] le rendement quantique du Styryl 9M n'est donné que dans un seul article.^[277] Les rendements quantiques obtenus avec cette référence seront à considérer avec précaution (**Ph2NFSO2Ph** et tous les chromophores suivants avec un maximum supérieur à 720 nm).

La plupart des composés ont des rendements quantiques de fluorescence d'environ 5-10 % dans le chloroforme. Trois composés (**EtCbzSPh**, **EtCbzSO2Ph** et **tBuCbzSO2Ph**) sont faiblement fluorescents avec des rendements quantiques inférieurs à 1 %. A l'inverse, les deux composés basés sur un pont fluorène possèdent une forte fluorescence en solution au-delà de 700 nm avec des rendements

quantiques de 30-40%. Contrairement à nos attentes, les rendements quantiques des composés **JulSPh** et **JulSO2Ph** ne sont que de 5 % et 9 % respectivement, malgré la planéité et la rigidité du donneur julolidine.

b) Solvatochromisme

Afin de continuer l'évaluation des propriétés optiques des fluorophores en solution, nous avons mesuré leur absorption et leur fluorescence dans sept solvants classés ci-dessous par ordre de polarité croissante :

- Cyclohexane
- Toluène
- Toluène/Chloroforme 1:1
- Chloroforme
- Dichlorométhane
- Acétone
- Diméthylsulfoxyde

Dans cette partie, les rendements quantiques sont estimés selon l'équation (II-1) par rapport au rendement quantique dans le chloroforme, lui-même mesuré par rapport à d'une référence. Ces rendements ne doivent être considérés que comme des indications car ils sont calculés uniquement sur un point.

$$\phi_s = \phi_{ref} \frac{F_s}{F_{ref}} \frac{A_{ref}}{A_s} \left(\frac{n_s}{n_{ref}} \right)^2 \quad (II-1)$$

Avec :

- ϕ_{ref} le rendement quantique du fluorophore dans le chloroforme.
- F_s et F_{ref} respectivement les aires sous les courbes de fluorescence dans le solvant étudié (S) et dans le chloroforme (ref).
- A_s et A_{ref} respectivement l'absorption du composé dans le solvant étudié (S) et dans le chloroforme (ref) à la longueur d'onde d'excitation.
- n_s et n_{ref} les indices de réfraction du solvant étudié (S) et du chloroforme (ref).

Plusieurs comportements différents ont été observés. Pour les composés **EtCbzSPh** et **EtCbzSO2Ph**, la fluorescence augmente avec la polarité du solvant (Figure II-31). Ainsi, pour **EtCbzSO2Ph** (respectivement **EtCbzSPh**), le rendement quantique passe de 0,5 % (0,7 %) dans le cyclohexane à 3,6 % (3,9 %) dans le DMSO. Pour **EtCbzSO2Ph**, cet accroissement est aussi accompagné d'une augmentation de l'absorption et donc d'une augmentation de la brillance qui passe de 6 M⁻¹cm⁻¹ dans le cyclohexane à 2400 M⁻¹cm⁻¹ dans le DMSO. Enfin, l'élévation de la polarité entraîne un décalage bathochrome de l'émission qui passe de 580 nm (respectivement 550 nm pour **EtCbzSPh**) à 650 nm (625 nm).

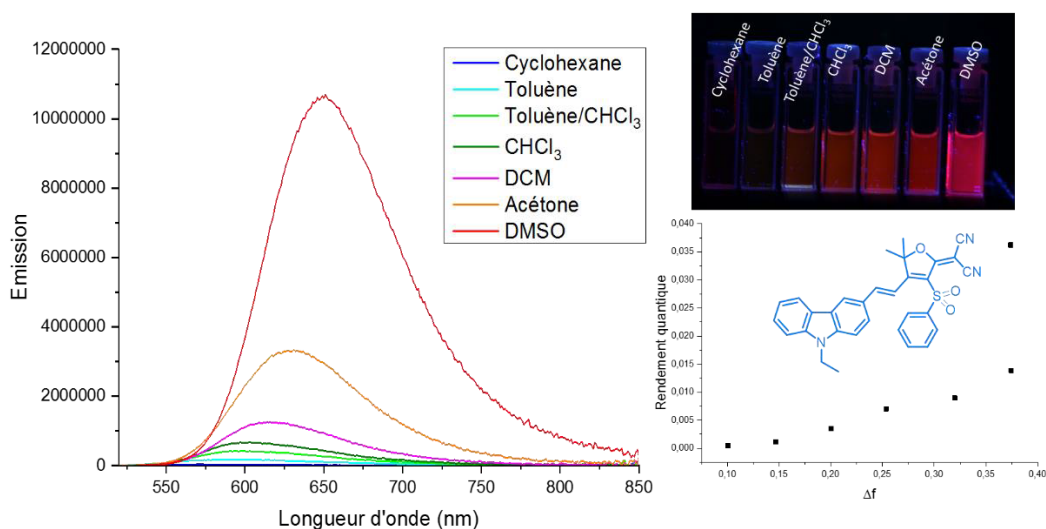


Figure II-31. Etude du solvatochromisme de **EtCbzSO₂Ph**. Courbes de fluorescence et photographie sous excitation UV (365 nm) des solutions dans différents solvants. Variation du rendement quantique estimé en fonction de la polarisabilité d'orientation Δf .

Pour ces deux fluorophores, nous avons voulu vérifier leur rendement quantique dans le DMSO, notamment car leur faible fluorescence dans le chloroforme diminue la précision des autres mesures comparatives. En utilisant le rubrène dans le méthanol comme référence, nous avons obtenu des valeurs de 6 % pour **EtCbzSO₂Ph** et de 3 % pour **EtCbzSPh**. Les valeurs obtenues par la méthode comparative sont donc une bonne première approximation. Néanmoins, une inversion de l'ordre est observée entre ces deux chromophores. Cela provient du fait que la différence entre un rendement de 3,6 % et un rendement de 3,9 % n'est pas significative. Au final, l'augmentation du rendement quantique de **EtCbzSO₂Ph** mesuré à l'aide d'une référence par rapport à la mesure comparative porte la brillance de ce composé à $4200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ dans le DMSO.

Nous avons déjà obtenu des résultats semblables sur des chromophores de Lemke, construits avec l'accepteur dicyanoisophorone, que nous avons étudié (Figure I-33).^[278] Sur ce chromophore, il avait été montré que le toluène (et probablement les autres solvants apolaires) modifiait les surfaces énergétiques de l'état fondamental et de l'état excité donnant le minimum d'énergie de l'état excité pour la forme tordue (avec un angle de 90° entre le groupement dicyanométhylène et le cycle de l'isophorone de l'accepteur). Cette forme de transfert de charge intramoléculaire tordu (TICT) est peu émissive. A l'inverse, dans le DMSO, le minimum de la surface énergétique se fait pour la forme planaire émissive. Cette explication pourrait expliquer l'accroissement de la fluorescence des fluorophores **EtCbz** avec la polarité. Cependant, nous n'avons pas encore réalisé des calculs théoriques pour vérifier que le même mécanisme de désexcitation dans les solvants apolaires est suivi par nos chromophores.

Un comportement plus classique a été obtenu pour les autres composés. Le maximum de fluorescence est obtenu dans les solvants de polarité moyenne (toluène/ CHCl_3 , CHCl_3 ou dans le DCM). Dans le cyclohexane, la fluorescence est peu intense avec une structuration pour la plupart des fluorophores, signe d'une émission depuis l'état local (LE). L'augmentation de la polarité décale le maximum d'émission de manière bathochrome, ce qui confirme bien le transfert de charge intramoléculaire et le passage par un état relaxé de plus en plus stabilisé. L'intensité augmente jusqu'à atteindre son maximum, généralement dans le mélange toluène/chloroforme ou dans le chloroforme. Enfin, la fluorescence diminue de nouveau lorsque la polarité devient trop importante. C'est par exemple

le cas de **Ph2NFSPh** dont les spectres d'absorption et d'émission dans les sept solvants étudiés sont reportés dans la Figure II-32 et dans la Figure II-33.

Avec l'augmentation de la polarité, l'absorption se décale globalement vers les plus grandes longueurs d'onde. Une exception notable à cette règle est l'acétone qui entraîne un décalage hypsochrome de l'absorption par rapport au dichlorométhane ou au DMSO.

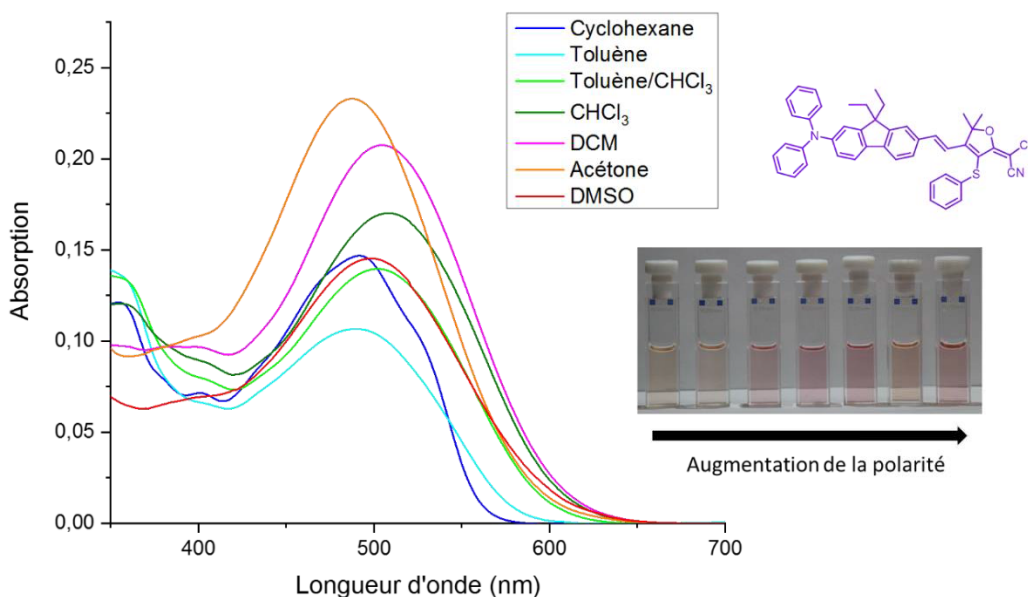


Figure II-32. Solvatochromisme d'absorption de **Ph2NFSPh**.

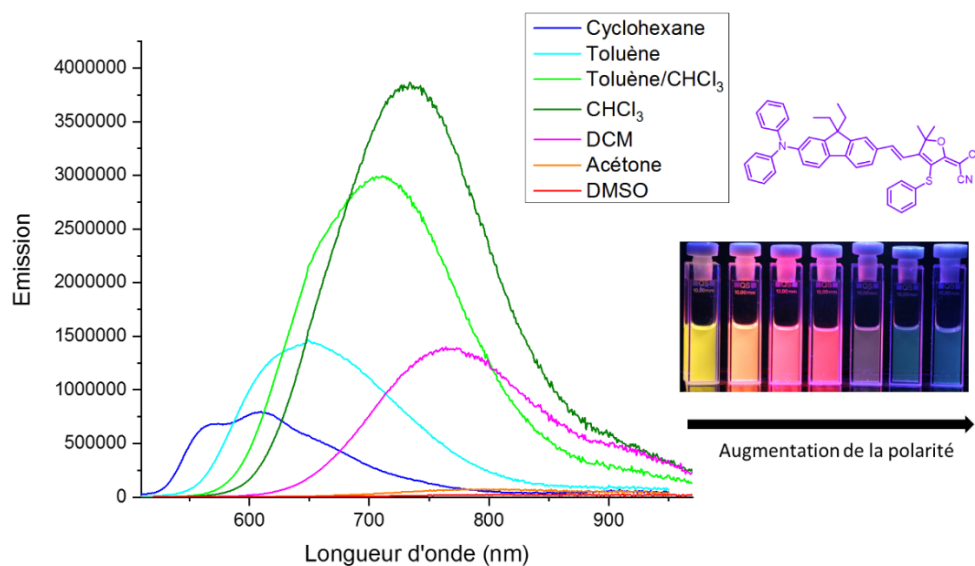


Figure II-33. Solvatochromisme d'émission de **Ph2NFSPh**.

Il est intéressant de noter que les composés basés sur la julolidine présentent aussi un solvatochromisme non négligeable. En effet, même **JuISO2Ph** qui possède un fort caractère cyanine, le passage du toluène au DMSO entraîne un décalage bathochrome de l'absorption de 44 nm et un décalage de l'émission de 41 nm. **JuSPh**, dont le caractère cyanine est moins prononcé, possède un décalage bathochrome de 84 nm en absorption et de 80 nm en émission (Figure II-34). Cela montre que ces deux

chromophores possèdent aussi un caractère de transfert de charge non négligeable. Les propriétés optiques de **JulSO2Ph** n'ont pas pu être mesurées dans le cyclohexane à cause de sa faible solubilité dans ce solvant.

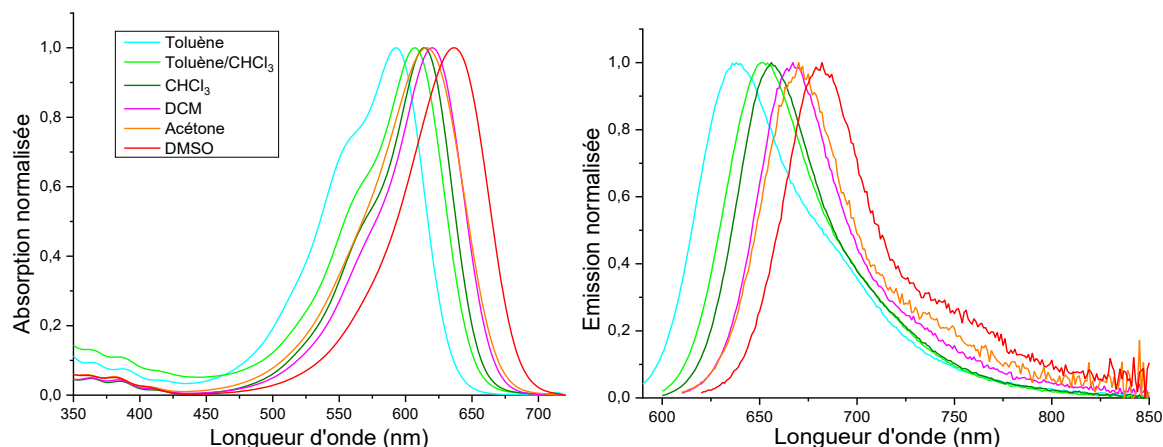


Figure II-34. Solvatochromisme en absorption et en émission de **JulSO2Ph**.

Le Tableau II-7 et le Tableau II-8 répertorient l'ensemble des maxima d'absorption et d'émission dans les solvants étudiés pour tous les composés ainsi que le déplacement de Stokes et le rendement relatif dans chaque solvant.

Solvant	EtCbzSPH				EtCbzSO2Ph				CbzOMeSPH			
	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	QY (%)	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	QY (%)	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	QY (%)
Cyclohexane	457	550	3700	0,1	486	585	3482	< 0,1	436	537	4314	0,3
Toluène	463	580	4357	0,3	497	591	3200	0,1	426	566	5806	1
Toluène/CHCl ₃	466	585	4365	0,4	505	596	3023	0,4	424	601	6946	7
CHCl ₃	468	590	4418	0,5	506	603	3250	0,7	424	619	7430	11
DCM	465	595	4699	0,6	507	616	3490	0,9	424	652	8247	7
Acétone	459	605	5258	0,7	500	631	4152	1,4	419	690	9374	0,4
DMSO	473	626	5167	3,9	519	650	3883	3,6	430	705	9071	0,2
Solvant	CbzOMeSO2Ph				Ph3NSPh				Ph3NSO2Ph			
	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	QY (%)	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	QY (%)	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	QY (%)
Cyclohexane	482	-	-	-	487	583	3381	0,5	523	595	2314	0,4
Toluène	482	621	4644	1	492	597	3575	2	533	646	3282	2
Toluène/CHCl ₃	483	676	5911	5	502	632	4098	5	555	689	3504	11
CHCl ₃	484	705	6477	4	504	650	4457	7	567	713	3611	12
DCM	470	-	-	-	503	679	5153	9	565	750	4366	1
Acétone	441	-	-	-	498	704	5876	< 0,1	546	766	5260	< 0,1
DMSO	445	-	-	-	511	725	5776	< 0,1	567	766	4582	< 0,1

Tableau II-7. Longueur d'onde d'absorption (λ_{abs}), d'émission (λ_{em}), déplacement de Stokes ($\Delta\nu$) et rendement quantique relatif (QY) des fluorophores dans les sept solvants étudiés.

Nous avons modélisé le solvatochromisme de nos composés par la loi de Lippert-Mataga présentée dans le paragraphe Chapitre I.A.3.c). La plupart des solvatochromismes peuvent être modélisé de manière acceptable par le modèle de Lippert-Mataga (Figure II-35).

Solvant	Ph2NFSPH				Ph2NFSO2Ph				JulSPH			
	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	QY (%)	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	QY (%)	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	QY (%)
Cyclohexane	492	610	3932	7,6	539	617	2345	3	506	598	3040	0,5
Toluène	490	649	5000	23	544	697	4035	18	529	612	2564	2
Toluène/CHCl3	502	711	5856	36,7	563	759	4587	53	550	628	2258	2
CHCl3	509	735	6041	37	571	792	4887	30	563	634	1989	5
DCM	505	766	6747	11	560	895	6684	17	570	651	2183	9
Acétone	488	800	7992	0,6	529	935	8208	0,2	563	662	2656	3
DMSO	498	850	8316	0,4	534	958	8288	< 0,1	590	678	2200	5
Solvant	JulSO2Ph				tBuCbzSPH				tBuCbzSO2Ph			
	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	QY (%)	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	QY (%)	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	QY (%)
Cyclohexane	-	-	-	-	461	458	3444	0,4	498	607	3606	< 0,1
Toluène	593	638	1189	9	461	580	4451	2	506	635	4015	n.d.
Toluène/CHCl3	607	652	1137	16	463	620	5469	10	513	699	5187	n.d.
CHCl3	614	656	1043	9	467	649	6005	0,1	517	725	5549	< 0,1
DCM	620	667	1137	1,2	463	691	7126	10	507	-	-	< 0,1
Acétone	616	670	1308	0,4	449	727	8517	< 0,1	484	-	-	< 0,1
DMSO	636	682	1061	0,1	460	727	7984	< 0,1	497	-	-	< 0,1

Tableau II-8. Longueur d'onde d'absorption (λ_{abs}), d'émission (λ_{em}), déplacement de Stokes ($\Delta\nu$) et rendement quantique relatif (QY) des fluorophores dans les sept solvants étudiés.

Bien que nous n'ayons pas calculé les rayons de la cavité d'Onsager des chromophores, nous pouvons utiliser la pente des courbes de tendances des modélisations de Lippert-Mataga afin de comparer qualitativement la variation de moment dipolaire des chromophores lors d'une transition électronique. Ainsi, la variation de moment dipolaire au sein des composés se fait, par ordre décroissant, dans l'ordre : **Ph2NFSO2Ph > tBuCbzSPH > CbzOMeSPH > Ph2NFSPH > tBuCbzSO2Ph > Ph3NSPH > Ph3NSO2Ph > EtCbzSPH > CbzOMeSO2Ph > EtCbzSO2Ph > JulSO2Ph > JulSPH.**

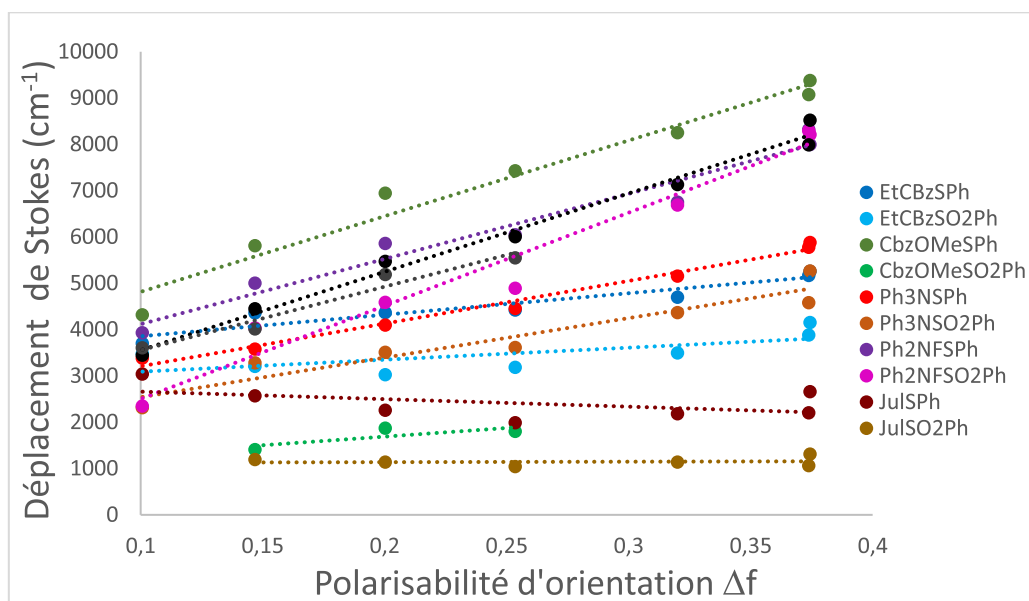


Figure II-35. Modélisation de Lippert-Mataga des chromophores.

Cette conclusion reste une première approximation du fait que nous ne prenons pas en compte la probable variation du rayon d'Onsager entre fluorophores ainsi que la modélisation médiocre de certains composés (notamment à cause de maxima estimés dans les solvants très polaires dû à la faible fluorescence de certains composés dans ces solvants). Néanmoins, plusieurs composés présentent des solvatochromismes remarquables. En particulier, la forte fluorescence des composés **Ph2NFSPh** et **Ph2NFSO2Ph** sur une large gamme de polarité est intéressante pour leur possible utilisation comme sonde de polarité.

Enfin, il est intéressant de comparer ces deux fluorophores à une sonde de polarité avec une structure similaire, **FR0**, publiée par Klymchenko *et al.* (Figure II-36).^[279] **Ph2NFSPh** et **Ph2NFSO2Ph** possèdent des coefficients d'absorption molaire dans le chloroforme d'environ $40\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, proche de celui de **FR0** ($43\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ dans EtOH). **FR0** possède un large solvatochromisme d'émission entre 434 nm dans le toluène ($\phi = 83\%$) et 570 nm dans le méthanol ($\phi = 19\%$) complémentaire avec les solvatochromismes de **Ph2NFSPh** (610-770 nm entre le cyclohexane et le dichlorométhane) et **Ph2NFSO2Ph** (620-900 nm sur la même gamme de polarité). Cependant, les rendements quantiques de nos chromophores sont plus faibles du fait de leur fluorescence dans le rouge-rouge lointain.

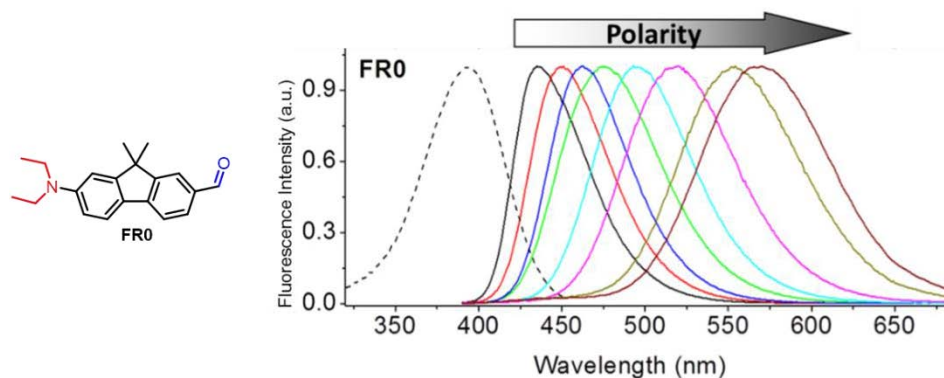


Figure II-36. Structure et solvatochromisme de **FR0** (adapté de ^[279]).

3. Fluorescence à l'état solide

a) Fluorescence en poudre

Comme cela était attendu, la majorité des composés est aussi fluorescente à l'état solide et notamment sous forme de poudre. Les spectres d'émission des composés en poudre sont donnés dans la Figure II-37 et les rendements quantiques et longueur d'onde d'émission dans la Figure II-38. Nous avons mesuré les rendements quantiques des fluorophores à l'aide d'une sphère d'intégration selon la méthodologie décrite dans la partie expérimentale.

En fonction du donneur et de la forme oxydée ou non de l'accepteur, il est possible de moduler la fluorescence entre 635 nm et 830 nm.

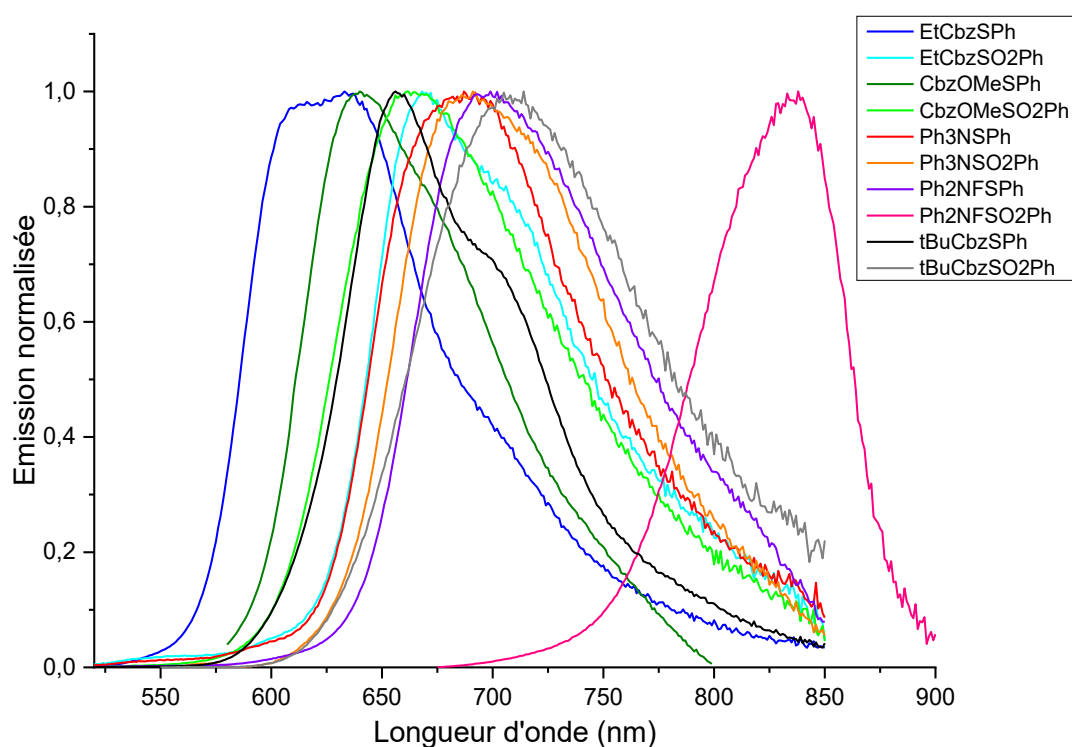


Figure II-37. Fluorescence des poudres des composés.

Les composés basés sur la julolidine ne présentent aucune fluorescence apparente à l'état solide. En augmentant grandement les fentes du fluorimètre, il est possible d'observer une faible fluorescence à 770 nm pour **JulSPH** et à 660 nm pour **JulSO2Ph**. Nous pouvons supposer que la faiblesse de cette fluorescence provient de la grande planéité du donneur julolidine qui forme un assemblage par empilement π que l'accepteur ne suffit pas à empêcher. Cependant, nous n'avons pas réussi à obtenir de structure DRX qui nous aurait permis de mieux comprendre la faible fluorescence de ces deux colorants.

Un autre fluorophore a donné des propriétés décevantes sous forme de poudre : **Ph3NSO2Ph**. En effet, ce composé présente la même longueur d'onde de fluorescence maximale que son homologue **Ph3NSPh** mais avec un rendement quantique beaucoup plus faible. L'émission est décalée de manière

hypsochrome par rapport à l'augmentation de la force de l'électroaccepteur, signe d'une probable agrégation H au sein des cristaux. Comme nous le verrons plus tard, ce composé est fluorescent en agrégats avec un maximum à 750 nm. La faible fluorescence provient donc d'un mauvais arrangement cristallin au sein de la poudre obtenue.

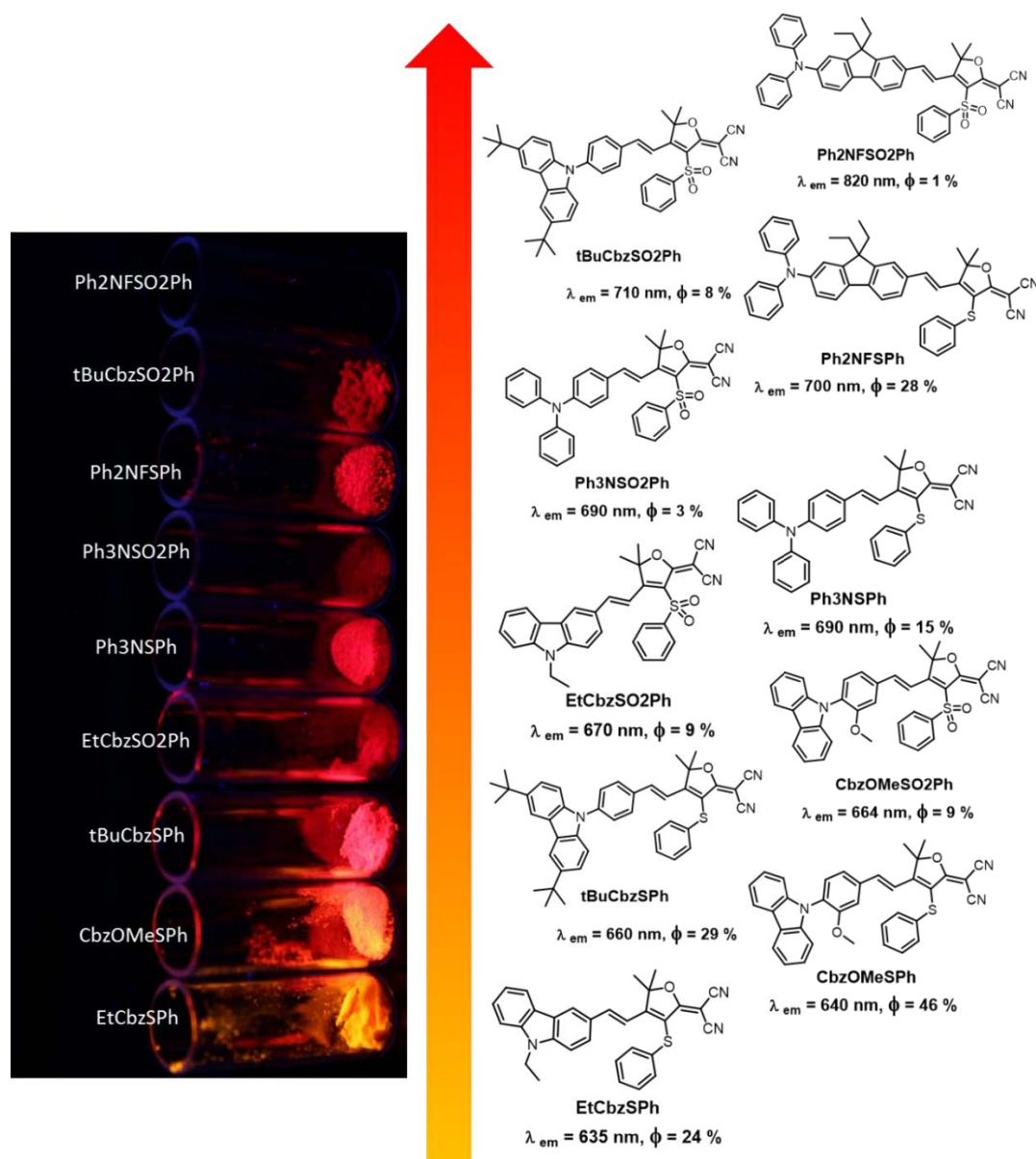


Figure II-38. Photographie des poudres sous excitation UV ($\lambda_{exc} = 365 \text{ nm}$) ainsi que les structures, longueurs d'onde d'émission et rendements quantiques des chromophores.

Les autres composés présentent une fluorescence moyenne à intense avec des bandes d'émission larges entre l'orange et le proche infrarouge.

Parmi les composés notables, **EtCbzSPh** et **CbzOMeSPh** présentent une fluorescence intense avec des rendements quantiques respectivement de 24 % et 46 % mais juste en dessous de la fenêtre biologique (maximum d'émission à 635 nm et à 640 nm). Le spectre de **EtCbzSPh** possède deux bandes d'intensité similaires à 610 et 635 nm. **CbzOMeSPh** et plusieurs autres composés montrent un épaulement sur le côté rouge du spectre d'émission.

Trois composés ont une fluorescence particulièrement intense dans la fenêtre biologique : **tBuCbzSPh**, **Ph3NSPh** et **Ph2NFSPh**. Leur fluorescence respectivement à 660 nm, 690 nm et 700 nm avec des rendements quantiques de 29 %, 15 % et 28 % les rend très prometteurs pour l'imagerie *in vivo*. **Ph3NSPh** et **Ph2NFSPh** sont des poudres d'aspect très cristallin alors que **tBuCbzSPh** est plutôt amorphe.

Enfin, la fluorescence la plus lointaine est obtenue pour **Ph2NFSO2Ph** avec un maximum de fluorescence autour de 820 nm. A cause de la mauvaise sensibilité du détecteur dans cette zone, le rendement quantique a été difficile à calculer et dépend grandement de la justesse supposée du fichier de correction (le spectre d'émission retombe trop rapidement dans la partie rouge). Ainsi, le rendement obtenu de 1 % doit être considéré avec précaution. Néanmoins, la fluorescence de ce composé au-delà des 800 nm le rend fortement intéressant, et nous verrons dans le chapitre suivant qu'il est possible d'améliorer sa fluorescence solide par transfert d'énergie.

Nous avons aussi mesuré les spectres d'excitation des fluorophores. Leur forme générale était identique pour tous les composés : une bande d'excitation très intense dans l'UV suivie d'une excitation large de plus en plus forte entre 400 nm et le début de la bande d'émission et enfin une décroissance rapide de l'excitation (Figure II-39). Cela rend l'excitation des composés relativement facile puisqu'ils absorbent toutes les longueurs d'onde entre 350 nm et 600 nm. Nous pouvons cependant noter que les spectres d'émission et d'excitation possèdent un recouvrement non négligeable. Cela suppose une forte réabsorption qui est probablement responsable d'un décalage bathochrome des spectres d'émission et d'une diminution du rendement quantique.

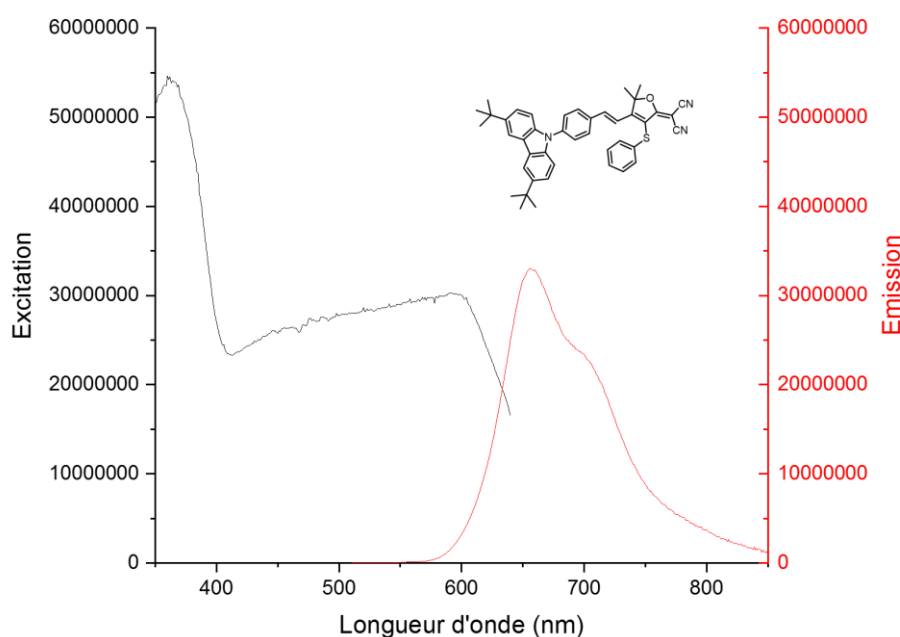


Figure II-39. Courbe d'excitation (en noir, émission à 655 nm) et courbe de fluorescence (en rouge, excitation à 550 nm) de la poudre de **tBuCbzSPh**.

Nous pouvons donc tirer quelques conclusions sur cette famille de fluorophores à l'état solide. Comme nous avons pu le voir, l'intensité de fluorescence des composés **SPh** est nettement supérieure à celle de leur homologue basé sur l'accepteur **SO2Ph**. A donneur identique, la différence entre les bandes d'émission des deux fluorophores non-oxydé et oxydé est en moyenne d'une cinquantaine de nanomètres. Ainsi, le décalage bathochrome avec l'augmentation de la force de l'accepteur lors du passage de **SPh** à

SO2Ph est moins marqué à l'état solide qu'en solution. Enfin, le fluorophore qui se démarque le plus des autres est **Ph2NFSPH** avec un rendement quantique de 28 % à 700 nm.

b) Structures DRX

Nous avons obtenu des cristaux de certains composés généralement par diffusion lente d'un non-solvant dans une solution concentrée en fluorophore. Nous avons obtenu la structure de quatre chromophores : **Ph3NSPh**, **Ph3NSO2Ph**, **Ph2NFSPH** et **Ph2NSO2Ph** ainsi que de l'accepteur **SPh**.

- **SPh**

Un essai de purification par recristallisation dans de l'acétate d'éthyle de l'accepteur **SPh** nous a permis d'obtenir des cristaux de bonne qualité. Comme cela était recherché, le phényle est hors du plan de l'accepteur à l'état solide. Dans les cristaux de l'accepteur **SPh**, cet angle est d'environ 70° (Figure II-40).

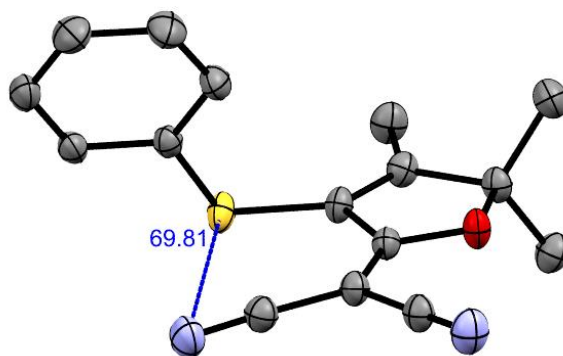


Figure II-40. Structure DRX de **SPh** et mesure de l'angle entre le phényle et le plan de l'accepteur.

- **Ph3NSPh**

La structure de **Ph3NSPh** est désordonnée avec deux positions possibles pour le pont conjugué et un des phényles du groupement diphenylamine (Figure II-41, gauche). Ainsi, deux dispositions du fluorophore coexistent dans le cristal sans modification de la stéréochimie de la double liaison du pont conjugué qui reste en configuration E (comme en solution et comme la quasi-totalité des fluorophores D- π -A obtenus par notre groupe). Cette fois, l'angle entre le phényle et le plan de l'accepteur est de 90°.

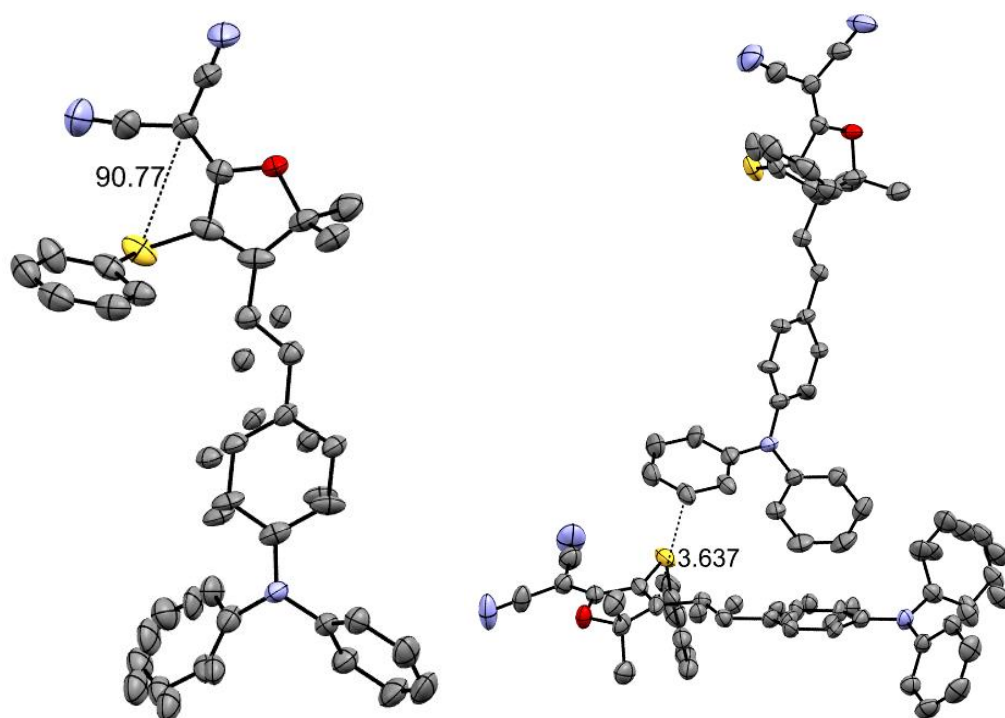


Figure II-41. Gauche : structure DRX d'une molécule de **Ph3NSPh** et mesure de l'angle entre le phényle et le plan de l'accepteur.
Droite : arrangement intermoléculaire en chevron selon l'axe *a* au sein du cristal de **Ph3NSPh**.
Pour plus de clarté, les atomes d'hydrogènes ne sont pas représentés.

L'arrangement intermoléculaire au sein de la maille du cristal est constitué de dimères orientés presque perpendiculairement, avec une distance intermoléculaire d'environ 4 Å (Figure II-41, droite). L'orientation des dipôles, ainsi que la grande séparation, montrent le peu d'interactions entre chromophores voisins. A plus grande échelle, en regardant selon l'axe cristallographique *a*, l'arrangement se fait en chevrons. Ces chevrons sont constitués de lignes de chromophores disposées antiparallèlement, brisées toutes les deux molécules avec un angle de 89° au niveau de deux triphénylaminés (Figure II-42).

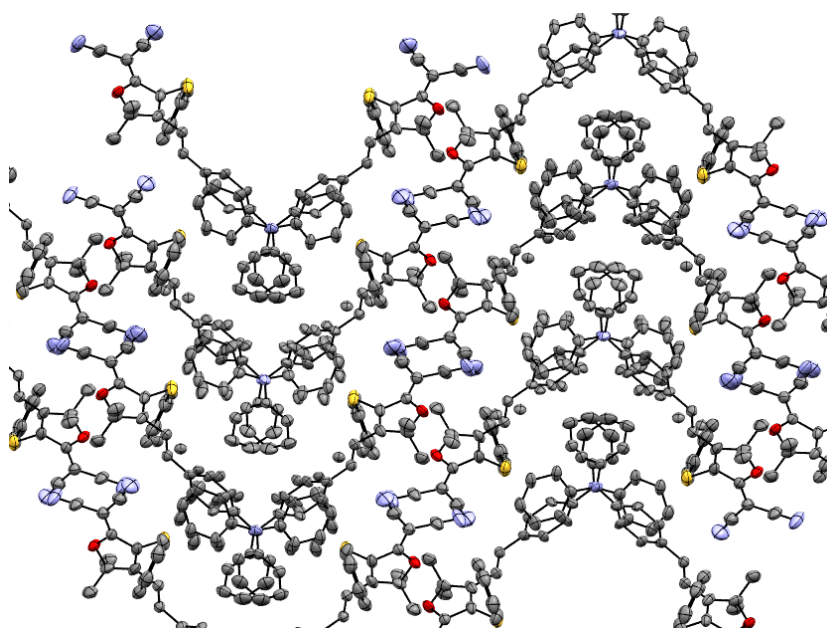


Figure II-42. Arrangement intermoléculaire de **Ph3NSPh** selon l'axe cristallographique *a*.
Pour plus de clarté, les atomes d'hydrogènes ne sont pas représentés.

- **Ph₃NSO₂Ph**

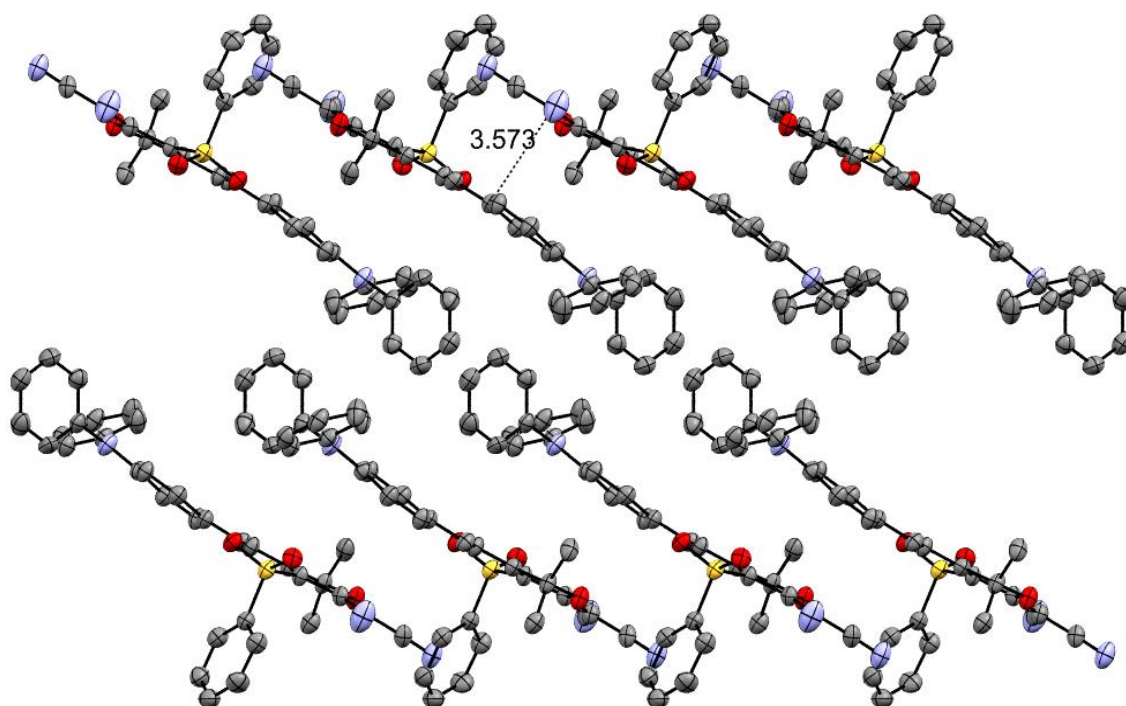


Figure II-43. Arrangement intermoléculaire de **Ph₃NSO₂Ph** selon l'axe *b*.
Pour plus de clarté, les atomes d'hydrogènes ne sont pas représentés.

A l'état solide, l'angle entre le phényle du groupe sulfonyle de **Ph₃NSO₂Ph** et le plan de l'accepteur est de 83°. Selon l'axe cristallographique *b*, les chromophores sont disposés en feuillets séparés par 3,6 Å (Figure II-43). Entre deux feuillets, les fluorophores ne sont pas parallèles : l'axe d'un chromophore forme un angle de 61° avec celui des chromophores des feuillets au-dessous ou au-dessus. Au sein d'un feuillet, les chromophores sont côte à côte séparés d'une distance de 4 Å et avec un angle de décalage de 67° (Figure II-44).

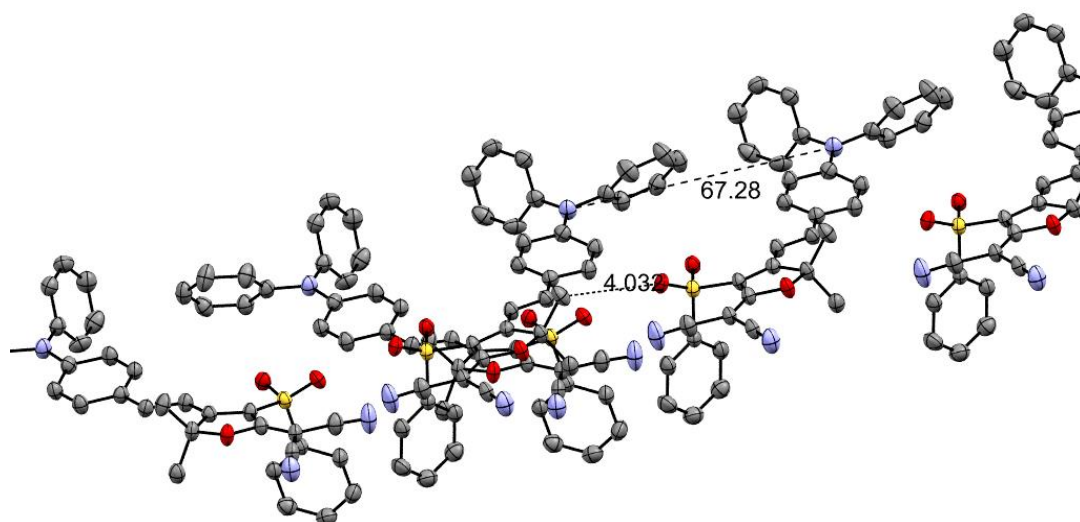


Figure II-44. Représentation de certains chromophores de deux feuillets adjacents de **Ph₃NSO₂Ph**, de la distance inter-chromophores et de l'angle de glissement au sein d'un feuillet. Pour plus de clarté, les atomes d'hydrogènes ne sont pas représentés.

Le faible recouvrement des systèmes π dans les cristaux de **Ph3NSO2Ph** explique difficilement la faible fluorescence de la poudre de ce composé. Il est possible que l'arrangement DRX soit différent de l'arrangement dans la poudre obtenue. Il serait intéressant de mesurer la diffraction des rayons X par la poudre de **Ph3NSO2Ph** et de comparer les pics de diffractions.

- **Ph2NFSPh**

Le phényle de l'accepteur de **Ph2NFSPh** forme un angle de 129° avec le plan de l'accepteur. Contrairement aux composés basés sur **Ph3N**, le doublet non liant de l'azote de **Ph2NFSPh** et **Ph2NFSO2Ph** n'est pas orthogonal au plan du chromophore à cause d'une torsion de la *N,N*-diphénylamine. Dans le cas de **Ph2NFSPh**, l'angle entre le doublet non liant et la perpendiculaire du système π est de 49° . Pour **Ph2NFSO2Ph** cet angle est de 58° . De plus, ces deux chromophores possèdent un léger angle de torsion entre le plan du fluorène et le plan contenant la double liaison et l'accepteur, de 3° pour **Ph2NFSPh** et de 19° pour **Ph2NFSO2Ph**.

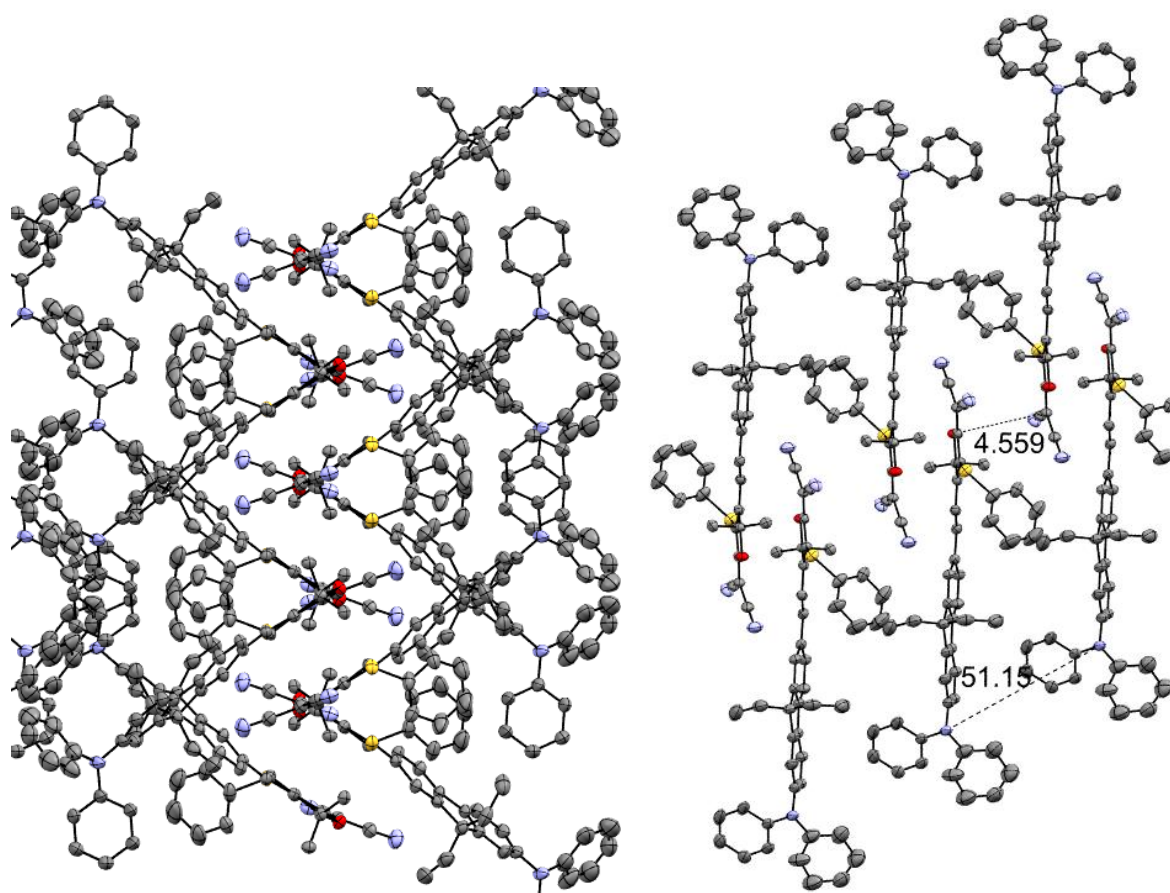


Figure II-45. Gauche : arrangement intermoléculaire de **Ph2NFSPh** selon l'axe *c* montrant la présence de chevrons. Droite : arrangement en mur de brique, distance intermoléculaire et angle de glissement entre chromophores. Pour plus de clarté, les atomes d'hydrogènes ne sont pas représentés.

Selon l'axe cristallographique *c*, l'arrangement intermoléculaire de **Ph2NFSPh** est composé de doubles lignes brisées qui forment des chevrons avec des coins d'angle de 62° (Figure II-45, gauche). Dans une autre direction, un arrangement en mur de brique peut être distingué avec des chromophores alternés de manière tête bêche. La distance inter-chromophore varie entre les deux côtés : $4,8 \text{ \AA}$ du côté du phényle

de l'accepteur et 3,8 Å sur le côté moins encombré. L'angle de décalage entre deux chromophores orientés dans le même sens est de 51° (Figure II-45, droite).

Ainsi, sur cet arrangement en mur de brique, nous pouvons constater l'intérêt du phényle hors du plan du chromophore qui permet d'augmenter la distance entre chromophores voisins d'un angström ainsi que d'empêcher un recouvrement important, puisque seuls les accepteurs se recouvrent dans cette structure. Seulement, à cause de la géométrie de notre accepteur, seul l'un des côtés est encombré. La courte distance intermoléculaire de 3,8 Å ne semble pas gêner la fluorescence à l'état solide puisque Ph2NFSPh possède un rendement quantique de 28 %, excellent pour ces longueurs d'onde.

- **Ph2NFSO2Ph**

Dans les cristaux de **Ph2NFSO2Ph**, Le phényle de l'accepteur forme un angle de 80° avec le plan de l'accepteur. Une maille est constituée de deux molécules tête-bêche, séparées par 4,1 Å et formant un dimère H avec un léger glissement dans la direction de l'axe principal des chromophores. La répétition du de dimère forme un motif d'escalier selon l'axe cristallographique *a*. La présence de ce dimère H peut expliquer la faible fluorescence de la poudre de ce chromophore.

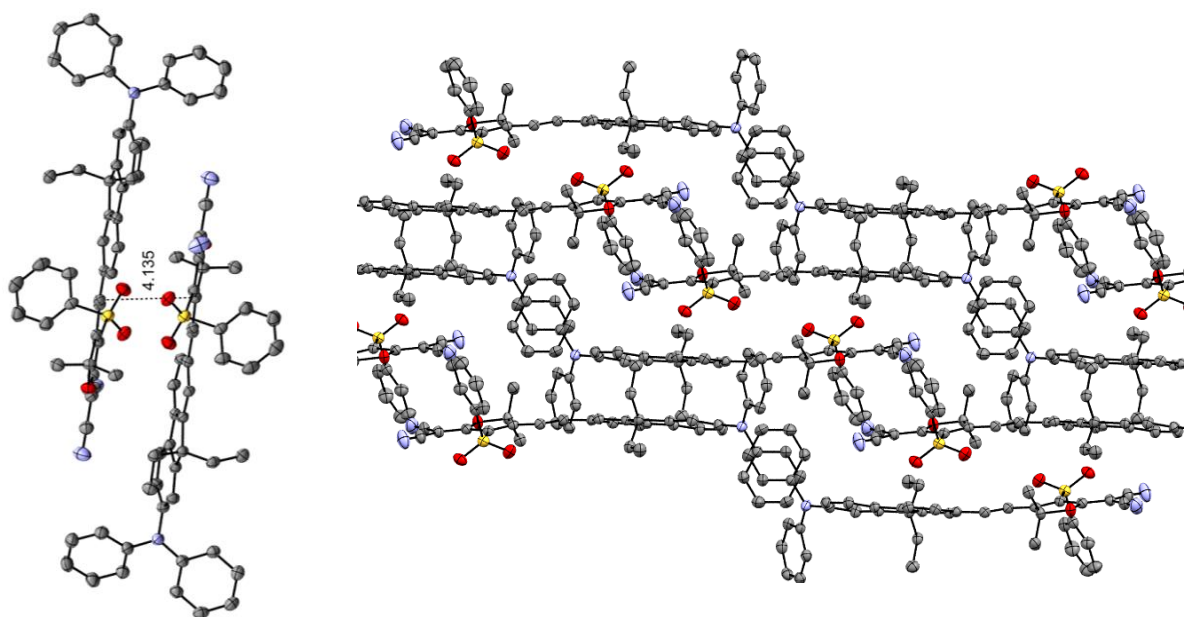


Figure II-46. Gauche : Arrangement intermoléculaire de **Ph2NFSO2Ph** au sein d'une maille.

Droite : Arrangement en escalier de **Ph2NFSO2Ph** selon l'axe *a*.

Pour plus de clarté, les atomes d'hydrogènes ne sont pas représentés.

c) Extension de la famille

Nous venons de présenter les propriétés optiques à l'état solide de divers chromophores basés sur un accepteur **SPh** et **SO2Ph**. Cependant, nous n'avons pas encore comparé leurs propriétés avec celles des homologues avec les accepteurs modèles : **A2** et **TCF**. La plupart des chromophores équivalents avec un accepteur **TCF**, ainsi que quelques-uns des chromophores équivalents basés sur **A2** ont été synthétisés et

étudiés précédemment par notre groupe.^[103–105] Afin de pouvoir comparer l'ensemble des composés, nous avons synthétisé les maillons manquants avec les accepteurs **A2** et **TCF**.

De plus, nous avons aussi rajouté deux derniers donneurs : **Cbz** qui correspond au 4-(carbazol-9-yl)-benzaldéhyde, afin de le comparer avec **CbzOMe** et **tBuCbz**, ainsi que le 4,4'-(phénylzanediyl)dibenzaldéhyde afin de réaliser le un quadrupôle A- π -D- π -A, **PhNSPh2**. Ces deux derniers donneurs ont été testés uniquement avec l'accepteur **SPh** pour le quadrupôle et avec les accepteurs **SPh** et **A2** pour le carbazole.

Les structures ainsi que les rendements de la réaction de Knoevenagel finale sont donnés dans la Figure II-47.

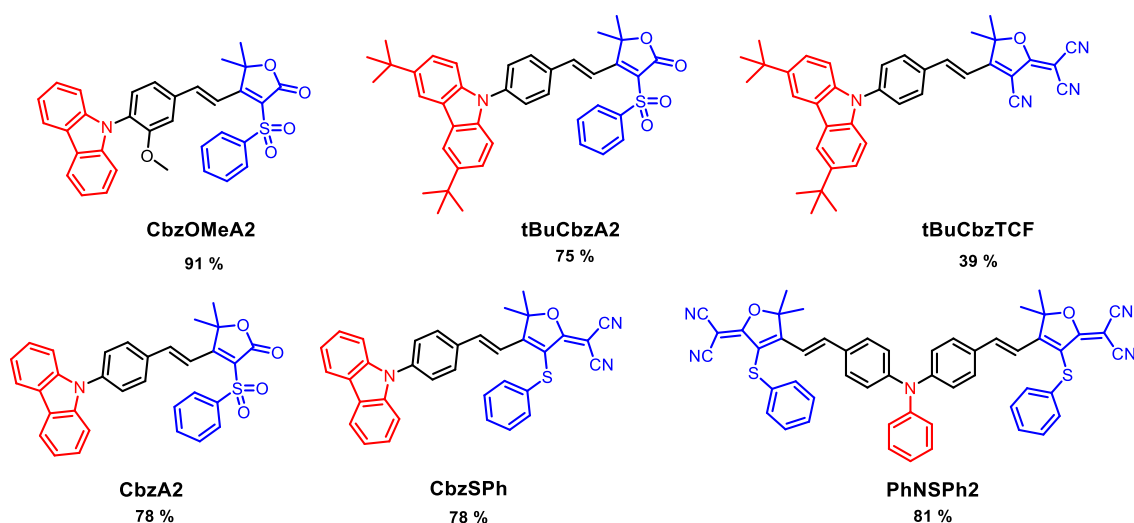


Figure II-47. Structures et rendements de synthèse des nouveaux chromophores.

Nous avons mesuré la fluorescence ainsi que les rendements quantiques à l'état solide de ces nouveaux fluorophores. Les courbes de fluorescence sont reportées dans la Figure II-48.

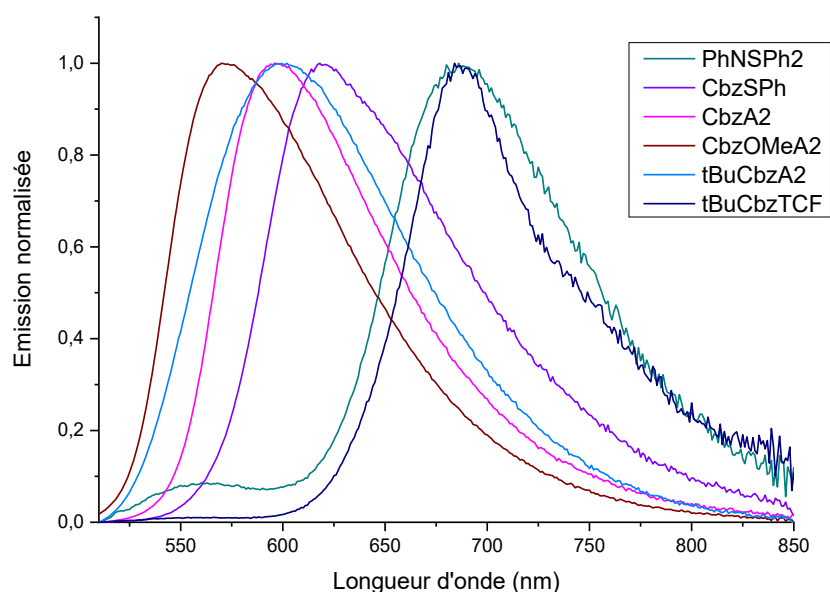


Figure II-48. Spectres normalisés de fluorescence en poudre des nouveaux composés synthétisés.

Ces six nouveaux chromophores possèdent une émission en poudre entre 570 nm et 685 nm. Les composés basés sur l'accepteur **A2** sont les plus fluorescents avec des rendements quantiques de 35 % à 570 nm (**CbzOMeA2**), 14 % à 595 nm (**CbzA2**) et 35 % à 595 nm (**tBuCbzA2**). **CbzSPh** possède un rendement quantique de 9 % à 620 nm. Enfin, les deux derniers fluorophores **tBuCbzTCF** et **PhNSPh2** sont faiblement fluorescents à 685 nm avec des rendements respectifs de 3 et 4 %.

La bande d'émission à 550 nm sur le spectre du quadrupôle **PhNSPh2** est la fluorescence résiduelle de la sphère d'intégration, visible à cause de la faible fluorescence du composé.

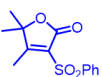
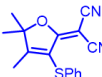
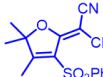
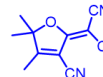
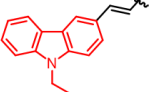
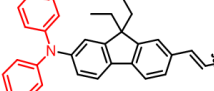
									
		A2		SPh		SO2Ph		TCF	
		λ_{em} (nm)	QY (%)	λ_{em} (nm)	QY (%)	λ_{em} (nm)	QY (%)	λ_{em} (nm)	QY (%)
	EtCbz	598 ^a	33 ^a	635	24	670	9	768 ^a	4 ^a
	Cbz	595	14	620	9	-	-	735 ^a	11 ^a
	CbzOMe	570	35	640	46	664	9	662 ^a	18 ^a
	tBuCbz	595	35	660	29	710	8	685	3
	PhN	-	-	685	4	-	-	-	-
	Ph3N	635	34	690	15	690	3	750	< 1
	Ph2NF	646 ^a	8 ^a	700	28	820	1	788 ^a	< 1 ^a

Tableau II-9. Comparaison des propriétés optiques à l'état solide des fluorophores basés sur les accepteurs **A2**, **SPh**, **SO2Ph** et **TCF** (a = donnée tirée d'une des thèses précédentes du laboratoire).^[103-105]

Maintenant que nous avons étudié la fluorescence à l'état solide de tous nos fluorophores, nous pouvons comparer leurs propriétés. Le Tableau II-9 résume le maximum d'émission et le rendement quantique à l'état solide des fluorophores synthétisés dans le cadre de cette thèse, ainsi que ceux synthétisés précédemment (possédant un « a » en exposant). Néanmoins, il ne faut pas oublier que la comparaison entre les nouveaux fluorophores et les anciens n'est pas parfaite puisque la forme cristalline ou amorphe peut varier en fonction de la méthode de purification.

Les colorants contenant les deux nouveaux groupes accepteurs possèdent globalement des propriétés intermédiaires entre **A2** et **TCF**. En effet, à donneur identique, la modification de l'accepteur dans le sens **A2** => **SPh** => **SO2Ph** => **TCF** induit souvent un décalage bathochrome de l'émission mais aussi une chute de rendement quantique, c'est par exemple le cas pour les séries **EtCbz** et **Ph3N**. Certains colorants TCF possèdent tout de même une forte fluorescence dans le proche infrarouge. C'est notamment le cas de **EtCbzTCF**, **CbzTCF** et **CbzOMeTCF**. A l'inverse, certains fluorophores basés sur **SO2Ph** possèdent une fluorescence plus lointaine que celles de leur homologue **TCF** : **Ph2NFSO2Ph**, **tBuCbzSO2Ph** et, dans une moindre mesure, **CbzOMeSO2Ph**. La force électroacceptrice de ces deux accepteurs étant

sensiblement la même, les différences de longueur d'onde d'émission proviennent essentiellement de l'assemblage et des interactions intermoléculaires. Enfin, de l'autre côté du tableau, Une augmentation du rendement quantique entre **A2** et **SPh** est observée au sein de deux familles : **CbzOMe** et **Ph2NF**.

A accepteur identique, dans le cas de **SPh**, le passage du dipôle **Ph3NSPh** au quadrupôle **PhNSPh2** entraîne une baisse du rendement quantique de fluorescence et un léger décalage hypsochrome, similairement à ce que nous avons observé précédemment.^[103] Entre les différents carbazoles, l'ajout d'un groupement méthoxy sur le phényle du pont conjugué ou l'ajout de groupements *tert*-butyles permet d'améliorer grandement le rendement quantique à l'état solide, sauf pour **tBuCbzTCF**, peu fluorescent.

Pour le donneur **CbzOMe**, cela peut être expliqué par la position du groupement carbazole à l'état solide. En effet, nous avons obtenu la structure DRX du **CbzOMeA2** et il y est flagrant que la gêne stérique entre le groupement méthoxy et les hydrogènes aromatiques en ortho ne permet pas la planéité du donneur (Figure II-49). Le carbazole forme donc un angle de 66° avec le phényle du système π . Cette torsion est probablement similaire dans les autres fluorophores basés sur ce donneur. Ce carbazole encombrant empêche des interactions d'empilement π , au prix d'une conjugaison diminuée.

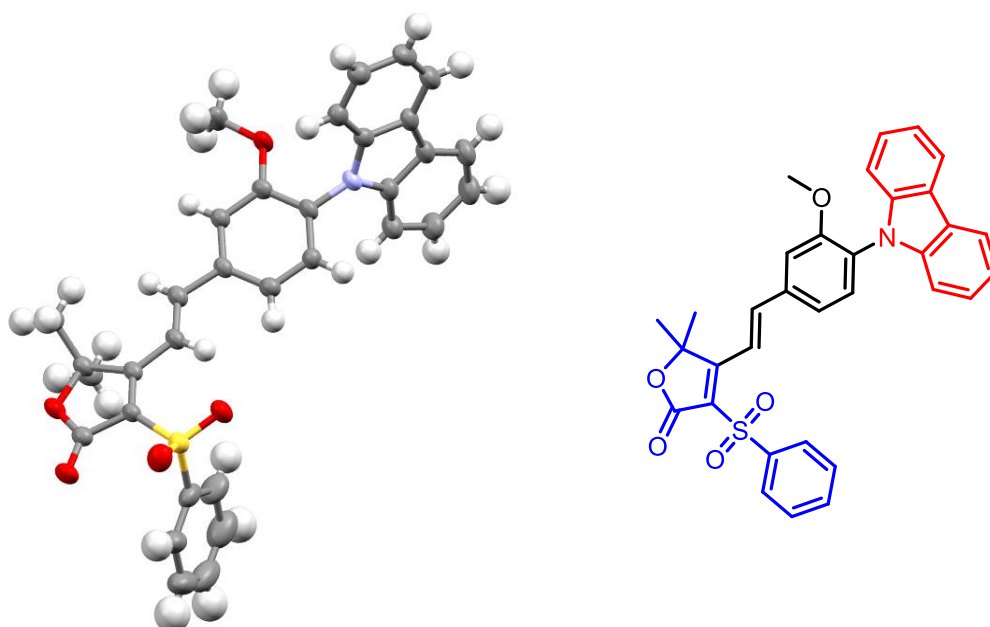


Figure II-49. Structure DRX de **CbzOMeA2**.

4. Et le sulfoxyde ?

a) Synthèse de chromophores avec un sulfoxyde

Comme nous l'avons expliqué lors de la synthèse de ces nouveaux accepteurs, l'oxydation du thioéther en sulfoxyde, puis sulfone, par du *m*CPBA peut être facilement suivie par le déplacement chimique du méthyle exocyclique par ^1H RMN entre 2,05 ppm et 2,6 ppm (Figure II-50).

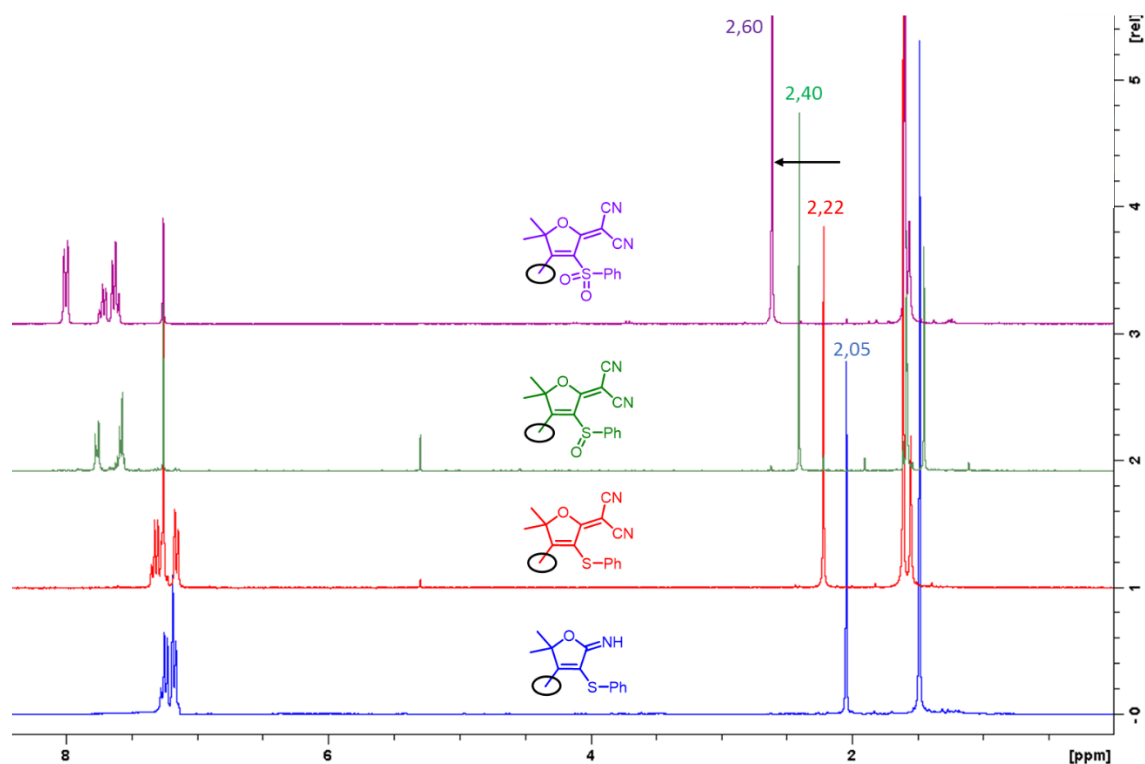


Figure II-50. RMN ^1H des accepteurs dans CDCl_3 .

Cependant, ces groupements fortement électroaccepteurs sont loin d'être stables sur silice. Cela ne pose pas de problème pour **SPh** qui possède une stabilité suffisante pour être purifié par colonne de chromatographie ou pour **SO2Ph** sur lequel nous avons trouvé une voie de purification alternative : précipitation sélective avec du pentane suivi d'un lavage à l'éthanol. Cependant, lors de l'oxydation en sulfoxyde, il reste toujours des traces de thioéther et de sulfone en plus des restes de mCPBA et de l'acide correspondant. Les restes de l'agent oxydant peuvent être complètement éliminés par un lavage avec Na_2CO_3 . Cependant, des tentatives de recristallisation dans de l'acétate d'éthyle ou dans de l'éthanol n'ont pas permis d'isoler le sulfoxyde et une tentative de chromatographie rapide sur gel de silice a complètement dégradé le produit (Figure II-51).

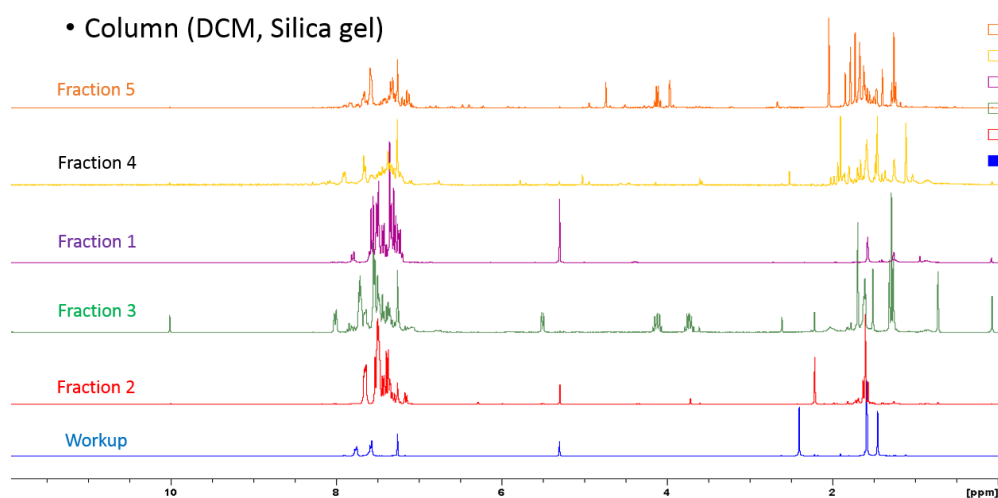


Figure II-51. RMN ^1H dans CDCl_3 des différentes fractions de la colonne de chromatographie pour purifier **SOPh**.

Afin de contourner ce problème de purification, nous avons essayé la réaction de Knoevenagel entre **Ph3N** ou **Ph2NF** et le mélange après lavage, contenant plus de 90 % de sulfoxyde (Schéma II-16). Malheureusement, le sulfoxyde s'est avéré peu réactif et nous n'avons pas réussi à isoler de chromophore par cette méthode.

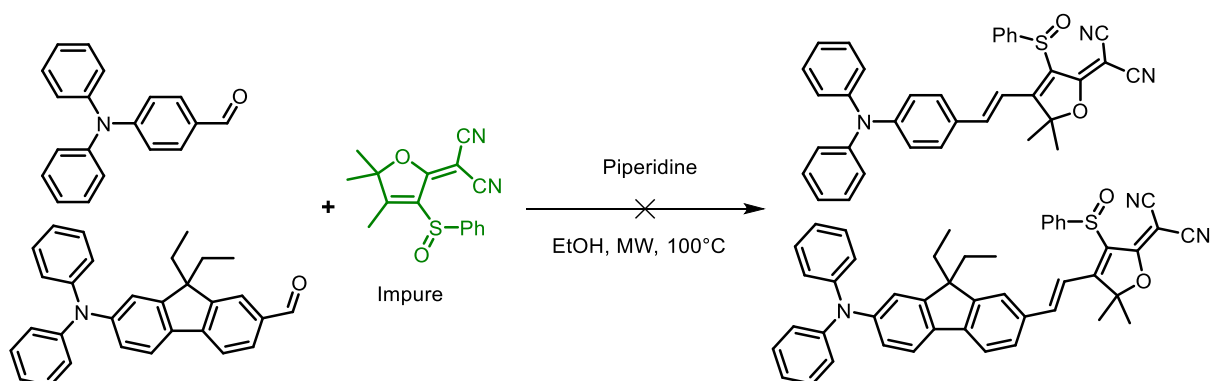


Schéma II-16 Essai de réaction de Knoevenagel entre deux aldéhydes et le brut impure de **SOPh**.

L'autre solution pour obtenir des chromophores présentant un groupement sulfoxyde consiste à oxyder directement le chromophore **SPh**. Cependant, cette méthode est fastidieuse car elle doit être effectuée sur chaque chromophore. C'est pourquoi nous avons choisi d'oxyder uniquement deux de nos chromophores les plus intéressants **Ph3NSPh** et **Ph2NFSPh**.

L'oxydation est effectuée dans le DCM avec environ un équivalent de mCPBA. Encore une fois, cette réaction est très rapide et se fait en moins d'une dizaine de minutes. Une fois que le thioéther a complètement disparu, le DCM est évaporé et le brut est filtré au travers d'une courte colonne de silice afin d'éliminer les traces d'oxydants. Cette méthode a été choisie par rapport au lavage avec Na_2CO_3 car les fluorophores issus de condensation de Knoevenagel sont généralement instables en conditions basiques. Enfin, la fraction contenant le fluorophore est recristallisée afin d'obtenir le chromophore **SOPh** avec les excellents rendements de 74 % pour **Ph3NSOPh** et 72 % pour **Ph2NFSOPh**. Les sulfoxydes sont obtenus sous la forme de mélanges racémiques que nous n'avons pas cherché à séparer.

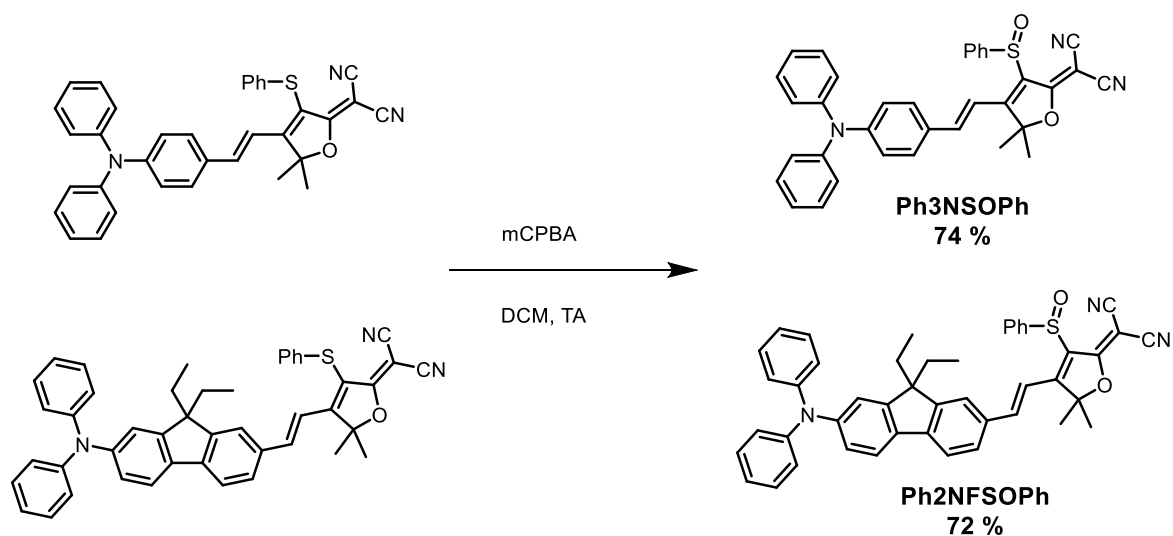


Schéma II-17. Synthèse des chromophores avec un sulfoxyde par oxydation du thioéther.

Il est intéressant de noter que, contrairement au thioéther et à la sulfone, les deux méthyles en position 5 du cycle 2,5-dihydrofurane de l'accepteur **SOPh** se comportent indépendamment en RMN à la fois dans l'accepteur (Figure II-51, RMN bleue) et dans les chromophores (**Ph3NSOPh** dans la Figure II-52, RMN verte). Ainsi, le singulet intégrant pour 6 H se transforme en deux singulets intégrant chacun pour 3. Cela provient du fait que, dans les sulfoxydes, les deux faces du cycle 2,5-dihydrofurane sont toujours différentes à cause de la chiralité du soufre. Chaque méthyle voit constamment un élément différent (oxygène, doublet non-liant du soufre ou phényle) de l'autre côté du cycle.

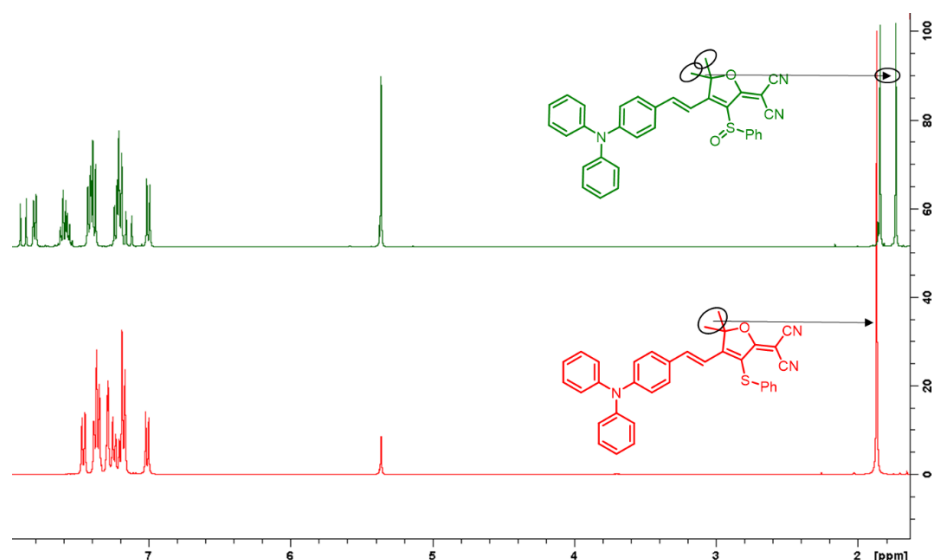


Figure II-52. RMN ^1H de **Ph3NSPh** (rouge) et de **Ph3NSOPh** (verte) dans CD_2Cl_2 .

En conclusion, par oxydation des chromophores **SPh** nous avons pu obtenir les équivalents possédant un sulfoxyde à la place du thioéther pour deux donneurs : **Ph3N** et **Ph2NF**.

b) Propriétés optiques des sulfoxydes

Contrairement aux chromophores précédents, les poudres des sulfoxydes ne sont absolument pas fluorescentes. De même, l'étude des propriétés optiques dans des mélanges acétone/eau démontre une perte de la fluorescence lors de l'agrégation pour **Ph3NSOPh** et **Ph2NFSOPh**. Ainsi, soit le groupement sulfoxyde possède un mécanisme de désexcitation non-radiative particulier, soit l'arrangement solide des sulfoxydes est sensiblement différent des arrangements des chromophores avec un thioéther ou une sulfone. Cependant nous n'avons pas encore réussi à obtenir de cristaux de ces deux composés pour voir si cela pouvait provenir d'un arrangement H. Afin de comprendre cette extinction de fluorescence solide lors de l'oxydation du thioéther au sulfoxyde, il pourrait être intéressant d'effectuer des calculs théoriques pour comprendre les voies de désexcitation à l'état solide.

Afin d'investiguer les propriétés optiques en solution des sulfoxydes, nous avons étudié leur solvatochromisme dans les sept solvants précédemment considérés. Tout comme les autres fluorophores issus des donneurs **Ph3N** et **Ph2NF**, les sulfoxydes présentent une fluorescence respectivement bonne et excellente dans les solvants de polarité intermédiaire. Ainsi, des rendements quantiques ont été mesurés dans le chloroforme à 15 % à 706 nm pour **Ph3NSOPh** et de 35 % à 775 nm pour **Ph2NFSOPh**.

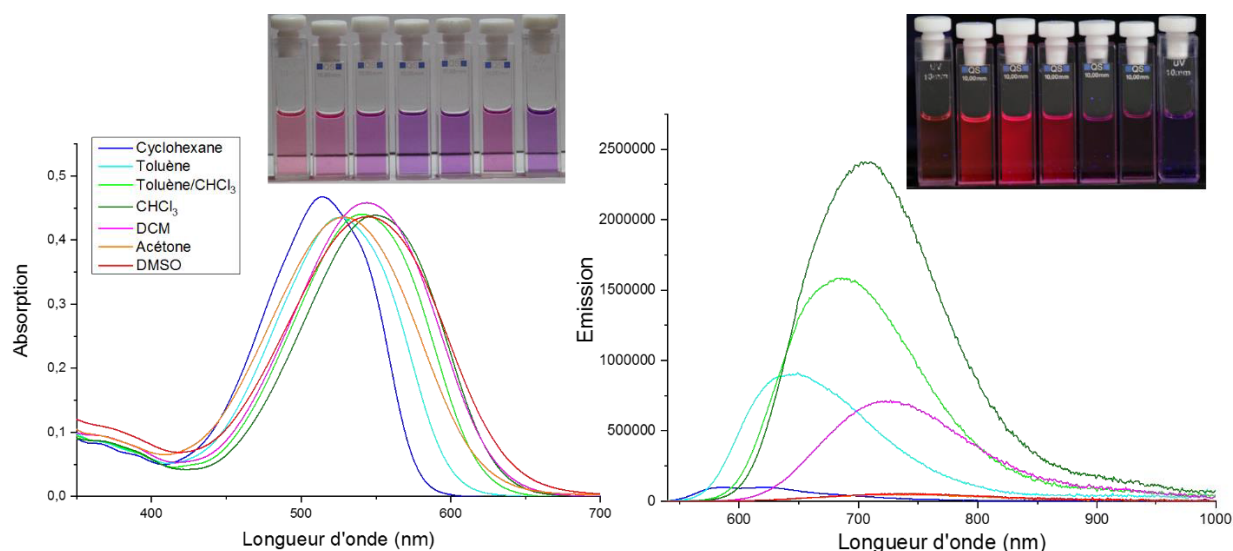


Figure II-53. Solvatochromisme d'absorption (gauche) et d'émission (droite) de **Ph3NSOPh**.

Pour **Ph3NSOPh**, l'augmentation de la polarité depuis le cyclohexane jusqu'au chloroforme entraîne un décalage bathochrome de l'absorption de 35 nm, puis un léger décalage hypsochrome est observé pour les solvants plus polaires (Figure II-53). La fluorescence maximale est atteinte dans le chloroforme. Comme pour **Ph3NSPh** et **Ph3NSO2Ph**, un effet plus important est observé en émission avec un décalage d'environ 150 nm entre le maximum de fluorescence en milieu apolaire et en milieu polaire.

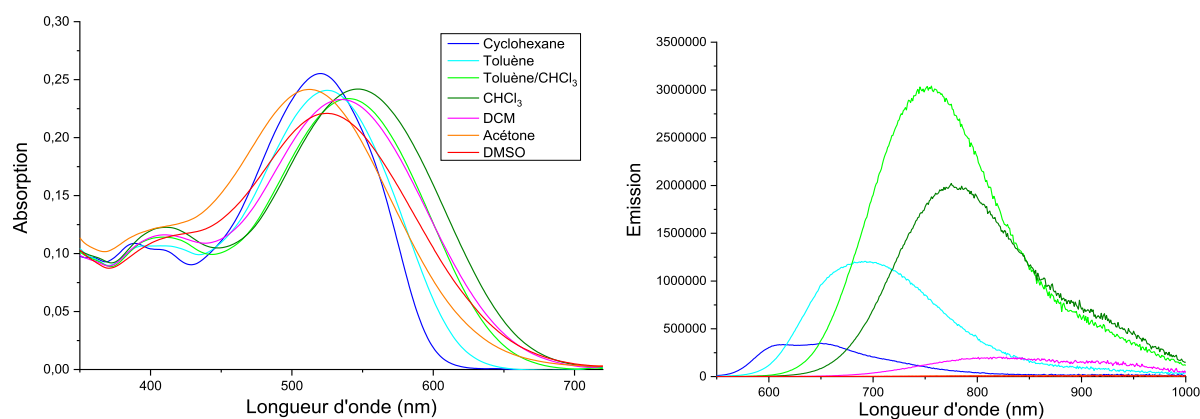


Figure II-54. Solvatochromisme d'absorption (gauche) et d'émission (droite) de **Ph2NFSOPh**.

L'absorption de **Ph2NFSOPh** varie similairement à celle de **Ph3NSOPh** avec la polarité. La fluorescence maximale de ce fluorophore est atteinte dans le mélange équimolaire de toluène et de chloroforme à 753 nm (Figure II-54). Enfin, comme les autres fluorènes, ce fluorophore est très solvatochromique en émission avec une variation de 170 nm entre le cyclohexane et le dichlorométhane. La fluorescence est complètement éteinte en milieu très polaire (acétone et DMSO).

Les propriétés optiques dans chaque solvant des deux sulfoxydes sont résumées dans le Tableau II-10. Encore une fois, des rendements indicatifs, calculés à partir du rendement dans le chloroforme, sont donnés dans le Tableau II-10. **Ph2NFSOPh** est particulièrement intéressant avec un rendement quantique maximal de 50 % dans le mélange équi-volumique de toluène et chloroforme.

Solvant	Ph3NOPh				Ph2NFSOPh			
	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	QY (%)	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	QY (%)
Cyclohexane	514	585	2361	0,5	520	650	3846	5
Toluène	525	645	3544	5	525	692	4597	20
Toluène/CHCl3	540	686	3941	10	540	753	5238	51
CHCl3	550	706	4018	15	547	777	5412	35
DCM	544	725	4589	5	535	821	6511	5
Acétone	529	737	5335	< 0,1	512	-	-	< 0,1
DMSO	544	737	4814	< 0,1	525	-	-	< 0,1

Tableau II-10. Longueur d'onde d'absorption (λ_{abs}), d'émission (λ_{em}), déplacement de Stokes ($\Delta\nu$) et rendement quantique relatif (QY) de **Ph3NSOPh** et de **Ph2NFSOPh** dans les sept solvants étudiés.

c) Comparaison entre les accepteurs

A donneur identique, nous avons maintenant une série de cinq accepteurs basés sur le cycle 2,5-dihydrofurane : **A2**, **SPh**, **SOPh**, **SO2Ph** et **TCF**. Nous pouvons donc comparer leur force électroacceptrice, ainsi que les propriétés optiques en solution des fluorophores basés sur la **Ph3N** ou sur le **Ph2NF**. La comparaison de la fluorescence à l'état solide se limite à celle donnée dans le Chapitre II.B.3.c) puisque les sulfoxydes ne présentent aucune fluorescence à l'état solide.

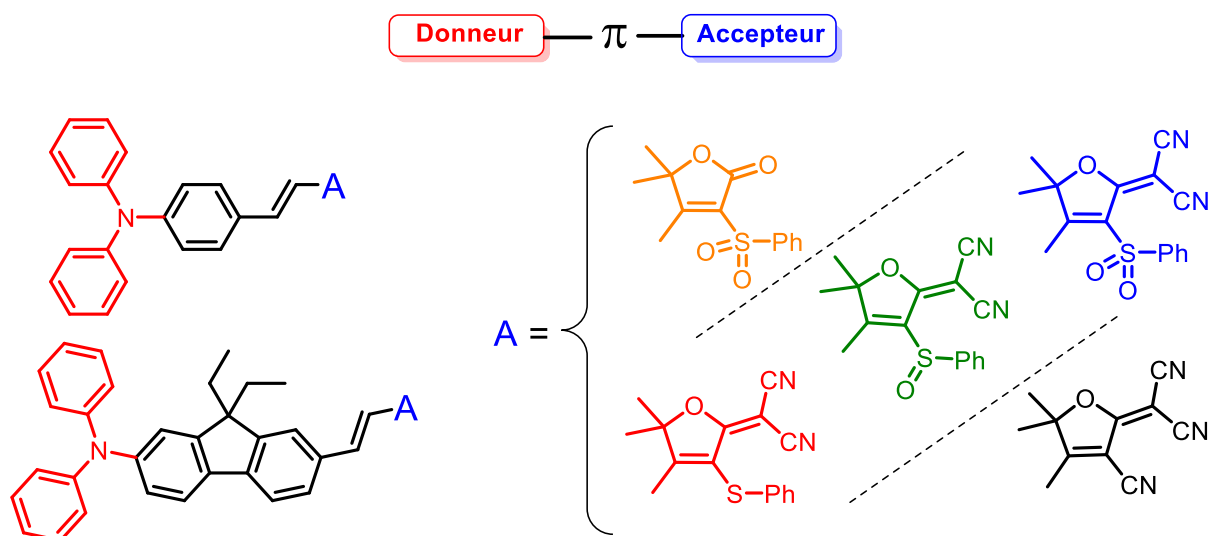


Figure II-55. Les deux séries de chromophores qui seront comparées.

Les spectres normalisés d'absorption et d'émission de la série **Ph3N** en solution à 10 μ M dans du chloroforme sont représentés dans la Figure II-56. Pour tous les accepteurs, la forme de la bande d'absorption principale et de la bande d'émission restent globalement identiques. Sans aucune surprise, l'augmentation de la force de l'accepteur se fait avec une translation vers les plus hautes longueurs d'onde des bandes d'absorption et d'émission. Ainsi, dans l'ordre **A2** < **SPh** < **SOPh** < **SO2Ph** $\approx$ **TCF**, l'absorption augmente de 480 nm $\Rightarrow$ 505 nm $\Rightarrow$ 550 nm $\Rightarrow$ 567 nm $\Rightarrow$ 572 nm et l'émission de 630 nm $\Rightarrow$ 650 nm $\Rightarrow$ 697 nm $\Rightarrow$ 708 nm $\Rightarrow$ 706 nm.

Au vu des paramètres de Hammett σ_p (0,07 pour **SPh**; 0,4 pour **SOPh**; 0,68 pour **SO2Ph**; 0,66 pour **TCF**) et du déblindage du méthyle exocyclique en ^1H RMN (2,22 pour **SPh**; 2,4 pour **SOPh** et 2,6 pour **SO2Ph**, Figure II-50), nous pouvions nous attendre à une force électroacceptrice du sulfoxyde intermédiaire entre le thioéther et la sulfone. En réalité, les propriétés optiques du sulfoxyde sont très proches de ceux de la sulfone, notamment en émission.

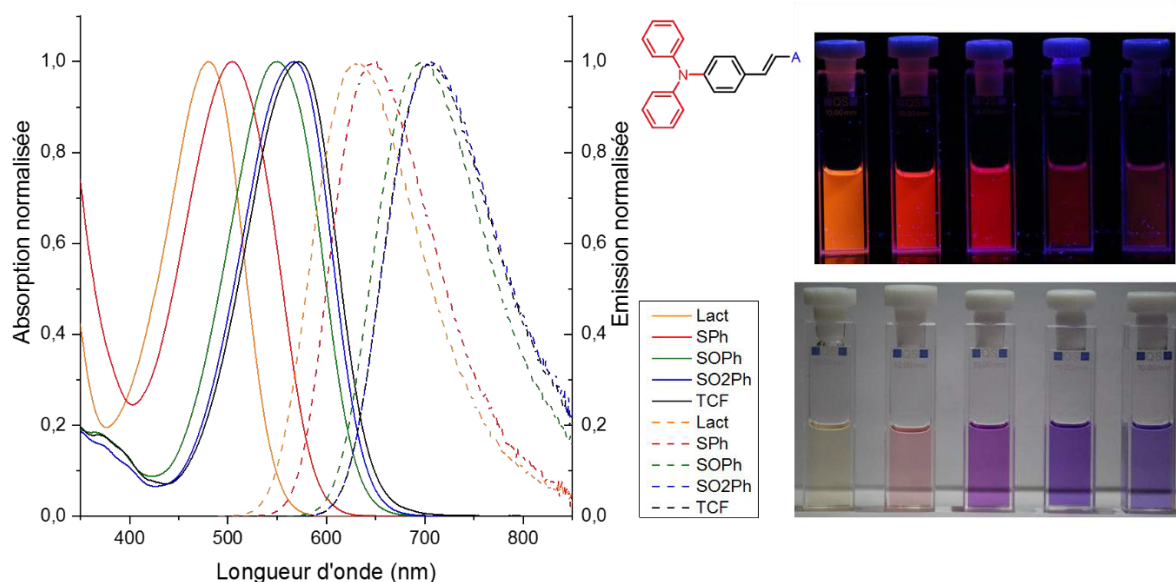


Figure II-56. Spectres normalisés d'absorption et d'émission des chromophores de la série **Ph3N** en solution à 10 μM dans CHCl_3 et les photographies des cuvettes sous lumière UV (365 nm) et sous lumière visible.

Maintenant que nous avons vu l'influence de l'accepteur sur la position de la bande d'absorption et d'émission, nous pouvons nous demander quelle influence aura l'accepteur sur l'intensité de l'absorption et de l'émission.

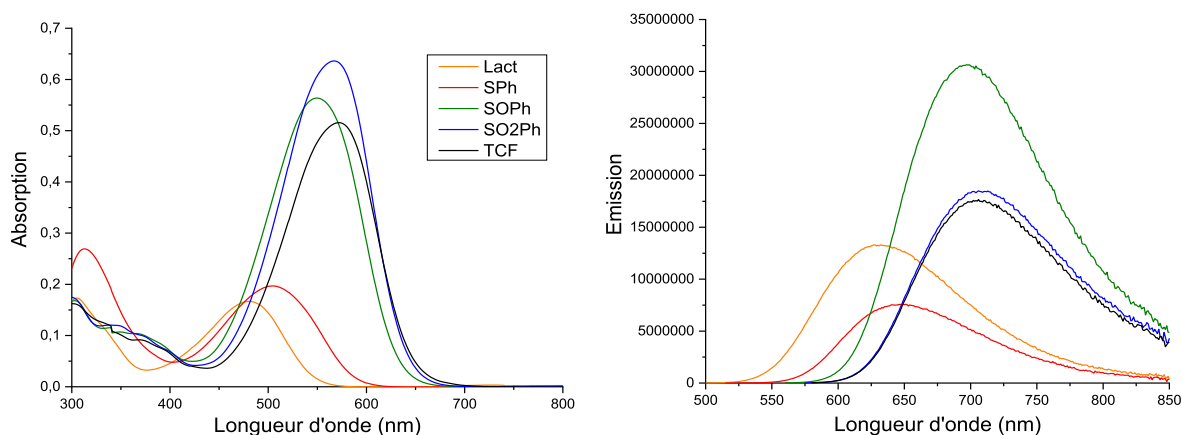


Figure II-57. Spectres d'absorption et d'émission des chromophores de la série **Ph3N** en solution à 10 μM dans CHCl_3 (excitation au maximum d'absorption).

La Figure II-57 représente l'absorption et l'émission des solutions à 10 μM dans le chloroforme des fluorophores basés sur une triphénylamine. Les fluorophores sont excités à leur maximum d'absorption. L'augmentation de force de l'accepteur entraîne une forte augmentation de la probabilité de transition. Ainsi les coefficients d'absorption passent de moins de 20 000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ pour **A2** et **SPh** à plus de

50 000 M⁻¹cm⁻¹ pour **SOPh**, **SO2Ph** et **TCF**. Concernant la fluorescence, lorsque les chromophores sont excités à leur maximum d'absorption, la forte émission du sulfoxyde se démarque instantanément. Les accepteurs **SO2Ph** et **TCF** possèdent une fluorescence très proche, en termes de maximum d'émission et de brillance.

La même tendance est observée pour la famille basée sur **Ph2NF**. L'augmentation de la force de l'accepteur entraîne un décalage bathochrome des propriétés optiques ainsi qu'une augmentation du coefficient d'absorption molaire (Figure II-58). L'augmentation de l'absorption est cependant moins marquée que dans le cas précédent. Lorsque les fluorophores sont excités dans leur maximum d'absorption, on observe un décalage bathochrome et une décroissance de la fluorescence avec l'augmentation du transfert de charge. Pour cette famille, les plus fortes brillances sont obtenues avec les accepteurs **A2** et **SPh**.

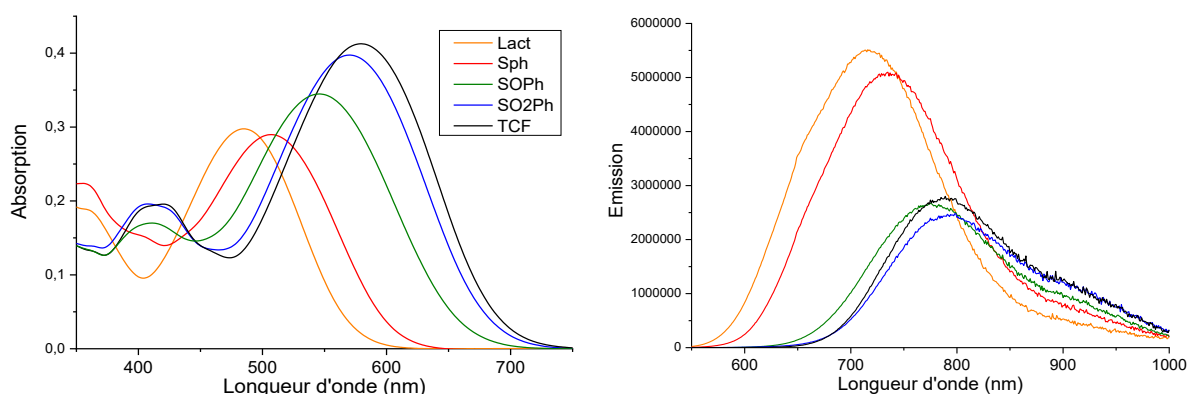


Figure II-58. Spectres d'absorption et d'émission des chromophores de la série **Ph2NF** en solution à 10 μ M dans CHCl_3 (excitation au maximum d'absorption)

Cette fluorescence des sulfoxydes est tout de même étonnante puisque plusieurs articles présentent des arylsulfoxydes dont la faible fluorescence est attribuée à la photoracémisation du sulfoxyde voire, dans certains cas, à une coupure homolytique photocatalysée de la liaison S-C.^[280–283] Néanmoins, nous ne sommes pas les seuls à avoir des sulfoxydes fluorescents. Monçalves *et al.* ont publié des fluorophores à transfert de charge entre une triphénylamine ou un pyrène et des groupements thioéther, sulfoxyde et sulfone vinyliques.^[284] Similairement à nos résultats, tous leurs composés, y compris les sulfoxydes, possédaient des rendements quantiques entre 15 et 45 % dans le dichlorométhane.

En conclusion, les fluorophores sulfoxydes que nous avons synthétisés possèdent d'excellentes propriétés d'émission en solution par rapport aux autres chromophores de la même famille. C'est notamment le cas avec le donneur **Ph3N** où l'oxydation du thioéther en sulfoxyde se traduit par une multiplication par six de la brillance dans le chloroforme qui passe de 1290 à 7710 M⁻¹cm⁻¹. Ainsi, même si l'absorption et l'émission ne se décalent pas assez pour pouvoir discriminer totalement les deux fluorophores, cette augmentation de la brillance pourrait permettre de concevoir une sonde détectant un agent oxydant capable d'oxyder le thioéther. Il nous faudrait vérifier quel agent oxydant autre que le *m*CPBA permet d'effectuer rapidement la réaction d'oxydation du thioéther.

5. Bilan

Dans cette partie, nous avons isolé deux nouveaux groupements accepteurs basés sur un cycle 2,5-dihydrofurane. Ces accepteurs possèdent un cycle phényle hors de leur plan afin d'espacer les chromophores à l'état solide. A partir de ces groupements accepteurs, nous avons synthétisé plusieurs colorants présentant des fluorescences remarquables en solution. Dans le chloroforme, ces chromophores couvrent une large gamme d'absorption du visible, entre 400 nm et 620 nm. Les maxima d'émission sont compris entre 580 nm et 810 nm avec plusieurs chromophores dans la fenêtre biologique. En particulier, les deux composés basés sur un pont fluorényle sont fortement fluorescents avec des rendements de 37 % à 700 nm et de 30 % à 810 nm. Plusieurs chromophores présentent de forts solvatochromismes en émission avec plus de 200 nm de variation entre leur fluorescence dans le cyclohexane et celle dans le DMSO.

La plupart de ces fluorophores sont aussi fortement fluorescents à l'état solide, en poudre, avec des maxima entre 635 nm et 830 nm. La majorité des chromophores émettent dans la fenêtre biologique et semblent particulièrement prometteurs pour l'imagerie de fluorescence *in vivo*. En particulier, **tBuCbzSPh** et **Ph2NFSPh** possèdent des rendements quantiques respectifs de 29 % à 660 nm et de 28 % à 700 nm et **Ph2NFSO2Ph** possède une bande de fluorescence centrée à 830 nm avec un rendement estimé vers 1 %. Nous avons obtenu les structures de cinq composés par diffraction des rayons X et avons montré leur tendance à former des chevrons ou en escalier. Cependant, ces groupements accepteurs ne sont pas une condition suffisante pour induire à eux seul des propriétés d'émission à l'état solide. En effet, bien qu'ils permettent d'exalter la fluorescence à l'état solide de chromophores possédant des donneurs sélectionnés pour cela, les chromophores basés sur un donneur plan, la julolidine, se sont révélés très peu émissifs à l'état solide.

Puis, nous avons oxydé les fonctions thioéther des accepteurs de deux chromophores, afin d'obtenir les sulfoxydes. L'augmentation des coefficients d'absorption molaire couplée à l'augmentation des rendements quantiques de fluorescence lors de cette oxydation pourrait permettre la conception d'une sonde à agent oxydant. Bien que nous n'ayons pas observé de photodégradation particulière, il nous faudra étudier la stabilité de la liaison C-S. Enfin, malgré leurs structures semblables aux autres chromophores, ces deux chromophores **SOPh** se sont révélés totalement éteints à l'état solide.

En conclusion, ce projet a permis l'identification de plusieurs colorants prometteurs pour l'imagerie de fluorescence biphotonique *in vivo*. Pour cette application, plusieurs points doivent encore être étudiés. Tout d'abord, des informations sur leur cytotoxicité, avec et sans excitation, restent cruciales pour estimer leur potentiel pour l'imagerie *in vivo*. De plus, il reste à déterminer leur section efficace d'ADP. Nous avons déjà mesuré l'ADP de quatre chromophores (**CbzOMeSPh**, **tBuCbzSPh**, **Ph3NSPh** et **Ph2NFSPh**) par la méthode 2PEF et nous devrions bientôt avoir les résultats finaux. L'imagerie cellulaire biphotonique qui a été effectué avec certains colorants montre que ces chromophores possèdent une section efficace d'ADP non négligeable. Par ailleurs, deux fluorophores (**Ph3NSO2Ph** et **Ph2NFSO2Ph**) possèdent une absorption linéaire centrée sur 550 nm et devraient pouvoir être excités à deux photons dans la deuxième fenêtre biologique. Cependant, à cause de leur fluorescence au-delà de 740 nm, la limite du détecteur du microscope biphotonique à notre disposition, nous n'avons pas encore pu les utiliser pour l'imagerie cellulaire.

Enfin, en plus d'avoir permis la synthèse et la caractérisation de nombreux fluorophores remarquables, ce projet ouvre la voie à de nombreuses possibilités de modification du groupement accepteur grâce au développement d'une méthode efficace de fonctionnalisation des groupements accepteurs 2,5-dihydrofurane. Parmi les prochaines cibles à synthétiser dans le futur, nous pouvons par exemple citer l'utilisation du pentafluorophényl afin d'augmenter la force acceptrice, la substitution du dicyanométhylène par un groupement bis(phénylsulfonyl)méthylène afin d'encombrer les deux côtés du plan du chromophore ou encore le remplacement du soufre par du sélénium afin d'utiliser l'oxydation réversible du sélénium vers le sélénioxyde (Figure II-59).^[285,286]

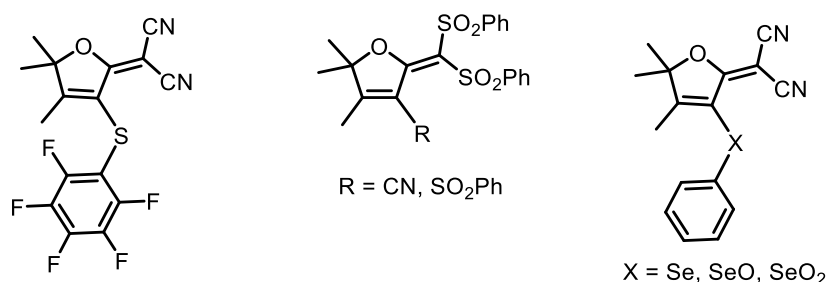


Figure II-59. Propositions d'accepteurs de deuxième génération.

C. Extension du pont conjugué

1. Quelques exemples de ponts conjugués dans la littérature

Comme nous l'avons vu précédemment, les fluorophores les plus performants sont ceux basés sur un pont π conjugué fluorényle. Ces chromophores possèdent de bonnes propriétés à l'état solide mais surtout une excellente fluorescence en solution. Une modification du pont conjugué en un polycycle rigide semble donc être une approche intéressante afin d'améliorer les propriétés optiques, notamment en solution.

Dans la littérature, de nombreux exemples de ponts conjugués étendus ont déjà été proposés. Plusieurs possibilités s'offrent donc à nous, par exemple à partir du fluorène en substituant l'atome de carbone du cycle central par un hétéroélément, comme le silicium ou l'azote qui ont déjà montré d'excellentes propriétés.^[94,96] Une autre solution est de changer complètement de système vers des thiophènes fusionnés qui présentent également des propriétés optiques intéressantes.^[287–289]

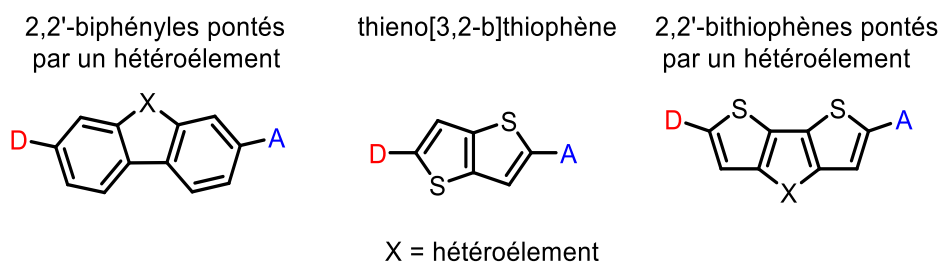


Figure II-60. Structures envisagées pour le pont π conjugué.

Nous avons précédemment synthétisé des chromophores avec un pont bithiophène pour l'imagerie photoacoustique (Chapitre IV). Ces colorants présentent une absorption fortement décalée vers le rouge par rapport à des composés basés sur des phényles et seront présentés en détail dans le chapitre IV. Cependant, ces composés étaient pour la plupart faiblement fluorescents. Ainsi, nous voulions voir si, en restreignant la rotation entre les thiophènes, il était possible d'améliorer la fluorescence de ces chromophores.

Entre le thieno[3,2-b]thiophène et les dérivés du 2,2'-bithiophène pontés par un hétéroélément en position 3,3', nous avons choisi le deuxième qui présente une synthèse plus simple, une conjugaison plus importante et surtout la possibilité de faire varier l'hétéroélément. Dernièrement, plusieurs articles détaillent la synthèse et les propriétés optiques de chromophores possédant ce motif, notamment leur d'absorption pour des cellules photovoltaïques.^[290,291]

Certains dérivés bithiophène pontés ont tout de même été étudiés pour leur fluorescence. Ainsi, le groupe d'Adachi a montré de remarquables rendements quantiques de bithiophènes pontés avec du germanium, du silicium, un oxyde de phosphine ou encore avec une sulfone (Figure II-61).^[292] En comparant les propriétés optiques en solution ou en film dopés avec celle du bithiophène, ils ont notamment montré que la rigidification du bithiophène permettait d'accroître grandement les rendements quantiques. D'autres structures quadripolaires basées sur des dithiénopyrroles ont été étudiés par Evenson *et al.* avec des rendements quantiques dans l'acétonitrile atteignant 90 %.^[293]

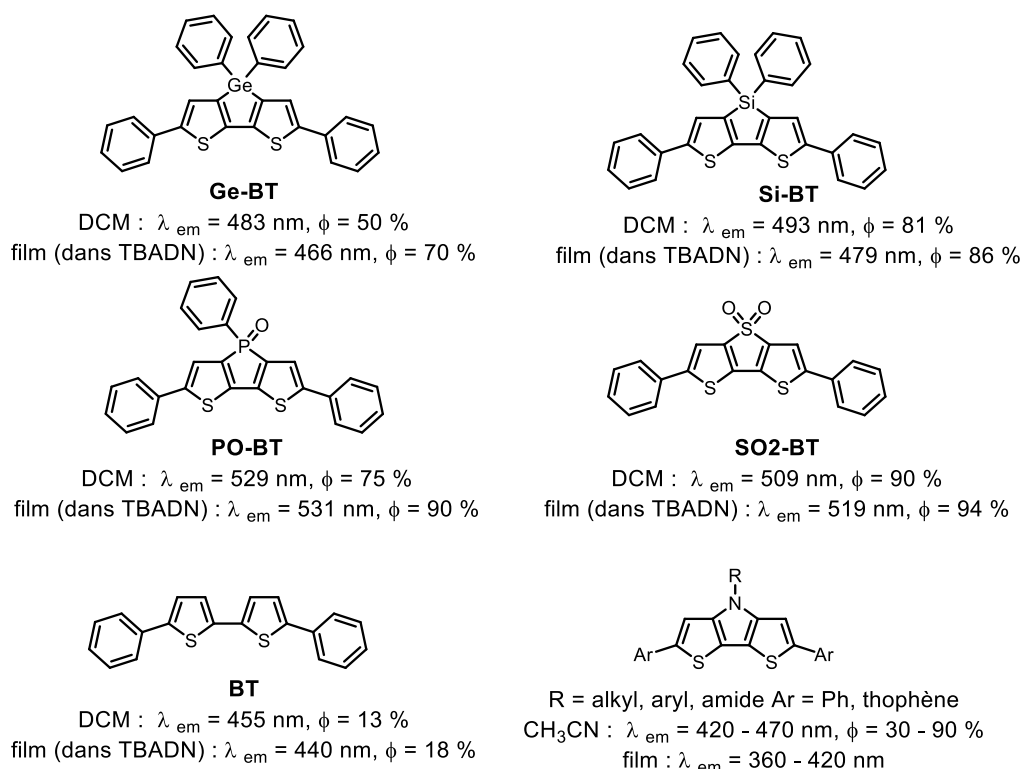


Figure II-61. Exemples de quadripôles de bithiophènes pontés avec un hétéroélément. [292,293]

Des fluorophores dipolaires ont aussi été synthétisés. La plupart du temps, le transfert de charge est effectué entre un donneur aminé et l'acide cyanoacétique (Figure II-62). [294–296] Cet accepteur permet de greffer les chromophores sur des surfaces de TiO₂. Cependant, l'application de ces chromophores étant le photovoltaïque, les auteurs n'ont pas mesuré les rendements quantiques.

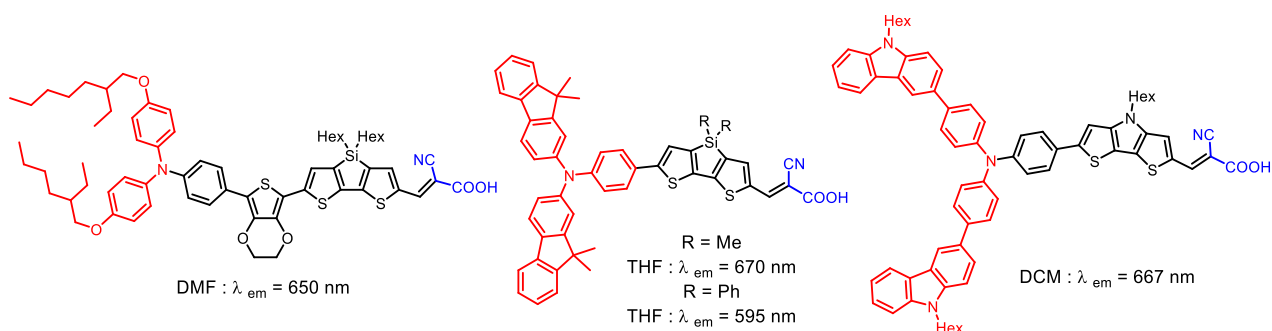


Figure II-62. Structures dipolaire basés sur un pont bithiophène ponté. [294–296]

Ainsi, même avec un accepteur de force moyenne, ces fluorophores possèdent une émission entre 650 nm et 700 nm, dans la fenêtre de transparence biologique. Malheureusement, les seuls articles à notre connaissance qui utilisent des groupements électroaccepteurs puissants, le **TCF** ou le thiobarbiturate, se concentrent uniquement sur l'absorption et les propriétés non linéaires de second ordre (Figure II-63). [297,298]

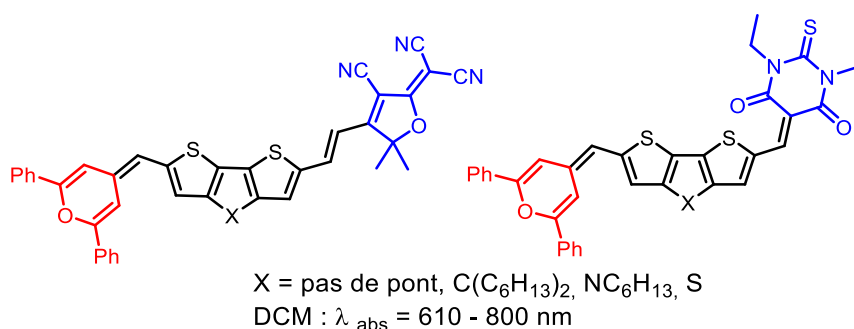


Figure II-63. Structures dipolaires basées sur un pont bithiophène ponté et un accepteur puissant. [297,298]

Ainsi, nous nous proposons de synthétiser des chromophores basés sur un pont conjugué bithiophène ponté et des accepteurs forts afin d'étudier leurs propriétés optiques et notamment leur fluorescence en solution et à l'état solide.

2. Cible et synthèse

a) Synthèse du pont conjugué

Le synthon clé pour la synthèse de la plupart des bithiophènes pontés est le 3,3'-dibromo-2,2'-bithiophène, **II-10**. Cet intermédiaire peut être obtenu par dimérisation du 3-bromothiophène ou par la tétra-bromation des positions 3, 3', 5 et 5' du 2,2'-bithiophène suivie d'une réduction sélective des halogènes en position 5 et 5'. [299,300]

La voie que nous avons choisie est la dimérisation du 3-bromothiophène. Pour cela, l'hydrogène en position 2 est arraché sélectivement à l'aide de diisopropylamide de lithium (LDA). Une transmétallation vers du cuivre est alors effectuée et permet le couplage oxydant de deux molécules de 3-bromothiophène. Les premières tentatives n'ont donné que des rendements médiocres, inférieurs à 50%. Finalement, nous avons utilisé une modification de cette synthèse décrite par Evenson *et al.* qui consiste en une transmétallation intermédiaire par du Zinc afin de faciliter la transmétallation vers le cuivre. [301] Cette méthode nous a permis d'obtenir le synthon voulu en grande quantité et avec un bon rendement de 73 %.

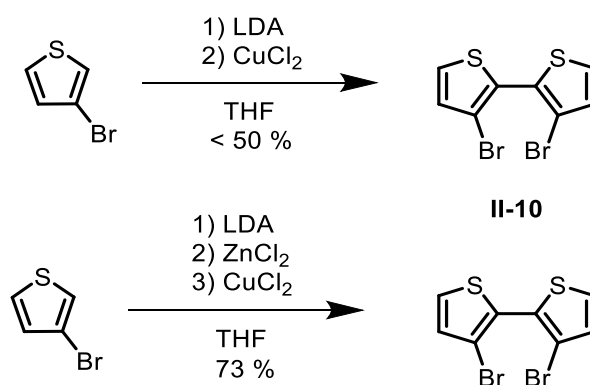


Figure II-64. Synthèse du synthon 3,3'-dibromo-2,2'-bithiophène.

Une fois **II-10** obtenu, il est possible d'obtenir divers bithiophènes pontés soit par couplage de Buchwald-Hartwig afin d'obtenir le dithiénopyrrole ou alors par échange halogène-lithium suivie de l'addition d'un électrophile (R_2SiCl_2 , $RPCl_2$...) afin d'obtenir le bithiophène ponté avec l'hétéroélément voulu (Schéma II-18).^[302]

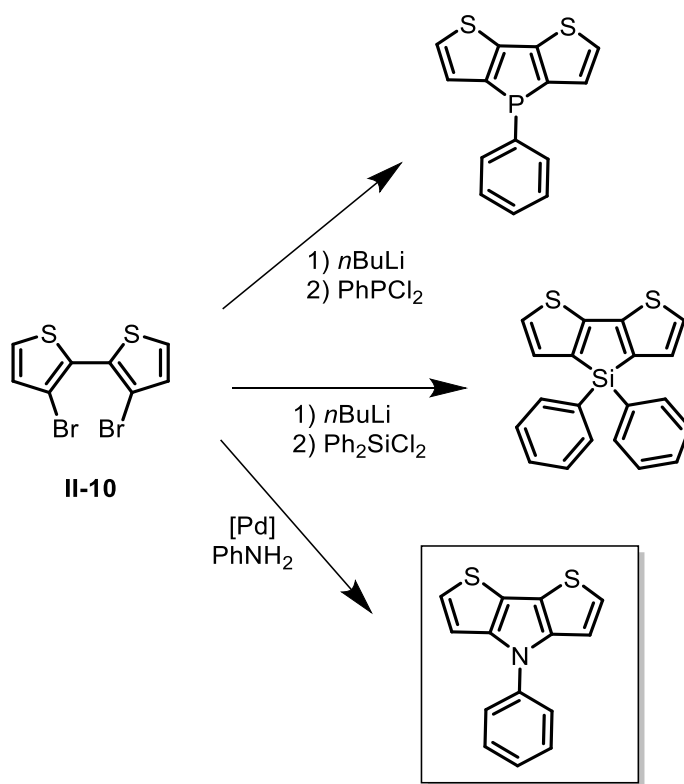


Schéma II-18. Synthèse des différents ponts π conjugués envisagés et cible choisie.

Nous avons décidé d'effectuer nos premiers essais sur ce type de pont conjugué sur un dithiénopyrrole, plus simple à synthétiser qu'avec les autres hétéroéléments. Nous voulions un groupement suffisamment encombré pour avoir des chances d'avoir une fluorescence à l'état solide. Nous avons donc choisi d'utiliser une aniline afin d'avoir un groupement phényle orthogonal au plan du chromophore. Plus précisément, nous avons choisi la *p*-anisidine pour sa disponibilité commerciale et le groupement méthoxy qui pourrait permettre d'améliorer la solubilité.

Ainsi, le pont conjugué identifié comme première cible est représentée sur la Figure II-65. Ce pont conjugué se comporte probablement comme un donneur auxiliaire, ce qui peut permettre d'améliorer les propriétés non linéaires du chromophore.^[25]

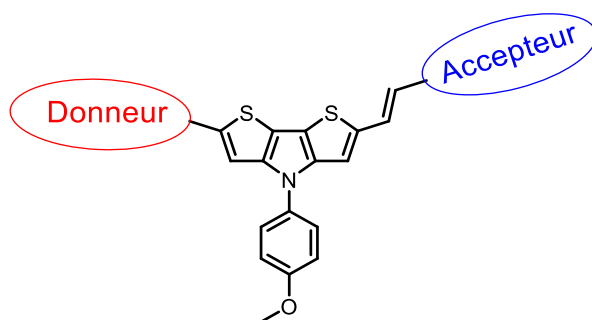


Figure II-65. Pont conjugué ciblé.

Le couplage de Buchwald-Hartwig entre le 3,3'-dibromo-2,2'-dithiophène et la p-anisidine permet d'obtenir le pont souhaité **II-11** avec un rendement correct de 57 %. Nous n'avons pas cherché à optimiser les conditions de la réaction, ainsi nous avons utilisé le *tert*-butanolate de sodium comme base, Pd₂(dba)₃ comme source de palladium (0) et la tri-*tert*-butylphosphine comme ligand du palladium.

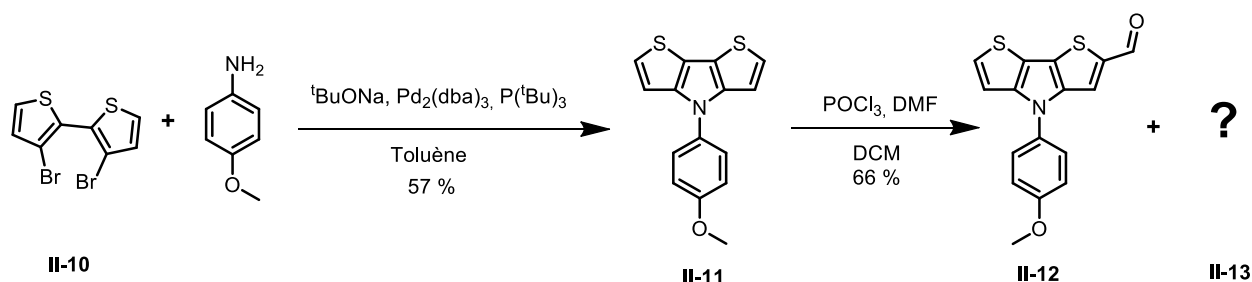


Schéma II-19. Début de la synthèse du pont conjugué dithiénopyrrole.

Une fois le pont obtenu, la formylation peut être effectuée par réaction de Vilsmeier-Haack avec un rendement de 66 % afin d'obtenir **II-12**.

Cependant, lors de cette réaction, nous avons isolé un produit secondaire **II-13** en quantité non négligeable (environ 30 % de rendement). Ce composé présente une absorption et une faible fluorescence décalée de manière bathochrome par rapport au produit voulu, signe d'un système conjugué plus long ou d'un transfert de charge plus fort. De plus, son analyse en RMN du proton montre la présence de deux aldéhydes différents. Nous avons d'abord pensé à un produit bisformylé puisque nous avons dû rajouter un deuxième équivalent de POCl₃ au cours de la réaction, afin de consommer entièrement le produit de départ. Cependant le reste des signaux RMN contredisent cette possibilité. En effet, le spectre du produit secondaire contient deux singulets aromatiques à 6,53 et 7,70 ppm. De plus, les signaux du p-méthoxyphényle apparaissent en double, avec des déplacements chimiques différents (Figure II-66). Encore plus curieux, deux signaux à 3,09 ppm et 3,78 ppm, pouvant correspondre à un motif -CH₂-CH₂-, semblent appartenir à ce produit inconnu.

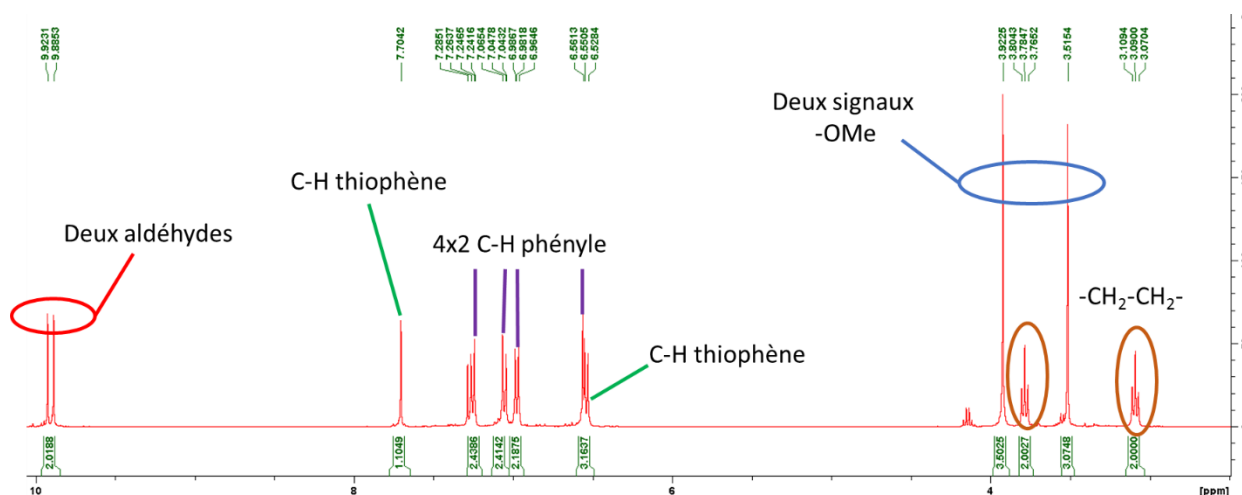


Figure II-66. Spectre RMN du produit secondaire obtenu lors de la formylation.

Avant de continuer la détermination de la structure de ce produit secondaire, nous avons voulu nous assurer que tous ces pics appartenaient à la même molécule. Cette hypothèse était fortement probable puisque nous avons effectué deux fois cette réaction de Vilsmeier-Haack et nous avons obtenu

deux spectres RMN identiques pour le produit secondaire isolé. Afin de confirmer qu'il n'y a bien qu'une seule molécule, nous avons effectué une expérience DOESY qui a montré que tous les signaux possèdent le même coefficient de diffusion d'environ $7,0 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ soit une masse molaire approximative de 540 g/mol en prenant le chloroforme résiduel comme référence.

Le spectre RMN ^{13}C confirme tous les éléments du spectre proton (deux atomes de carbone d'aldéhyde, deux groupes méthoxys, beaucoup plus de signaux aromatiques, deux carbones aliphatiques) mais ne nous a pas permis de déterminer de nouveaux éléments structuraux. Similairement, l'exploitation des spectres 2D (COSY, HSQC, HMBC) est limitée par la perte de la corrélation au niveau du groupement pyrrole central qui ne comporte aucun hydrogène. Le groupement $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ corrèle avec quelques carbones aromatiques mais ces derniers sont trop loin d'atomes d'hydrogène pour nous permettre d'identifier dans quelle région de la molécule se trouve ce groupement.

Enfin, un envoi en HRMS nous donne un pic majoritaire $[\text{M}+\text{H}]^+$ à $m/z = 338,34$ qui, comme nous l'apprendrons plus tard, correspond à l'erucamide, un contaminant qui semble provenir des bouchons des vials envoyés.^[303]

Finalement, des cristaux obtenus par diffusion lente d'heptane dans du chloroforme ont permis de déterminer la structure de ce produit secondaire (Figure II-67).

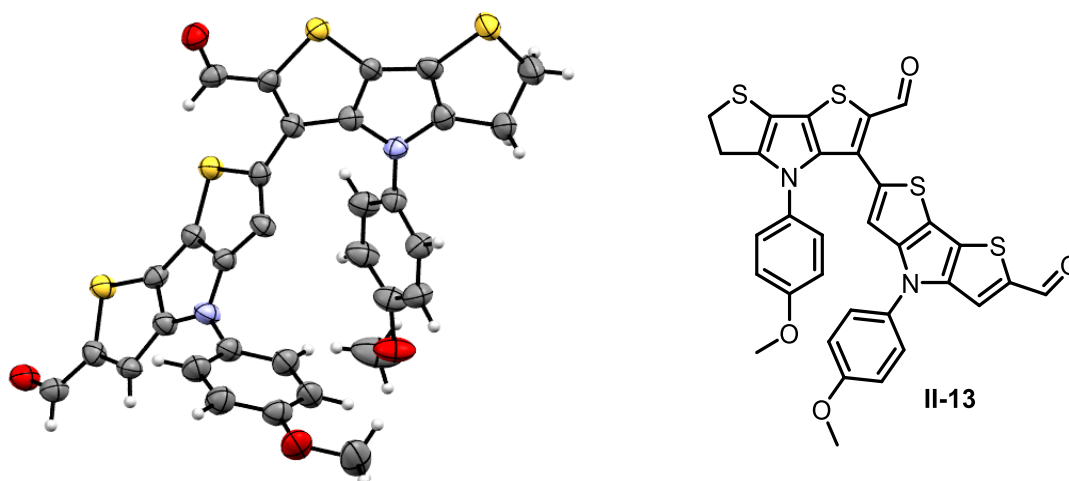


Figure II-67. Structure DRX du produit secondaire de la formylation.

Ainsi, le produit secondaire de la réaction de Vilsmeier-Haack du pont conjugué correspond à une dimérisation du produit entre l'atome de carbone 4 en α de l'aldéhyde et la position terminale 5' de la seconde molécule. Curieusement, cette réaction se produit avec la perte de l'aromaticité du deuxième thiophène de la première molécule donnant le groupement $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$. La masse molaire de **II-13** est de 627 g/mol proche de celle estimée par DOESY.

Nous pouvons constater sur la structure DRX de ce produit secondaire que les phényles sont bien perpendiculaires aux plans des motifs dithiénylpyrroles, comme nous le souhaitons pour la fluorescence à l'état solide.

Maintenant que ce mystère est résolu, nous pouvons continuer la synthèse de nos chromophores. A partir de **II-12**, la monobromation de la position terminale du deuxième thiophène se fait de manière sélective et quasi-quantitative à l'aide de *N*-bromosuccinimide (NBS) pour obtenir **II-14**.

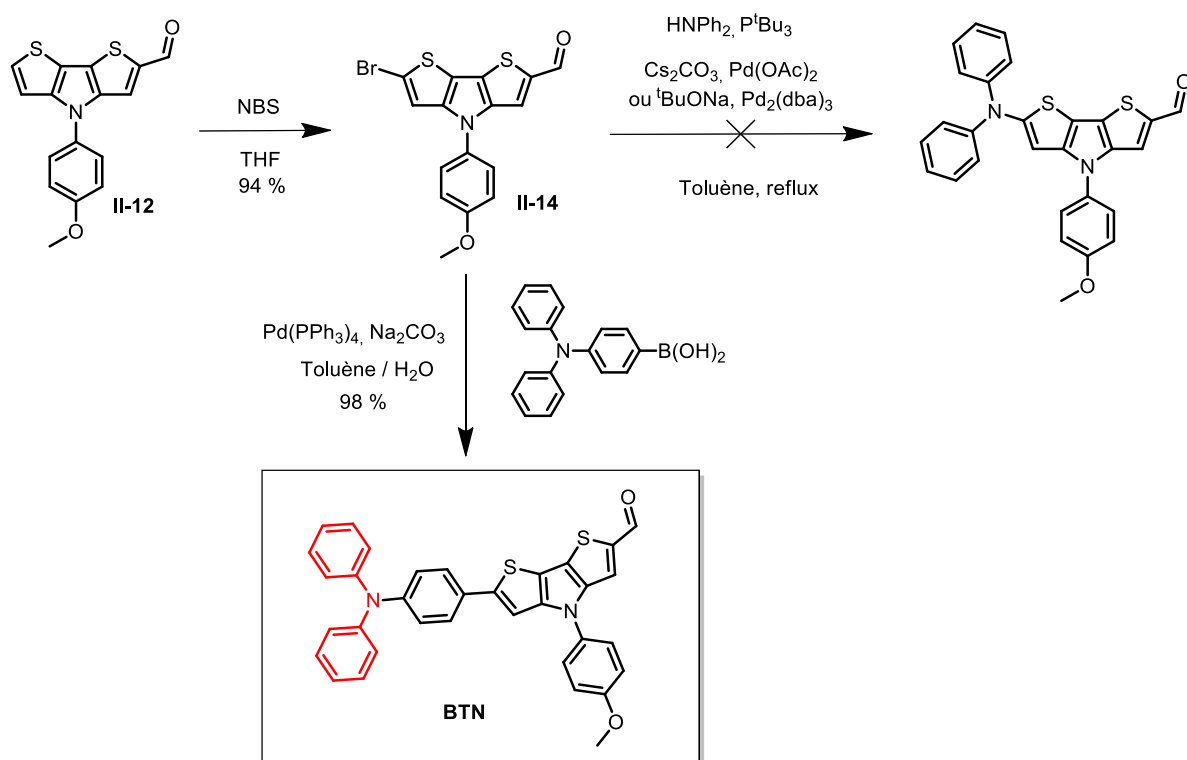


Schéma II-20. Suite et fin de la synthèse du pont conjugué.

Similairement à nos travaux sur les monothiophènes et bithiophènes que nous présenterons plus tard (Chapitre IV), nous n'avons pas réussi à introduire une diphenylamine directement sur le cycle thiophène avec des catalyseurs classiques. En effet, le couplage C-N sur des halogénures en position 2 d'hétérocycles à cinq chaînons est beaucoup plus complexe que sur les hétérocycles à six chaînons et nécessite généralement l'utilisation de catalyseurs plus riches et plus encombrés.^[304,305]

Pour contourner le problème, nous avons dû ajouter un phényle entre l'amine et le pont π conjugué. En effet, le couplage C-C se fait beaucoup plus facilement que le couplage C-N, notamment par la réaction de Suzuki-Miyaura, avec l'acide 4-(diphenylamino)phénylboronique, catalysée par $\text{Pd(PPh}_3)_4$. Cette réaction nous a permis d'obtenir **BTN** à partir de **II-14** avec un rendement quasiment quantitatif. *In fine*, l'aldéhyde **BTN** a pu être obtenu avec un rendement global de 25 %.

Il pourrait être intéressant de réessayer le couplage C-N avec un catalyseur plus performant car l'aromaticité du phényle dans le pont π conjugué entraîne une diminution de la délocalisation des électrons au sein du système π .

b) Synthèse des chromophores

Pour ces chromophores, nous avons choisi trois accepteurs, qui avaient donné de bons résultats en fluorescence à l'état solide, ainsi que le **TCF** pour sa force électroacceptrice. Ainsi, les quatre groupements accepteurs choisis sont représentés dans la Figure II-68.

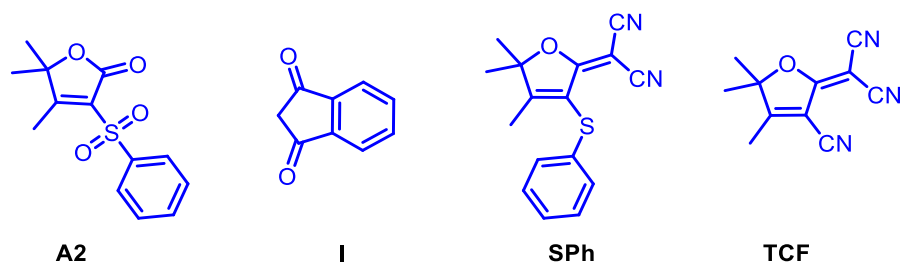


Figure II-68. Structures des accepteurs sélectionnés.

L'aldéhyde s'est avéré très peu soluble dans de nombreux solvants organiques. Cela a grandement compliqué les réactions de Knoevenagel, puisque nos conditions classiques (quelques millilitres d'éthanol et une goutte de pipéridine comme catalyseur) entraînaient une précipitation de l'aldéhyde avant toute réaction.

Pour **BTNSPh**, un reflux classique pendant deux jours nous a permis d'isoler une poudre noire contenant deux tiers du produit voulu et un tiers de l'aldéhyde (proportions déterminées par RMN). Ce mélange a été suspendu à nouveau dans 10 mL d'éthanol dans un tube scellé pour micro-onde avec environ un équivalent d'accepteur par rapport à l'aldéhyde restant. Un second chauffage d'une heure sous irradiation micro-onde ont permis de consommer le reste d'aldéhyde et l'isolement du produit avec un rendement de 68 %.

Pour les autres composés, nous avons modifié les conditions de la réaction de Knoevenagel, et notamment le solvant. Ainsi, les réactions ont été effectuées dans du DMF avec un mélange pipéridine /acide acétique/anhydride acétique comme catalyseur et par chauffage classique à 80°C.^[306] La réaction est suivie par RMN ou CCM jusqu'à la disparition complète de l'aldéhyde. Après refroidissement, le mélange est versé dans de l'eau et le solide est filtré, lavé à l'eau et à l'éthanol avant d'être recristallisé.

Le dérivé TCF n'a pas précipité du milieu réactionnel ce qui a compliqué la purification. En effet, un sous-produit de la réaction, le 1-acétylpipéridine, est difficilement séparable et entraîne une majorité du produit dans l'eau lors des lavages aqueux. Finalement, **BTNTCF** n'a été isolé qu'avec 20 % de rendement à cause de ces difficultés de séparation.

Les structures des chromophores et les rendements de synthèse de la réaction de Knoevenagel sont donnés dans la Figure II-69.

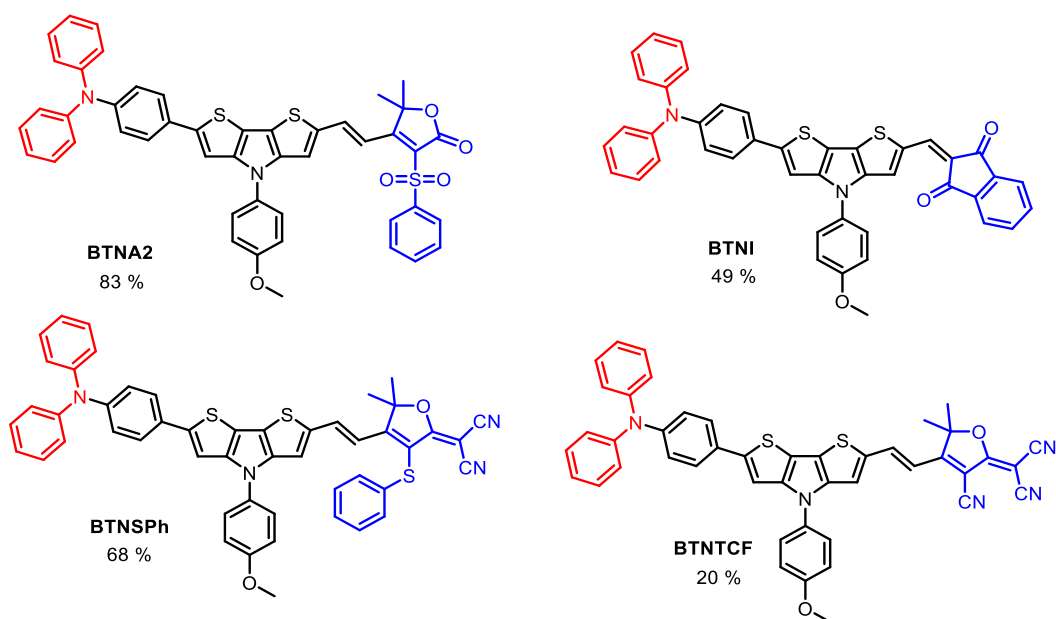


Figure II-69. Structures et rendements de la dernière étape de synthèse des chromophores.

3. Propriétés optiques

a) Absorption et émission en solution

Les propriétés optiques en solution des quatre fluorophores ont été tout d'abord évaluées dans le chloroforme. Les spectres d'absorption et d'émission des quatre composés sont représentés dans la Figure II-70 et les valeurs sont résumées dans le Tableau II-11. Ces colorants possèdent des maxima d'absorption entre 550 nm et 590 nm pour **BTNA2**, **BTNI** et **BTNSPh** et à 680 nm pour le dérivé **TCF**. **BTNI** et **BTNTCF** possèdent des coefficients d'absorption molaire remarquables, respectivement $91\,100\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ et de $71\,750\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

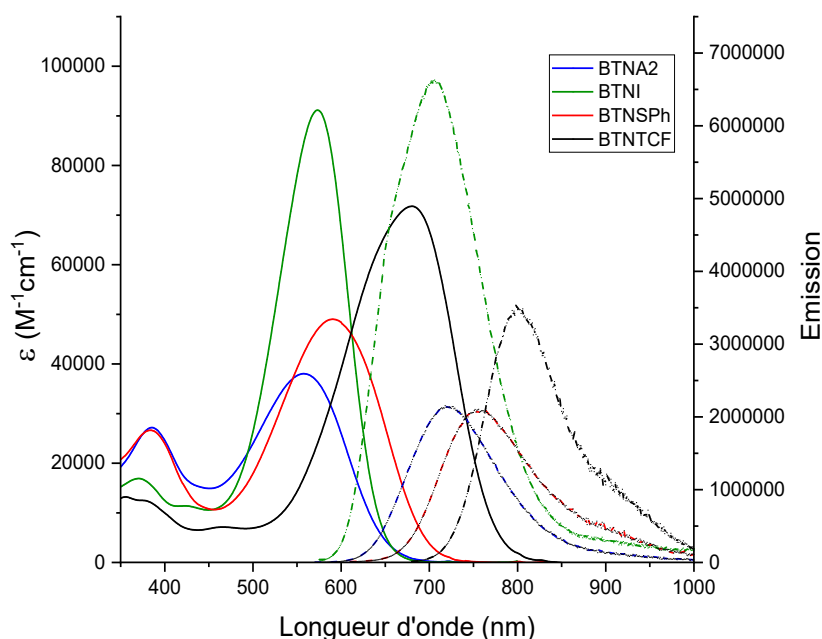


Figure II-70. Coefficients d'absorption molaire et émission des nouveaux chromophores à la concentration de 5 μM dans le chloroforme (excitation au maximum d'absorption).

Ces composés sont fortement émissifs entre 705 et 800 nm. Les rendements quantiques ont été mesurés par rapport au styryl 9M respectivement à 61 %, 82 %, 51 % et 50 % pour **BTNA2**, **BTNI**, **BTNSPh** et **BTNTCF**. Enfin, les valeurs des déplacements de Stokes sont relativement faibles (2000 - 4000 cm^{-1}) du fait des faibles énergies dans cette gamme de longueurs d'onde. En termes de longueur d'onde, ces valeurs correspondent tout de même à des différences entre 120 nm et 170 nm entre les maxima d'émission et d'absorption.

Fluorophore	λ_{abs} (nm)	ϵ ($\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)	λ_{em} (nm)	ϕ (%)	$\Delta\nu$ (cm^{-1})
BTNA2	557	38 000	721	61	4 100
BTNI	573	91 100	706	82	3 300
BTNSPh	591	49 000	758	51	3 730
BTNTCF	680	71 750	801	50	2 220

Tableau II-11. Propriétés optiques dans le chloroforme des chromophores.

Les fortes brillances entre 23 000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ et 75 000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ et les émissions dans la fenêtre biologique de ces chromophores en font des candidats prometteurs pour l'imagerie de fluorescence. De plus, l'utilisation de ce nouveau pont conjugué a permis un décalage considérable des longueurs d'onde d'absorption par rapport aux fluorophores basés sur un fluorène par exemple. Les maxima d'absorption entre 550 nm et 700 nm correspondent à une ADP entre 1100 nm et 1400 nm, dans la deuxième fenêtre biologique, NIR-II.

Bien que la comparaison avec le pont fluorène ne soit pas parfaite à cause du phényle supplémentaire et donc deux doubles liaisons en plus dans le système conjugué, il est intéressant de

remarquer que ce changement de pont conjugué entraîne une augmentation du coefficient d'absorption, un fort déplacement bathochrome de l'absorption et un déplacement bathochrome modéré de l'émission (Figure II-71).

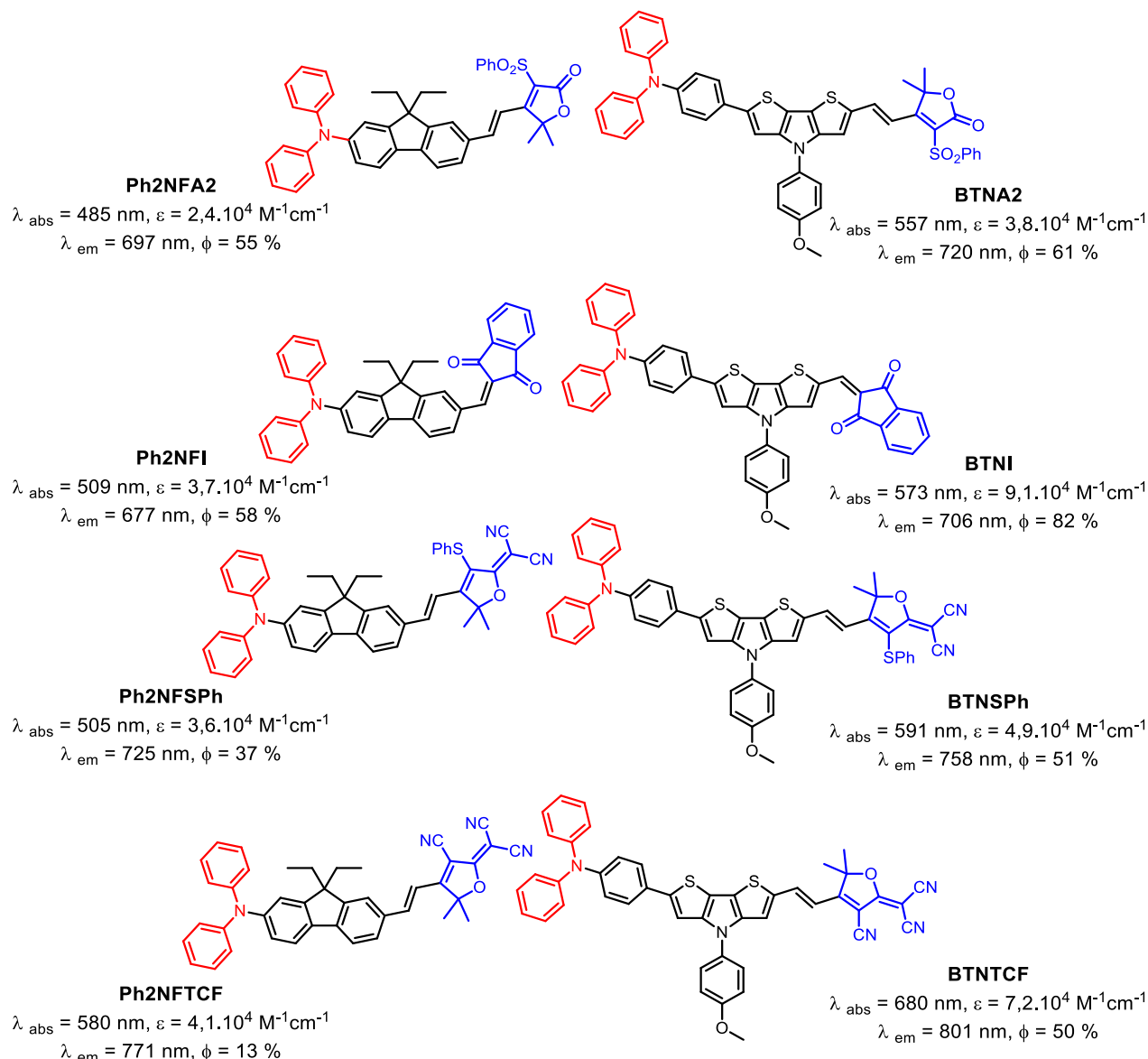


Figure II-71. Comparaison des propriétés optiques des chromophores dipolaires basés sur un pont dithiénopyrrole avec ceux basés sur un pont thiophène.

b) Solvatochromisme

Nous avons étudié le solvatochromisme en absorption et en émission des composés. Les spectres sont représentés dans la Figure II-72, la Figure II-73, la Figure II-74 et la Figure II-75 et les valeurs sont résumées dans le Tableau II-12. Bien que la solubilité de l'aldéhyde soit faible dans les solvants non-chlorés, la solubilité est grandement améliorée par l'ajout du groupement accepteur. Seule exception : le cyclohexane qui ne solubilise que très peu ces chromophores et notamment **BTNTCF**. Ainsi, la faible absorption de ces chromophores dans le cyclohexane est due à leur faible solubilité dans ce solvant.

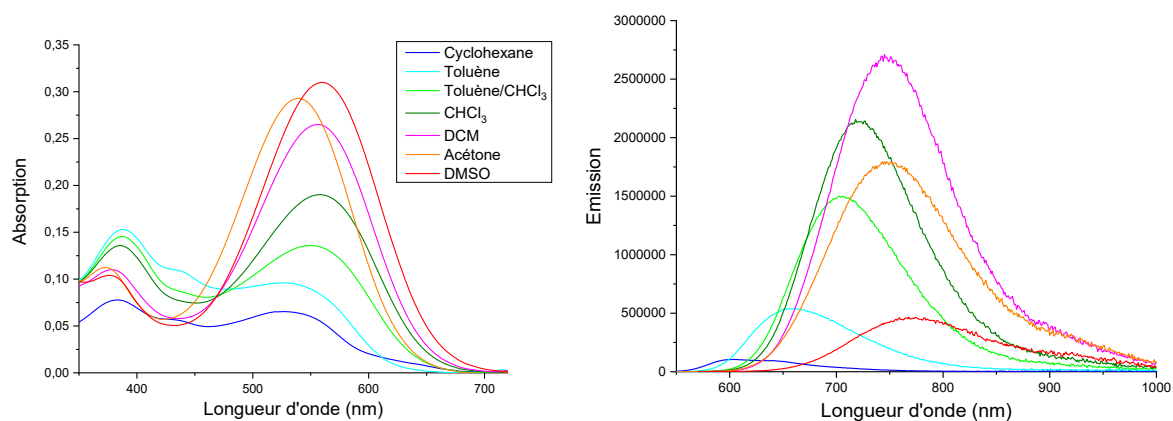


Figure II-72. Solvatochromisme d'absorption (gauche) et d'émission (droite) de **BTNA2** à 5 μM .

Pour ces quatre chromophores, l'absorption augmente globalement avec la polarité et se décale de manière bathochrome d'environ 20-40 nm. Comme précédemment, un déplacement hypsochrome de l'absorption est observé dans l'acétone.

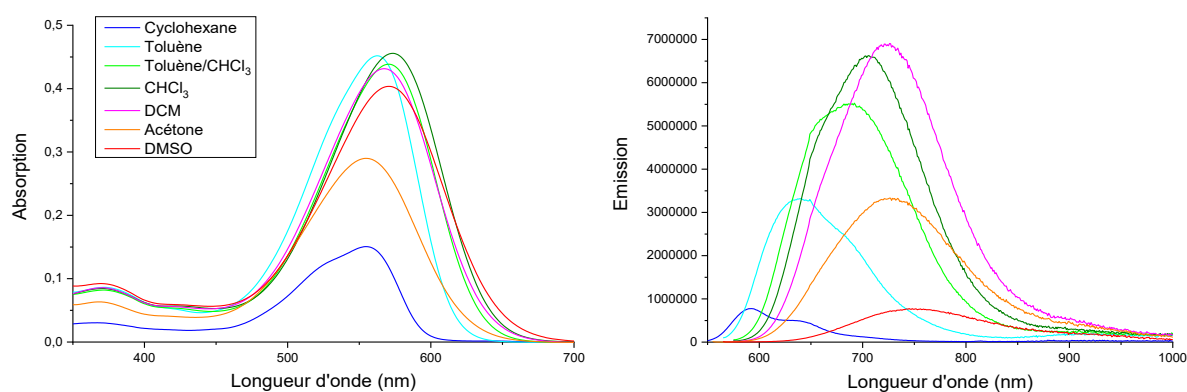


Figure II-73. Solvatochromisme d'absorption (gauche) et d'émission (droite) de **BTNI** à 5 μM .

Par rapport aux chromophores basés sur les accepteurs **SPh** et **SO2Ph**, que nous avons présentés dans la partie précédentes, les chromophores **BTNA2**, **BTNI** et **BTNSPh** sont plus fluorescents dans les milieux très polaires. Ainsi, l'émission est généralement maximale dans le dichlorométhane et la fluorescence reste conséquente dans l'acétone et non négligeable dans le DMSO.

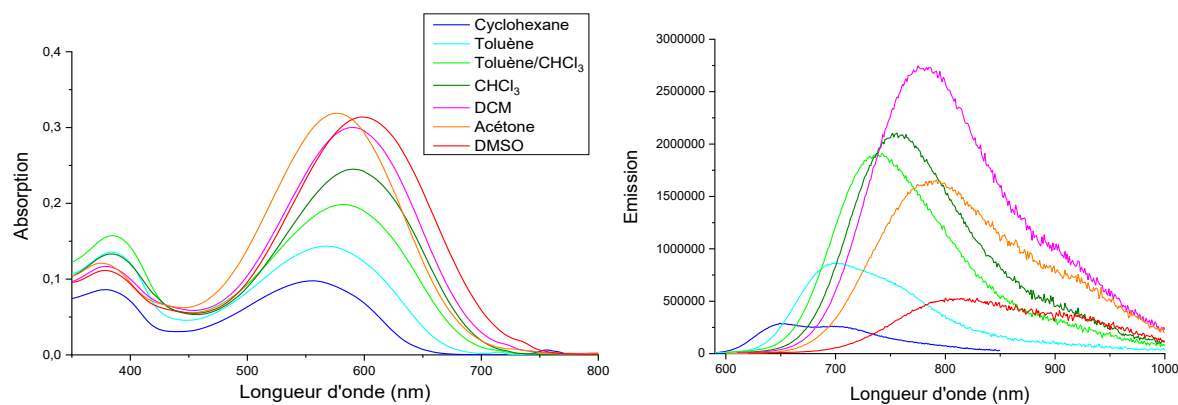


Figure II-74. Solvatochromisme d'absorption (gauche) et d'émission (droite) de **BTNSPh** à 5 μM .

Le composé le plus décalé vers le rouge, **BTNTCF**, est le plus fluorescent dans le mélange équimolaire toluène/chloroforme à 783 nm. Au-delà du chloroforme, son intensité de fluorescence diminue rapidement avec la polarité, similairement à ce que nous avons observé dans la partie précédente.

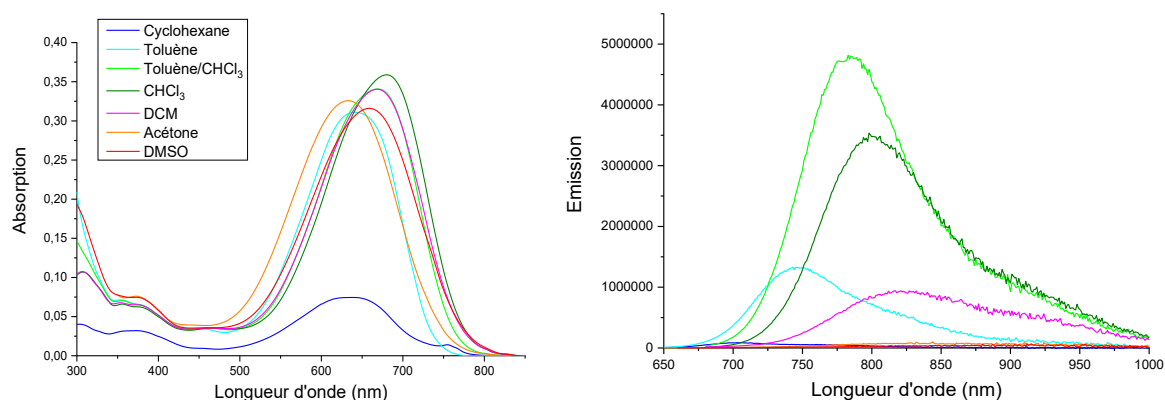


Figure II-75. Solvatochromisme d'absorption (gauche) et d'émission (droite) de **BTNTCF** à 5 μ M.

Ainsi, ces chromophores possèdent une fluorescence particulièrement intéressante en solution. Deux composés, **BTNSPh** et **BTNTCF** possèdent des maxima d'émission au-delà de 800 nm avec des rendements quantiques non négligeables. Encore une fois, ces rendements sont calculés sur un point à partir du rendement dans le chloroforme et sont donc à considérer avec précaution.

Solvant	BTNA2				BTNI			
	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\nu$ (cm^{-1})	QY (%)	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\nu$ (cm^{-1})	QY (%)
Cyclohexane	527	603	2400	8	555	591	1100	20
Toluène	527	656	3730	33	563	639	2110	40
Toluène/ CHCl_3	550	705	4000	62	571	688	2980	75
CHCl_3	558	721	4050	61	573	706	3290	82
DCM	559	748	4520	58	568	724	3800	90
Acétone	539	749	5200	36	555	727	4260	68
DMSO	560	774	4950	11	571	752	4220	15

Solvant	BTNSPh				BTNTCF			
	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\nu$ (cm^{-1})	QY (%)	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	$\Delta\nu$ (cm^{-1})	QY (%)
Cyclohexane	556	643	2430	16	636	704	1520	5
Toluène	568	701	3340	39	642	747	2190	21
Toluène/ CHCl_3	582	739	3650	58	670	783	2150	70
CHCl_3	591	756	3700	51	680	798	2180	50
DCM	591	776	4030	57	668	821	2790	17
Acétone	576	791	4720	33	633	827	3710	2
DMSO	599	811	4360	14	659	-	-	-

Tableau II-12. Solvatochromisme des chromophores basés sur un pont dithiénopyrrole.

c) Emission à l'état solide

Contrairement à nos attentes, les quatre chromophores se sont avérés peu ou pas émissifs sous forme de poudres. En effet, seul le composé **BTNSPh** a montré une fluorescence avec un maximum d'émission vers 830 nm (Figure II-76) et un rendement quantique estimé vers 0,3 %.

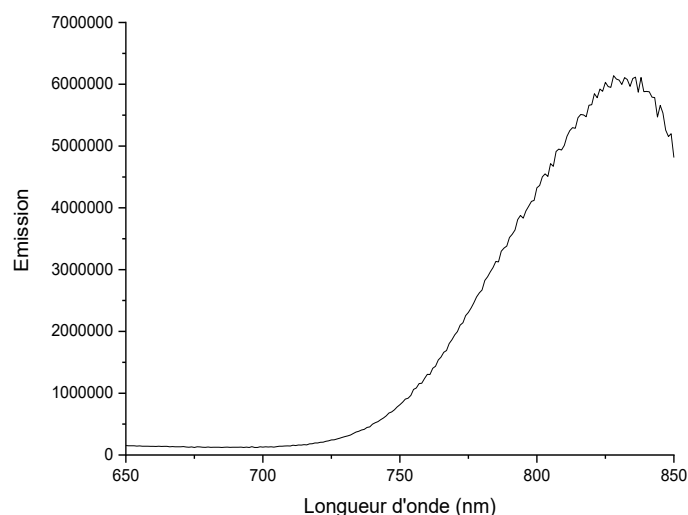


Figure II-76. Spectre de fluorescence à l'état solide de **BTNSPh**.

Curieusement, aucune fluorescence n'a été observée avec la poudre de **BTNA2**, pourtant structuellement proche de **BTNSPh**.

Il semblerait que le phényle central soit insuffisant pour empêcher l'empilement π du long pont conjugué. Malheureusement, pour l'instant aucune structure DRX n'a été obtenue afin de pouvoir visualiser l'arrangement solide de ces chromophores.

4. Conclusion

Dans cette partie, nous avons synthétisé un pont conjugué dithiénopyrrole. Nous avons choisi une triphénylamine comme donneur et avons sélectionné plusieurs accepteurs afin de synthétiser les chromophores correspondants.

Cette stratégie s'est avérée particulièrement intéressante pour la fluorescence en solution. La faible aromaticité du pont conjugué a permis un décalage conséquent de l'absorption des chromophores et une augmentation des coefficients d'absorption molaire par rapport à un pont fluorényle par exemple. Ainsi, les quatre chromophores absorbent entre 550 nm et 680 nm. Cela est extrêmement intéressant pour une ADP dans NIR-II. Pour cette application, nous devons encore mesurer leur section efficace d'absorption à deux photons. Outre leur absorption intéressante, ces chromophores sont fortement fluorescents dans le chloroforme au-delà de 700 nm avec des rendements quantiques supérieurs à 50 %. Avec une possible absorption biphotonique dans NIR-II et une émission dans NIR-I, ces chromophores sont particulièrement prometteurs pour l'imagerie de fluorescence.

Cependant la faible ou inexistante fluorescence à l'état solide peut limiter l'application en imagerie de ces colorants hydrophobes. Dans le chapitre suivant, nous verrons qu'il est possible de contourner ce problème par FRET ou avec certains types de nanoparticules. La fluorescence à l'état solide peut probablement être améliorée en modifiant l'élément ponté. Si on souhaite conserver un atome d'azote, il pourrait être intéressant d'incorporer un groupement plus encombrant pour limiter les interactions intermoléculaires, mais surtout plus solubilisant afin de faciliter la condensation de Knoevenagel. Si nous décidons de changer l'hétéroélément, le diphenylsilane peut être particulièrement intéressant pour la fluorescence à l'état solide.

D. Bilan général

Dans cette partie, nous avons exploré diverses modifications de la structure D- π -A de chromophores dipolaires, afin d'améliorer la fluorescence à l'état solide. Pour cela, nous avons choisi une stratégie d'ingénierie moléculaire reposant sur l'introduction de groupements encombrants et hors du plan du chromophore afin de limiter les interactions intermoléculaires à l'état solide.

Tout d'abord, nous avons synthétisé des chromophores basés sur un donneur phosphoré ou azoté. Nous avons étudié l'impact de l'hétéroélément du donneur sur les propriétés optiques en solution et à l'état solide. Le phosphore possède une géométrie pyramidale qui lui confère des propriétés optiques particulières. Premièrement, les phosphines présentent un décalage hypsochrome important en absorption par rapport aux homologues azotés. De plus, elles sont complètement éteintes en solution organique, probablement à cause d'un mouvement intramoléculaire de planéarisation. En agrégats, les phosphines deviennent fluorescentes avec d'excellents déplacements de Stokes et coefficients d'accroissement de fluorescence. Par ailleurs, toutes les poudres des chromophores, azotés et phosphorés, sont fluorescentes avec des maxima entre 635 nm et 750 nm pour les premières et 620 nm et 685 nm pour les secondes.

Par la suite, nous nous sommes intéressés au groupement accepteur. En s'inspirant d'un accepteur donnant des chromophores performants à l'état solide mais aux maxima d'émission en dessous de 650 nm, **A2**, nous avons conçu et synthétisé deux nouveaux groupements accepteurs fortement électroaccepteur et possédant un groupement phényle hors du plan du chromophore. En sélectionnant judicieusement des groupements donneurs, nous avons pu obtenir une série de chromophores possédant d'excellents rendements quantiques à l'état solide dans la fenêtre biologique. En particulier, **Ph2NFSPH** possède un rendement de 28 % et un maximum d'émission à 700 nm. De plus, ces chromophores possèdent aussi une fluorescence remarquable en solution avec des maxima d'émission entre 580 nm et 810 nm dans le chloroforme. Enfin, nous avons aussi oxydé les thioéthers de certains chromophores en sulfoxyde. L'augmentation de la force électroacceptrice a donné lieu à un décalage bathochrome des propriétés optiques cohérent avec l'augmentation du transfert de charge mais surtout à une augmentation des coefficients d'absorption molaire ainsi que des rendements quantiques. L'ajout de groupement hydrosolubilisant pourrait permettre la conception d'une sonde intéressante permettant de détecter les ROS capables d'oxyder un thioéther en sulfoxyde. Pour une raison encore inconnue, le sulfoxyde éteint complètement la fluorescence à l'état solide.

Enfin, nous avons voulu explorer de nouveaux ponts conjugués. Dans cette étude préliminaire, nous avons choisi un pont *N*-(4-méthoxyphényl)dithiénopyrrole. Avec la triphénylamine comme groupement donneur, nous avons synthétisé quatre chromophores en variant le groupement accepteur. Les chromophores obtenus par cette stratégie ont montré une fluorescence en solution exceptionnelle avec des rendements supérieurs à 50 % au-delà de 700 nm. De plus, la faible aromaticité du pont dithiénopyrrole permet un décalage bathochrome de l'absorption au-delà 550 nm. Si ces chromophores présentent une bonne section efficace d'ADP, ils pourraient être particulièrement prometteurs pour l'imagerie de fluorescence avec ADP dans NIR-II et émission dans NIR-I. Enfin, ces chromophores ne sont que très peu fluorescents à l'état solide. Nous verrons dans le chapitre suivant que leur fluorescence peut être restauré par FRET ou en utilisant des nanoparticules pluronic/silice. Cette série est cependant limitée par leur solubilité médiocre qui complique les synthèses. Une modification du substituant du pyrrole voire de l'hétéroélément central devrait permettre de corriger ce problème.

Chapitre III. Formulation des colorants en nanoparticules pour l'imagerie de fluorescence

Après avoir présenté les propriétés optiques de nos chromophores en solution et à l'état solide, nous allons maintenant nous intéresser à leurs propriétés en agrégats. En effet, une solubilisation des chromophores dans l'eau est essentielle pour des applications en imagerie *in vivo*. Plutôt que d'incorporer des groupements solubilisant dans les structures des chromophores, nous avons choisi une formulation des chromophores en nanoagrégats ou en nanoparticules. Dans ce chapitre, nous allons tout d'abord présenter un rapide aperçu des précédents travaux du laboratoire et dans la littérature sur la synthèse d'agrégats par nanoprécipitation et sur la synthèse de nanoparticules pluronic/silice. La seconde partie de ce chapitre sera consacrée à une optimisation sur une molécule modèle de la méthode de nanoprécipitation par rapport à ce qui était fait précédemment au laboratoire. Puis nous appliquerons cette synthèse à nos fluorophores pour l'imagerie cellulaire ainsi qu'à des co-agrégats présentant un transfert d'énergie résonant de type Förster. Enfin, nous présenterons l'encapsulation de nos chromophores dans des nanoparticules pluronic/silice.

A. Nanoagrégats et nanoparticules au laboratoire

Dans notre équipe, la synthèse de nanoagrégats et de nanoparticules a été développée par Z. Zheng au cours de sa thèse.^[105] Les synthèses ont été optimisées pour la famille de chromophores basés sur un groupement fluorène (Figure III-1). Z. Zheng a travaillé sur deux types de nanoparticules : des nanoagrégats stabilisés par du pluronic F127 et des nanoparticules de chromophores encapsulés dans une matrice de pluronic F127 stabilisée avec une couche de silice.

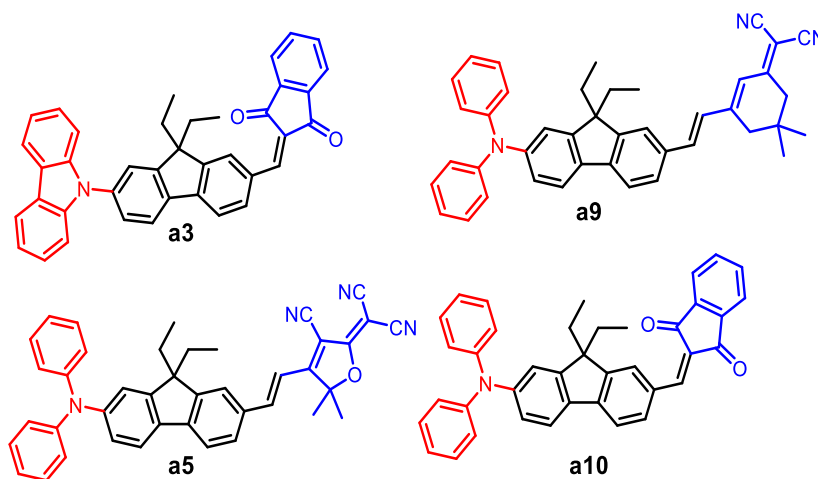


Figure III-1. Chromophores sur lesquels la synthèse des nanoagrégats et des nanoparticules avait été optimisée.

Nous allons tout d'abord présenter succinctement les méthodes de synthèse et les propriétés des différents nano-objets formés précédemment au laboratoire.

1. Synthèse et propriétés des nanoagrégats

Lorsqu'une solution d'une molécule organique dans un solvant miscible à l'eau est ajoutée à une quantité importante d'eau, la diminution brutale de la solubilité du composé organique dans le mélange crée des conditions de super-saturation qui mènent à la précipitation de nanoagrégats organiques afin de minimiser les interactions avec l'eau.^[307] Si les molécules organiques sont des fluorophores émettant à l'état solide, cette méthode de nanoprecipitation par déplacement de solvant donne des nanoparticules organiques fluorescentes (FONs) amorphes et généralement de diamètre inférieur à 200 nm.

L'ajout d'agents tensioactifs permet d'améliorer grandement la stabilité colloïdale de ces nanoagrégats en cachant l'hydrophobicité de la surface de l'agrégat du colorant organique et permet d'éviter la formation d'agglomérats d'agrégats. En particulier, l'utilisation de copolymères à bloc amphiphiles a permis une stabilisation efficace d'agrégats de nombreux chromophores, notamment pour des applications *in vivo* grâce à leurs groupements PEG.^[54,308] Pour des applications en imagerie *in vivo* de petits animaux, l'agent tensioactif choisi doit être biocompatible. Parmi les agents les plus employés, de nombreux polymères tels que les acides poly(lactique-co-glycolique), les polyxamères (ou Pluronic) ou encore le DSPE-PEG sont autorisés par la FDA. Nous avons choisi de travailler avec le Pluronic F-127, pour sa disponibilité commerciale à faible coût. Ce copolymère amphiphile est composé de deux blocs de polyéthylène glycol (PEG) entourant un bloc de polypropylène glycol apolaire.

La procédure de préparation des agrégats stabilisés avec du Pluronic F127 optimisée préalablement au laboratoire est la suivante : une solution d'acétone contenant un mélange équimassique de colorant et de Pluronic F127 est injectée d'un coup dans de l'eau afin d'obtenir une solution avec une fraction volumique finale en eau de 0,9. L'acétone est alors évaporée lentement par agitation sous une sorbonne pendant la nuit. Enfin, la solution d'agrégats est filtrée au travers d'un filtre de 0,2 μm afin d'éliminer de possibles poussières ou agrégats de taille supérieure.

Les agrégats ont été caractérisés par diffusion dynamique de la lumière (DLS) et par microscopie électronique à balayage (MEB). Il est important de noter que les diamètres hydrodynamiques représentés dans la Figure III-2 et dans cette thèse sont les diamètres « en intensité », surestimés par rapport aux tailles réelles. Nous avons choisi de ne pas utiliser la correction vers les tailles « en nombre » qui nécessite de connaître l'indice de réfraction des nanomatériaux. Ainsi, le diamètre hydrodynamique des nanoagrégats obtenus pour ce composé est de 85 nm, ce qui est relativement proche des tailles d'environ 75 nm observés par MEB.

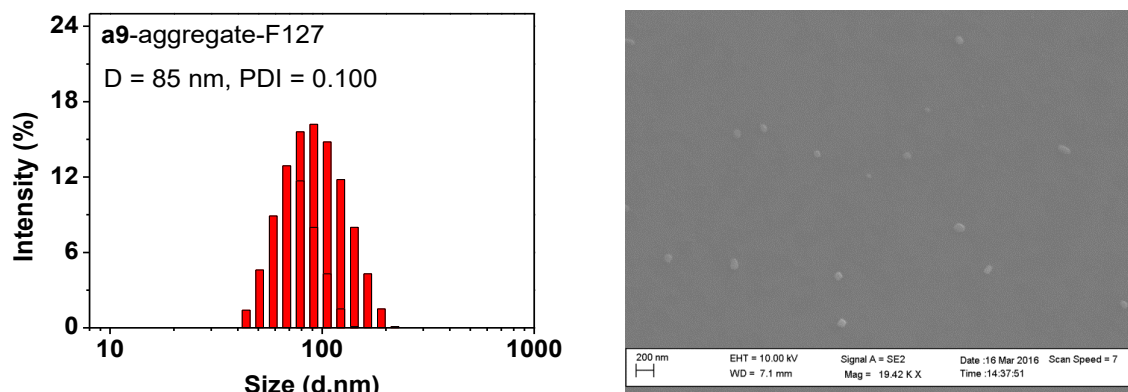


Figure III-2. Caractérisation des nanoagrégats de **a9** (tirés de [105]).
Gauche : diamètres hydrodynamiques des agrégats du chromophore **a9** mesurés par DLS.
Droite : images MEB des agrégats de **a9**.

L'ajout du Pluronic ne modifie pas les propriétés optiques par rapport aux agrégats nus. Ces nanoagrégats ont été utilisés pour imager la microvascularisation autour d'un gliome humain U87MG xénogreffé dans l'oreille d'une souris.

2. Transfert d'énergie résonant de type Förster

A partir de ces nanoagrégats fluorescents, nous avons utilisé le phénomène de FRET afin de restaurer la fluorescence de chromophores peu émissifs à l'état solide. Ce transfert d'énergie nécessite plusieurs conditions :

- Une bonne intégrale de recouvrement entre le spectre d'émission du donneur et le spectre d'absorption de l'accepteur (Figure III-3).
- Un rendement quantique élevé pour le donneur et un fort coefficient d'absorption pour l'accepteur.
- Une faible distance donneur-accepteur, inférieure à 10 nm. En effet, l'efficacité de transfert d'énergie est inversement proportionnelle à la distance inter-chromophore à la puissance six.

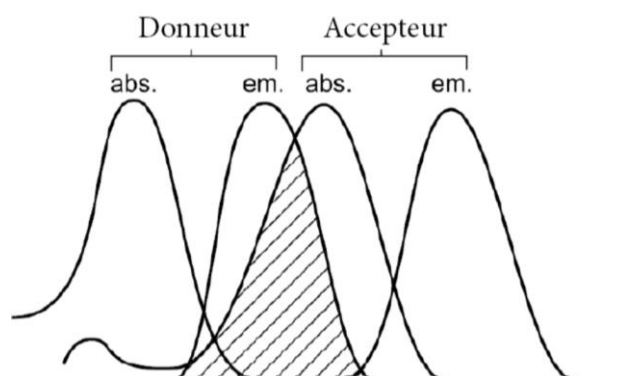


Figure III-3. Recouvrement avec les spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur (adapté de [1]).

Les co-agrégats donneur/accepteur (aux propriétés optiques adéquates) constituent des plateformes idéales pour le transfert d'énergie du donneur vers l'accepteur grâce à la proximité entre les

chromophores et à la possibilité de déplacement de l'exciton du donneur. Cette approche permet d'obtenir des agrégats présentant une forte fluorescence dans la fenêtre biologique ainsi que des pseudo-déplacements de Stokes exceptionnellement grands.

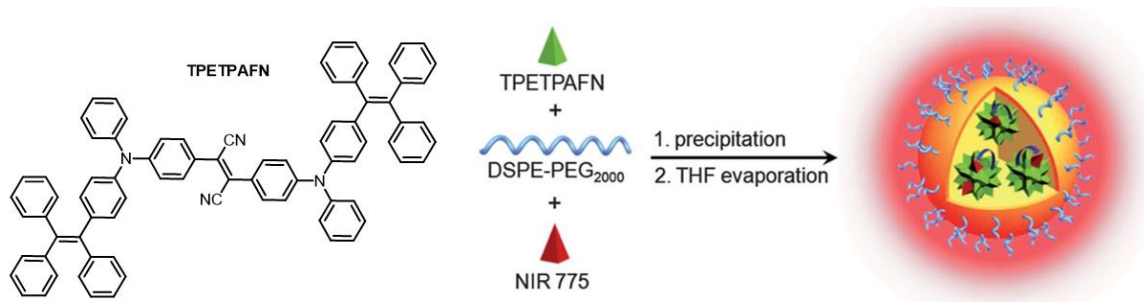


Figure III-4. Exemple de co-agrégats présentant un transfert d'énergie entre un donneur **TPETPAFN** et un accepteur **NIR775**.^[309]

La Figure III-4 montre un exemple de co-agrégats de deux chromophores provenant du groupe de Liu.^[309] Les auteurs ont étudié le transfert d'énergie entre **TPETPAFN** et un chromophore commercial, **NIR775** (une naphthalocyanine complexée par du silicium). Ils ont montré que le FRET permet une multiplication par un facteur 47 de la fluorescence de l'accepteur lorsque **NIR775** est excitée par transfert d'énergie plutôt que par excitation directe. En outre, ce transfert vers la naphthalocyanine permet d'obtenir une émission fine, déplacée de manière bathochrome jusqu'à 780 nm et avec un pseudo-déplacement de Stokes de 275 nm. Le maximum de fluorescence est obtenu pour les co-agrégats contenant un taux de dopage massique de 1,5 % de **NIR775**, qui possèdent un rendement quantique de 9 % et une efficacité de transfert d'énergie de 88 %.

Dans notre groupe, nous avons étudié le transfert d'énergie entre deux dérivés du fluorène, **a3** et **a5** (Figure III-5).

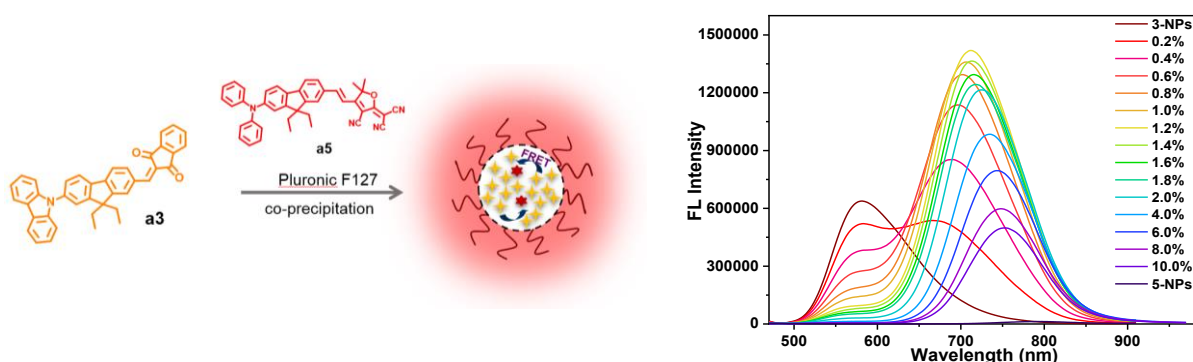


Figure III-5. Synthèse des co-agrégats de **a3** dopés avec **a5** (gauche) et courbes de fluorescence des co-agrégats en fonction du taux de dopage (droite).^[105]

Alors que les agrégats de **a5** ne sont que faiblement émissifs à 795 nm, les co-agrégats **a3-a5** contenant des pourcentages massiques de 0,2 à 10 % de **a5** présentent une forte fluorescence au-delà de 700 nm. L'augmentation de la fraction molaire **a5/a3** provoque une diminution de la fluorescence du donneur et un décalage bathochrome de la fluorescence de l'accepteur par augmentation de la polarité du milieu. Le maximum de fluorescence est atteint pour 1,2 % avec un rendement quantique de 14 % à 711 nm. Lorsque la proportion d'accepteur augmente au-delà de cette valeur, la fluorescence résiduelle de **a3** disparaît mais l'augmentation de la polarité de la nanoparticule ainsi que de la proximité entre

accepteurs entraîne une diminution de la fluorescence de **a5**. Les co-agrégats **a3-a5** avec des taux de dopages entre 0 et 4 % possèdent tous un diamètre hydrodynamique de 57 nm.

3. Synthèse et propriétés de nanoparticules pluronic/silice

a) *Nanoparticules pluronic/silice dans la littérature*

Parallèlement aux agrégats, nous avons étudié les propriétés de nos colorants encapsulés dans des micelles de pluronic F127 et stabilisé par une coquille de silice.^[10,105] Lorsque le pluronic est suffisamment concentré dans l'eau, ce polymère s'arrange en micelles permettant l'encapsulation de principes actifs ou de chromophores et donc leur solubilisation ainsi que leur transport lors d'applications *in vivo*.^[310,311] Les micelles de pluronic montrent un long temps de vie dans le sang grâce à la furtivité apportée par les groupements PEGs.^[312] L'encapsulation de fluorophores au sein de ces micelles permet la création de nano-objets idéaux pour l'angiographie.^[313]

Cependant, il a été montré que les micelles de pluronic se dissocient rapidement lorsqu'elles sont diluées jusqu'à des concentrations inférieures à leur concentration micellaire critique.^[314] Afin d'accroître leur stabilité, Huo *et al.* ont proposé l'addition d'une coquille de silice rigide et ont montré que cette coquille permettait une encapsulation plus longue de principes actifs dans les nanoparticules.^[315] La localisation de la coquille de silice entre le cœur hydrophobe et la couronne hydrophile de la micelle provient de l'hydrophobicité du précurseur de silice, l'orthosilicate de tétraéthyle (TEOS), qui se concentre dans cette poche hydrophobe avant de se condenser en silice. Cette stratégie a ensuite été reprise par plusieurs groupes afin d'encapsuler de nombreux colorants hydrophobes.

Prodi *et al.* ont encapsulé plusieurs chromophores fonctionnalisés avec un groupement triethoxysilane.^[316,317] La création de liaisons covalentes entre les chromophores et la silice permet d'éviter toute diffusion hors des nanoparticules mais aussi d'augmenter le taux de dopage au sein des nanoparticules. Ils ont notamment synthétisé des nanoparticules de silice présentant un transfert d'énergie en cascade avec jusqu'à quatre chromophores commerciaux (Figure III-6).^[318] Ainsi, chaque nanoparticule présente une longueur d'onde d'excitation unique à 405 nm et émet à 460 nm, 540 nm, 590 nm ou 670 nm en fonction des chromophores encapsulés. Le transfert d'énergie extrêmement efficace au sein des nanoparticules permet d'éteindre complètement la fluorescence des différents donneurs et d'obtenir une fluorescence avec des pseudo- déplacements de Stokes importants et de fortes brillances.

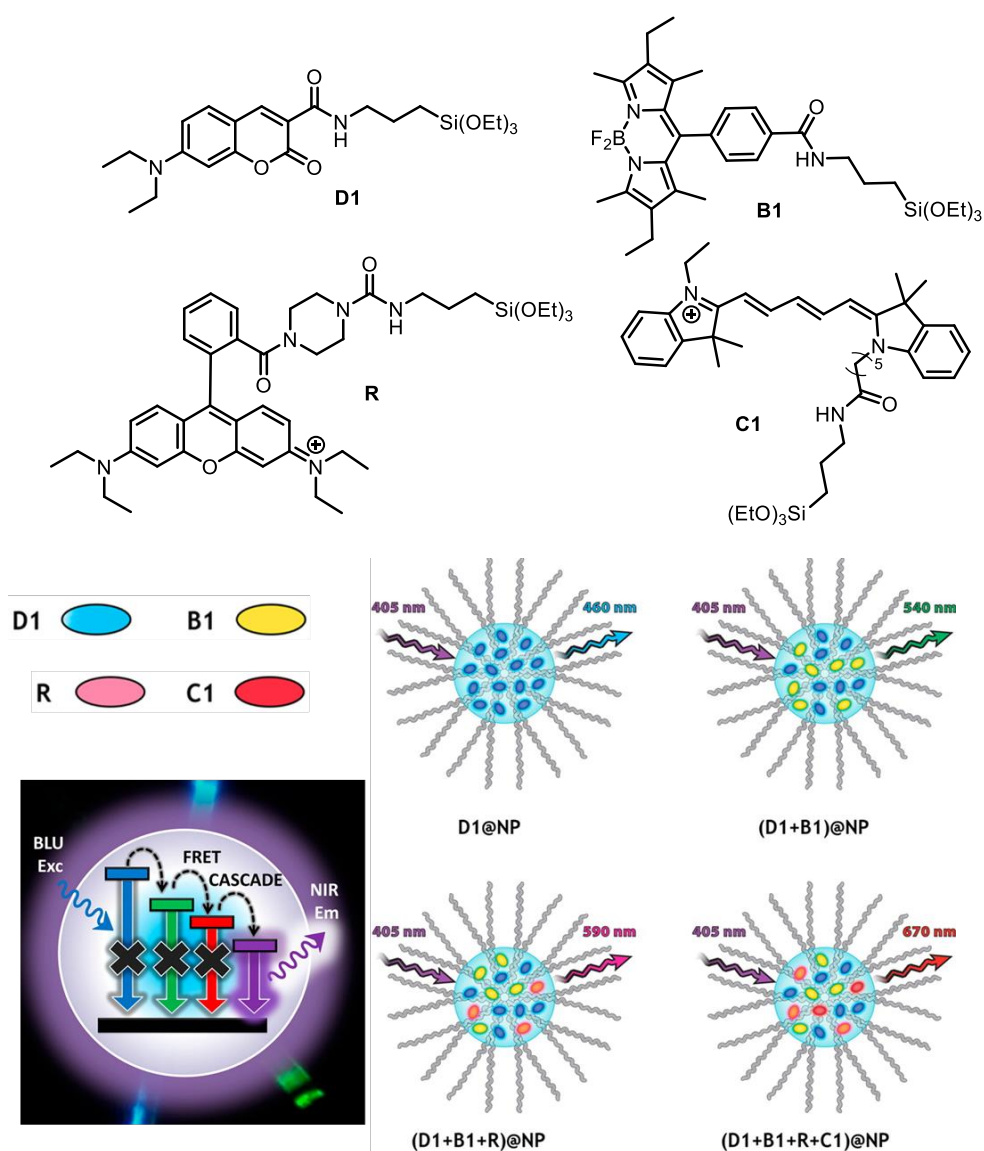


Figure III-6. Nanoparticules pluronic/silice présentant un FRET en cascade en plusieurs chromophores.^[318]

Plus récemment, cette stratégie a été utilisée pour encapsuler des chromophores AIE. Ainsi, le groupe de Liu a encapsulé **TPETPAFN** dans des nanoparticules pluronic/silice (Figure III-7).^[319] Les nanoparticules obtenues sont fortement fluorescentes à 641 nm avec un rendement quantique de 50 %, deux fois plus élevé que celui des nanoagrégats de **TPETPAFN**, grâce à la faible polarité du milieu et à la protection de la couche de silice face à l'eau et au dioxygène. Ces nanoparticules ont permis l'imagerie de fluorescence des vaisseaux sanguins du muscle tibial avec excitation biphotonique.

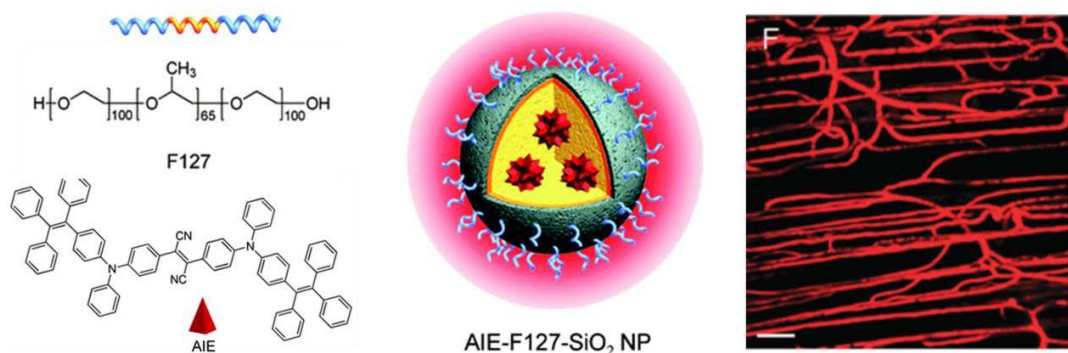


Figure III-7. Nanoparticules pluronic/silice encapsulant **TPETPAFN** et angiographie de fluorescence biphotonique de muscle tibial. Echelle : 50 μm .^[319]

b) Synthèse des nanoparticules pluronic/silice

La procédure de préparation des nanoparticules pluronic/silice utilisée au laboratoire est la suivante : le chromophore est d'abord incorporé dans un film de pluronic F127 par évaporation lente d'une solution dans du DCM sous flux d'argon. Le ratio massique idéal entre le chromophore et le pluronic a été évalué à 0,15 % pour les chromophores basés sur un pont fluorène. Ce film est ensuite redispersé dans une solution d'HCl à 0,85 M afin d'obtenir des micelles contenant le colorant. Puis, l'ajout d'orthosilicate de tétraéthyle (TEOS) permet la croissance d'une coquille de silice par hydrolyse acide du TEOS. La réaction de condensation de la silice est arrêtée par l'ajout de diméthyl-diéthoxysilane. Enfin, les nanoparticules sont purifiées par dialyse afin d'éliminer les réactifs en excès suivie d'une filtration à 0,2 μm .

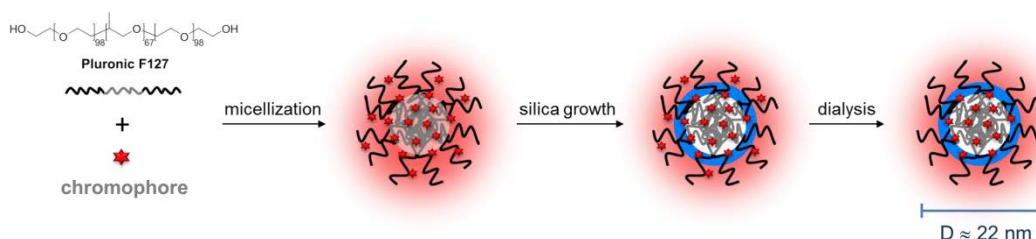


Figure III-8. Encapsulation d'un chromophore au sein de nanoparticules de pluronic F127/silice.^[105]

Les nanoparticules obtenues mesurent environ 20 nm en DLS (Figure III-9). L'imagerie de microscopie électronique en transmission (MET) est en bon accord avec les mesures DLS.

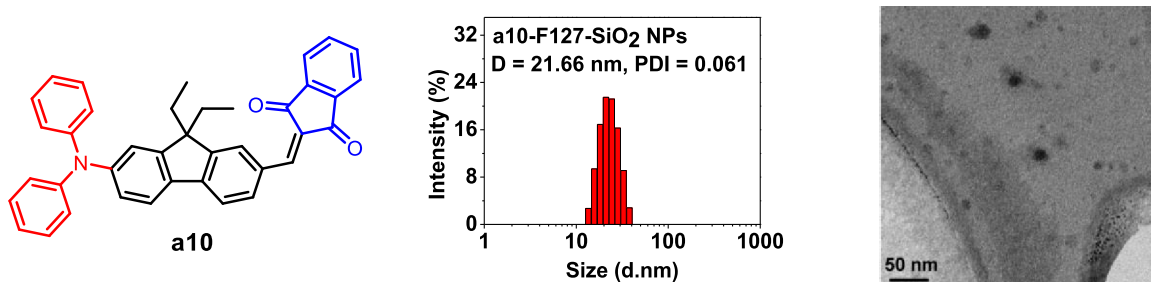


Figure III-9. Structure de **a10** et diamètres hydrodynamiques et imagerie MET des nanoparticules de **a10**.^[105]

Ces nanoparticules possèdent une polarité similaire à un mélange équimolaire de toluène et de chloroforme. Les chromophores sont donc confinés dans une solution solide apolaire. Ces nanoparticules sont particulièrement intéressantes pour les composés fluorescents en solution organique apolaire mais peu fluorescent en agrégats. Par exemple, les nanoparticules de **a10** montrent un rendement quantique de 39 % à 650 nm et ont permis l'imagerie de la vascularisation d'une tumeur sans diffusion apparente dans le système extravasculaire.^[10]

B. Optimisation de la synthèse des nanoagrégats et imagerie cellulaire

1. Molécule modèle pour optimisation

Afin d'optimiser la synthèse des agrégats nous avons utilisé **Ph2NF** comme molécule modèle. Ce composé possède une forte fluorescence en solution avec un rendement quantique de 93 % dans le chloroforme à 511 nm. De plus, **Ph2NF** présente aussi une fluorescence sous forme de poudre avec un rendement de 22 % à 500 nm.

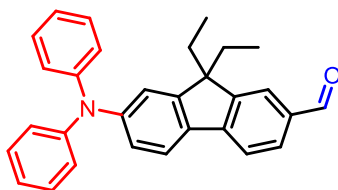


Figure III-10. Structure de **Ph2NF**.

Nous avons étudié sa fluorescence dans des mélanges acétone/eau. **Ph2NF** est fortement fluorescent dans l'acétone. Puis, lorsque la fraction volumique d'eau augmente, l'émission de **Ph2NF** est décalée de manière bathochrome et diminue fortement. Cela est dû à l'augmentation de la polarité du mélange. Au-delà de 70 % d'eau, **Ph2NF** précipite et la fluorescence est progressivement restaurée. Cette précipitation entraîne un décalage hypsochrome de l'émission de presque 100 nm, ce qui suggère une baisse de la polarité de l'environnement des chromophores. Le maximum d'émission est atteint pour 80 % d'eau puis la fluorescence chute légèrement lorsque la fraction d'eau s'élève à 90 %. Le rendement quantique des agrégats de **Ph2NF** dans le mélange contenant 90 % d'eau a été mesuré à 14 %.

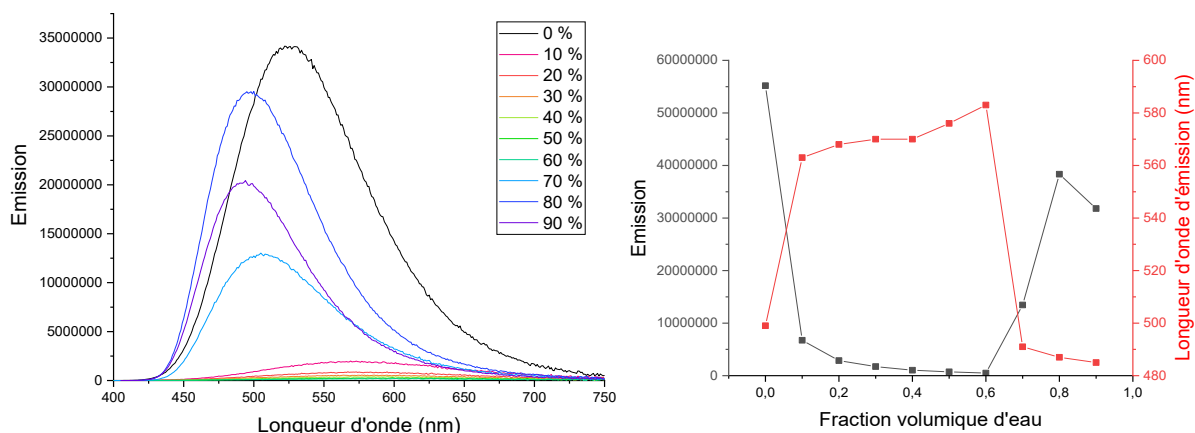


Figure III-11. Gauche : émission de **Ph2NF** dans différents mélanges acétone / eau. Le pourcentage correspond au pourcentage volumique d'eau dans le mélange.

Droite : variation de l'intensité d'émission (noir) et du maximum d'émission (rouge) en fonction de la fraction volumique d'eau.

2. Influence de la fraction volumique acétone/eau

a) Synthèse classique

Nous avons d'abord cherché à connaître l'influence de la proportion acétone/eau lors de la synthèse de nanoagrégats. En effet, lors des études dans des mélanges acétone/eau, la fluorescence maximale est souvent atteinte pour une fraction volumique en eau de 0,8 (comme c'est le cas pour **Ph2NF** dans la Figure III-11). Cependant, toutes les synthèses de nanoagrégats précédemment effectuées dans notre groupe consistent en un ajout de 5 mL d'eau dans 500 μ L d'acétone, soit une fraction volumique en eau de 0,91. Nous avons donc voulu savoir l'impact d'une fraction aqueuse de 0,8 sur les propriétés optiques, ainsi que sur la taille des nanoagrégats stabilisés au pluronic F127.

Pour répondre à cette question, nous avons synthétisé des nanoagrégats de **Ph2NF** avec des pourcentages en eau de 75, 80, 85, 90 et 95 %. Pour chaque synthèse, 250 μ L d'une solution mère à 1 mM en **Ph2NF** dans de l'acétone sont ajoutés dans un vial avec 30 μ L d'une solution de pluronic F127 à 5 mg/mL dans l'acétone (soit environ la même masse de pluronic que de chromophore). Le volume d'acétone est complété jusqu'à entre 1,65 mL (pour 75 %) et 0,28 mL (pour 95 %) et 5 mL d'eau sont ajouté d'un coup afin de former les nanoagrégats. Ces conditions sont résumées dans le Tableau III-1.

	75 %	80 %	85 %	90 %	95 %
$V_{\text{solution colorant à 1 mM}} (\mu\text{L})$	250	250	250	250	250
$V_{\text{F127}} (\mu\text{L})$	30	30	30	30	30
$V_{\text{acétone}} (\mu\text{L})$	1370	970	570	220	0
$V_{\text{total acétone}} (\mu\text{L})$	1650	1250	850	500	280
$V_{\text{eau}} (\text{mL})$	5	5	5	5	5
$C_{\text{colorant finale}} (\mu\text{M})$	37,6	40	42,7	45,5	47,4

Tableau III-1. Volumes introduits de chaque solution et concentration finale en colorant.

Ces conditions ne sont pas optimales car elles conduisent à une variation de la concentration en colorant dans la solution finale d'agrégats. Pour compenser cette variation, les propriétés optiques données dans la Figure III-12 ont été corrigées en les divisant par la concentration moléculaire en colorant dans la solution finale. Cette correction reste légère et n'influence pas l'ordre des courbes.

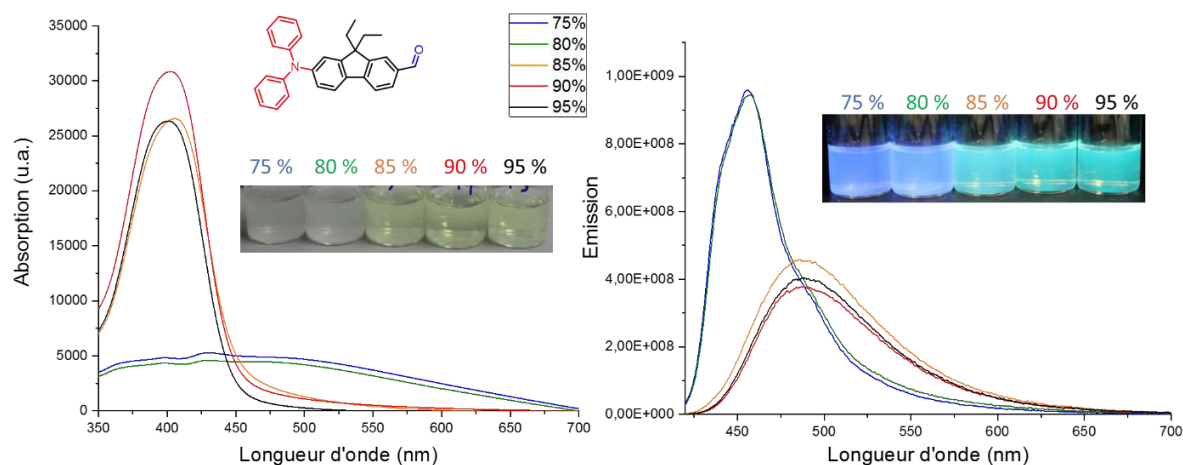


Figure III-12. Absorption et émission des nanoagrégats de **Ph2NF** formés dans différents pourcentages volumiques d'eau, une heure après synthèse. Les courbes d'absorption et d'émission ont été divisées par la concentration en chromophore pour chaque solution. Les inserts correspondent aux photographies des solutions sous lumière visible (gauche) et sous lumière UV (droite, $\lambda = 365$ nm).

Pour ce composé, la formation des agrégats dans des milieux contenant une fraction volumique d'acétone importante entraîne une augmentation de la fluorescence au prix d'un décalage hypsochrome de l'émission et d'un aplanissement de l'absorption. De plus, les agrégats obtenus dans ces conditions sont beaucoup plus gros que les agrégats formés dans des milieux contenant moins d'acétone (Figure III-13). Ainsi, les pourcentages volumiques de 75 % et 80 % donnent des agrégats d'environ 600 nm de diamètre, bien plus que les tailles obtenues avec des fractions d'eau supérieures (entre 140 nm pour 85 % d'eau et 120 nm pour 90 et 95 % d'eau).

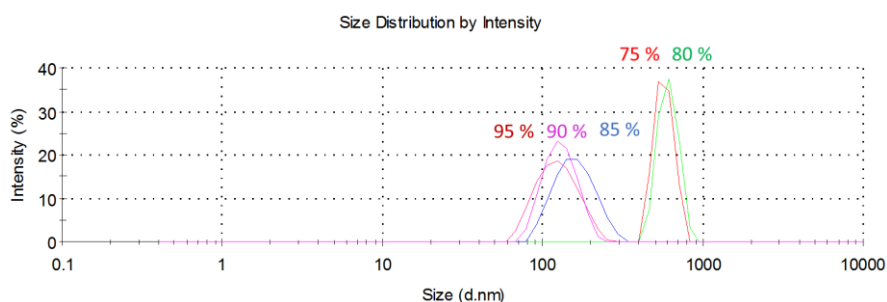


Figure III-13. Diamètres hydrodynamiques des nanoagrégats de **Ph2NF** formés dans différents pourcentages volumiques d'eau.

Ces différences optiques et morphologiques proviennent d'une cristallisation rapide des nanoagrégats lorsque la proportion d'acétone est élevée. En effet, dans ce cas, les agrégats sont formés dans le domaine dit « de microémulsion » sur le diagramme ternaire eau/acétone/**Ph2NF**. Dans ces conditions, la quantité importante d'acétone entraîne une mobilité non-négligeable du chromophore dans la phase continue. Ces conditions favorisent la croissance des agrégats par murissement d'Ostwald mais aussi une nucléation qui mène à la formation de nanocristaux de taille élevée. Ainsi, la modification impressionnante des propriétés optiques correspond à une émission induite par cristallisation (CIE).^[266,320]

A l'inverse, la diminution de la proportion d'acétone permet de passer la courbe binodale et d'entrer dans le domaine Ouzo, ici dès 85 % d'eau. La méthode de déplacement de solvants dans ces conditions mène à la formation d'agrégats amorphes, monodisperses et relativement stables au cours du temps.^[321,322]

Ainsi, la modification des conditions de formation des agrégats nous permet d'obtenir les formes amorphes ou cristallines des agrégats et donc de contrôler leurs propriétés morphologiques et optiques. Cependant, bien qu'intéressante, cette cristallisation dans le domaine de microémulsion se fait de manière non-contrôlée et mène à des agrégats difficilement utilisables pour l'imagerie *in vivo*. En effet, les diamètres au-delà de 200 nm des nanocristaux entraîneront un captage rapide par le système réticulo-endothélial.

b) Ajout d'une étape de trempe

Un moyen pour éviter toute cristallisation non contrôlée consiste à diminuer la fraction volumique d'acétone rapidement après la nanoprécipitation. Pour cela, le meilleur moyen est d'effectuer une trempe en rajoutant une grande quantité d'eau immédiatement après synthèse, idéalement jusqu'à obtenir une fraction volumique d'eau supérieure à 0,95. Pour une efficacité améliorée, cette trempe peut être suivie d'une évaporation sélective de l'acétone à l'aide d'un évaporateur rotatif.

Nous avons donc recommencé l'expérience précédente en ajoutant un deuxième volume d'eau immédiatement après la synthèse des agrégats. Les volumes de chaque solution utilisée pour la synthèse des agrégats sont résumés dans le Tableau III-2. Comme dans l'expérience précédente, la concentration du colorant dans la solution d'agrégats finale varie légèrement et les spectres d'absorption et d'émission ont été corrigés.

	75 %	80 %	85 %	90 %	95 %
V_{solution colorant à 1 mM} (μL)	250	250	250	250	250
V_{F127} (μL)	30	30	30	30	30
V_{acétone} (μL)	1370	970	570	220	0
V_{total acétone} (μL)	1650	1250	850	500	280
V_{eau} (mL)	5	5	5	5	5
V_{eau trempe} (mL)	5	5	5	5	5
C_{colorant finale} (μM)	21,5	22,2	23,0	23,8	24,3

Tableau III-2. Volumes introduits de chaque solution et concentration finale en colorant.

L'ajout d'une étape de trempe a permis de limiter la cristallisation incontrôlée des agrégats. Ainsi tous les agrégats possèdent un maximum d'absorption à 400 nm et d'émission à 490 nm. L'intensité maximale d'émission est obtenue pour 80 % et les agrégats formés à 95 % d'eau sont les moins fluorescents.

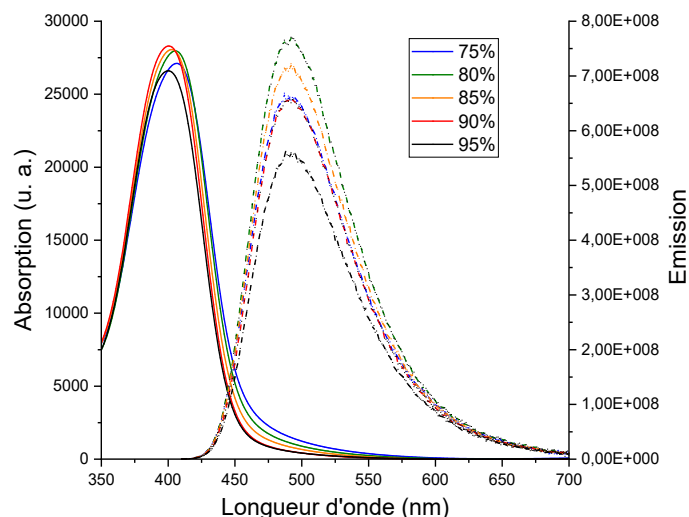


Figure III-14. Absorption (lignes pleines) et émission (pointillées) des agrégats de **Ph2NF** formés à différents pourcentages volumiques d'eau.

Concernant les tailles des agrégats, plus la fraction d'acétone est faible, plus les agrégats sont petits (Figure III-15). Ainsi, les agrégats formés avec 75 % d'eau mesurent 166 nm par DLS alors que les agrégats formés avec 90 ou 95 % d'eau font 115 nm.

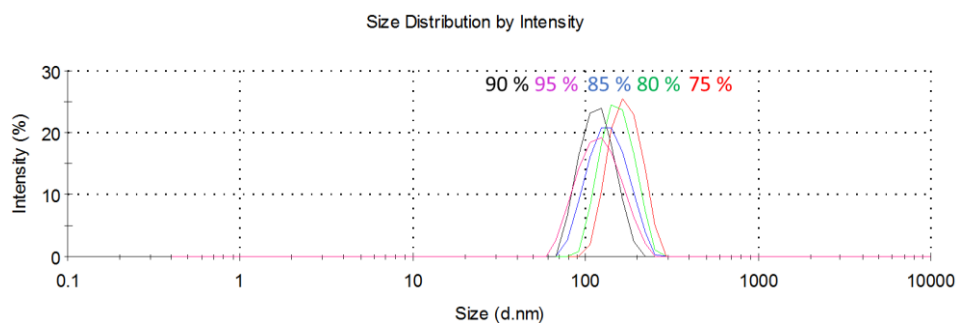


Figure III-15. Diamètres hydrodynamiques des nanoagrégats de **Ph2NF** formés dans différents pourcentages volumiques d'eau.

Au final, les agrégats formés à 80 % sont plus fluorescents que ceux formés à 90 % d'eau. Cependant, cette différence est relativement peu significative comparée à l'augmentation de 40 nm du diamètre hydrodynamique. Nous avons donc décidé de conserver le pourcentage volumique d'eau de 90 % pour la synthèse des agrégats qui permet l'obtention des agrégats les plus petits.

3. Influence de la concentration initiale de colorant

Dans un deuxième temps, nous avons voulu étudier l'influence de la concentration en colorant dans la solution d'acétone lors de la préparation des nanoagrégats.

Pour cela, nous avons préparé six solutions d'acétone de 550 μ L contenant la même quantité de pluronic (0,25 mg) et une concentration croissante en fluorophores entre 0,09 mM (0,02 mg) et 0,91 mM (0,21 mg). A ces solutions, nous avons ajouté deux fois 5 mL d'eau afin d'effectuer la nanoprécipitation puis une trempe. Les concentrations finales en colorant dans les solutions d'agrégats sont comprises entre

4,7 μM et 47 μM . Les conditions de synthèse des six solutions d'agrégats sont résumées dans le Tableau III-3.

	50 μL	100 μL	200 μL	300 μL	400 μL	500 μL
$V_{\text{solution colorant à 1 mM}} (\mu\text{L})$	50	100	200	300	400	500
$V_{\text{F127}} (\mu\text{L})$	50	50	50	50	50	50
$V_{\text{acétone}} (\mu\text{L})$	450	400	300	200	100	0
$V_{\text{total acétone}} (\mu\text{L})$	550	550	550	550	550	550
$C_{\text{colorant initiale}} (\text{mM})$	0,09	0,18	0,36	0,55	0,72	0,91
$V_{\text{eau}} (\text{mL})$	5	5	5	5	5	5
$V_{\text{eau trempe}} (\text{mL})$	5	5	5	5	5	5
$C_{\text{colorant finale}} (\mu\text{M})$	4,7	9,5	19,0	28,4	38,0	47,4

Tableau III-3. Volumes introduits de chaque solution et concentration en colorant dans la solution d'acétone avant synthèse des agrégats et dans la solution finale.

Nous avons mesuré les tailles et les propriétés optiques des agrégats le lendemain de la synthèse. La Figure III-16 expose les courbes d'absorption et d'émission des solutions d'agrégats préparés avec différentes concentrations initiales en colorant ainsi que la variation de l'absorbance et de l'intégrale de l'émission avec la concentration en colorant.

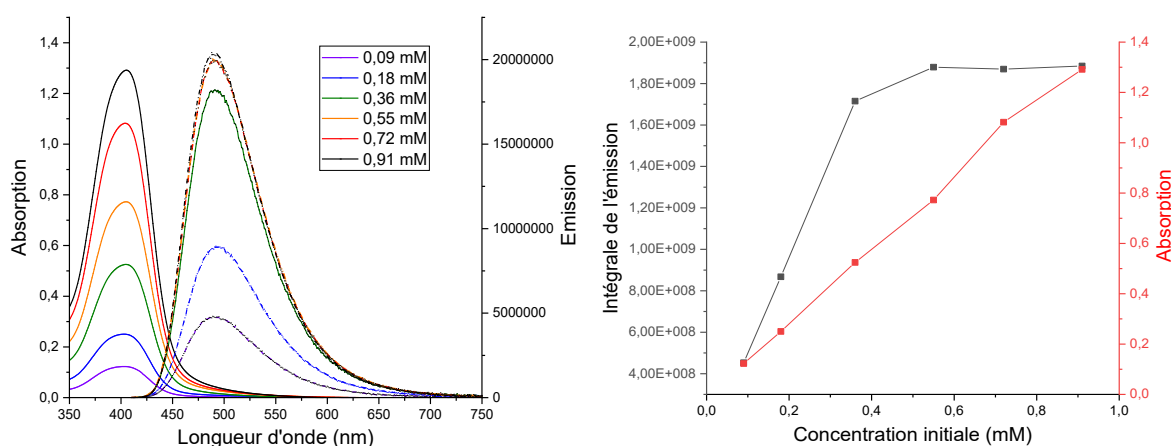


Figure III-16. Gauche : absorption (lignes pleines) et émission (pointillées) des agrégats formés à différentes concentrations initiales en **Ph2NF**. Droite : variation de l'intégrale d'émission (noir) et du maximum d'absorption (rouge) en fonction de la concentration initiale en **Ph2NF**.

Dans cette gamme de concentrations et pour ce chromophore, l'absorption varie de manière quasi-linéaire avec la concentration initiale en colorant. A l'inverse, l'émission atteint un plateau entre 0,36 mM et 0,55 mM de colorant dans la solution d'acétone. La reabsorption ne semble pas être une explication satisfaisante au vu du faible recouvrement entre les spectres d'absorption et d'émission des agrégats de **Ph2NF**. Une autre explication pourrait être la formation d'agrégats plus gros lorsque la quantité de chromophore est trop élevée. Néanmoins, la mesure des diamètres hydrodynamiques des agrégats par DLS ne révèle aucune différence significative de taille entre les agrégats formés à basses concentrations et ceux à hautes concentrations (Figure III-17). Il pourrait être intéressant de vérifier la morphologie des agrégats par MEB ou par microscope électronique à transmission.

Ce résultat est à l'encontre d'une étude du groupe d'Ishow dans laquelle l'augmentation de la concentration initiale en colorant entraîne un accroissement de la taille des nanoparticules de 80 nm à 180 nm.^[323] Deux différences entre les deux études sont à noter : le groupe d'Ishow n'utilisent pas d'agent tensioactif et utilisent des solutions beaucoup plus concentrées (0,7-14 mM).

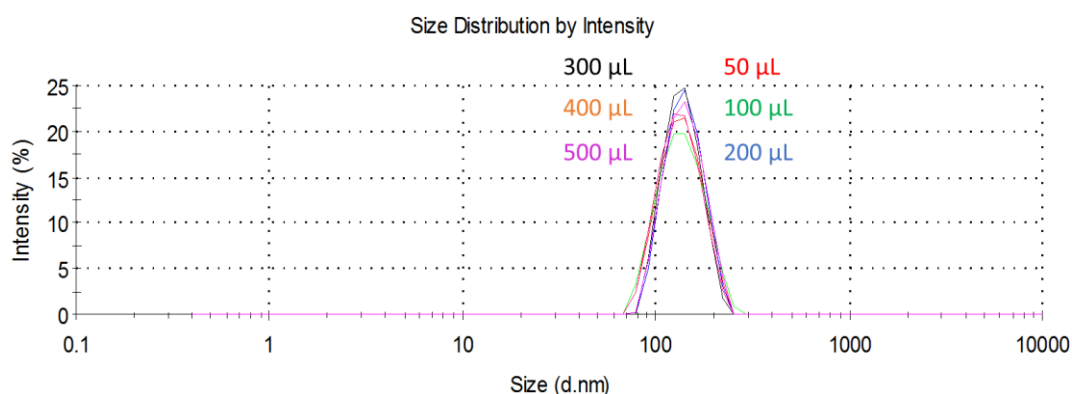


Figure III-17. Diamètres hydrodynamiques des agrégats de **Ph2NF** synthétisés avec différentes concentrations initiales en colorant.

Ainsi, pour l'imagerie de fluorescence, il est donc à priori inutile de former les nanoagrégats avec une concentration initiale en colorant trop élevée. Si l'application nécessite une concentration élevée, il vaut mieux former les nanoagrégats avec une concentration moyenne en colorant et concentrer les nanoagrégats dans un deuxième temps, par évaporation de l'eau.

4. Bilan

Sur une molécule modèle, **Ph2NF**, nous avons d'abord étudié l'influence de la fraction volumique d'eau initiale sur les propriétés optiques et la taille des nanoagrégats. Nous avons constaté que si les agrégats sont préparés avec moins de 85 % d'eau, la forte mobilité des molécules organiques dans la solution riche en acétone entraîne une cristallisation rapide des agrégats. Cette cristallisation se traduit par une augmentation conséquente de la taille des agrégats ainsi qu'une variation importante des propriétés optiques. Nous avons montré que l'ajout d'une étape de trempe permet de retarder, au moins temporairement, la transition amorphe/cristallin incontrôlée au sein des agrégats. Cette trempe permet de diminuer la proportion d'acétone et donc la mobilité des chromophores et peut être suivie d'une évaporation de l'acétone à l'aide d'un évaporateur rotatif.

Ensuite, nous avons synthétisé des agrégats en variant la concentration en colorant dans la fraction d'acétone initiale. Pour **Ph2NF** et dans la gamme de concentration étudiée, la modification de la concentration initiale en colorant n'a que peu d'influence sur les tailles des agrégats obtenus et sur l'absorption de ces agrégats, qui varie de manière quasi-linéaire avec la concentration. En revanche, nous avons observé que l'émission atteignait rapidement un plateau.

A partir de ces quelques expériences d'optimisation, nous avons décidé de modifier la synthèse des nanoagrégats en ajoutant une trempe pour stabiliser les agrégats formés. Cette trempe sera suivie par l'évaporation rapide de l'acétone à l'aide d'un évaporateur rotatif. Ainsi, la synthèse modèle des agrégats

qui sera utilisée par la suite est la suivante : 550 μL d'une solution d'acétone est formée à partir de 250 μL de solution mère en chromophore à 1 mM, 50 μL d'une solution de pluronic F127 à 5 mg/mL et 250 μL d'acétone. A cette solution sont ajoutés rapidement 5 mL d'eau distillée puis de nouveau 5 mL d'eau distillée afin d'effectuer la trempe. L'acétone est évaporée du mélange à l'aide d'un évaporateur rotatif. Finalement, les agrégats sont filtrés à 0,2 μm au travers de filtre en cellulose régénérée.

C. Propriétés optiques des chromophores en agrégats

Dans cette partie, nous allons présenter les propriétés optiques en agrégats des chromophores synthétisés dans le chapitre précédent. Les structures des chromophores sont rappelées dans la Figure III-18.

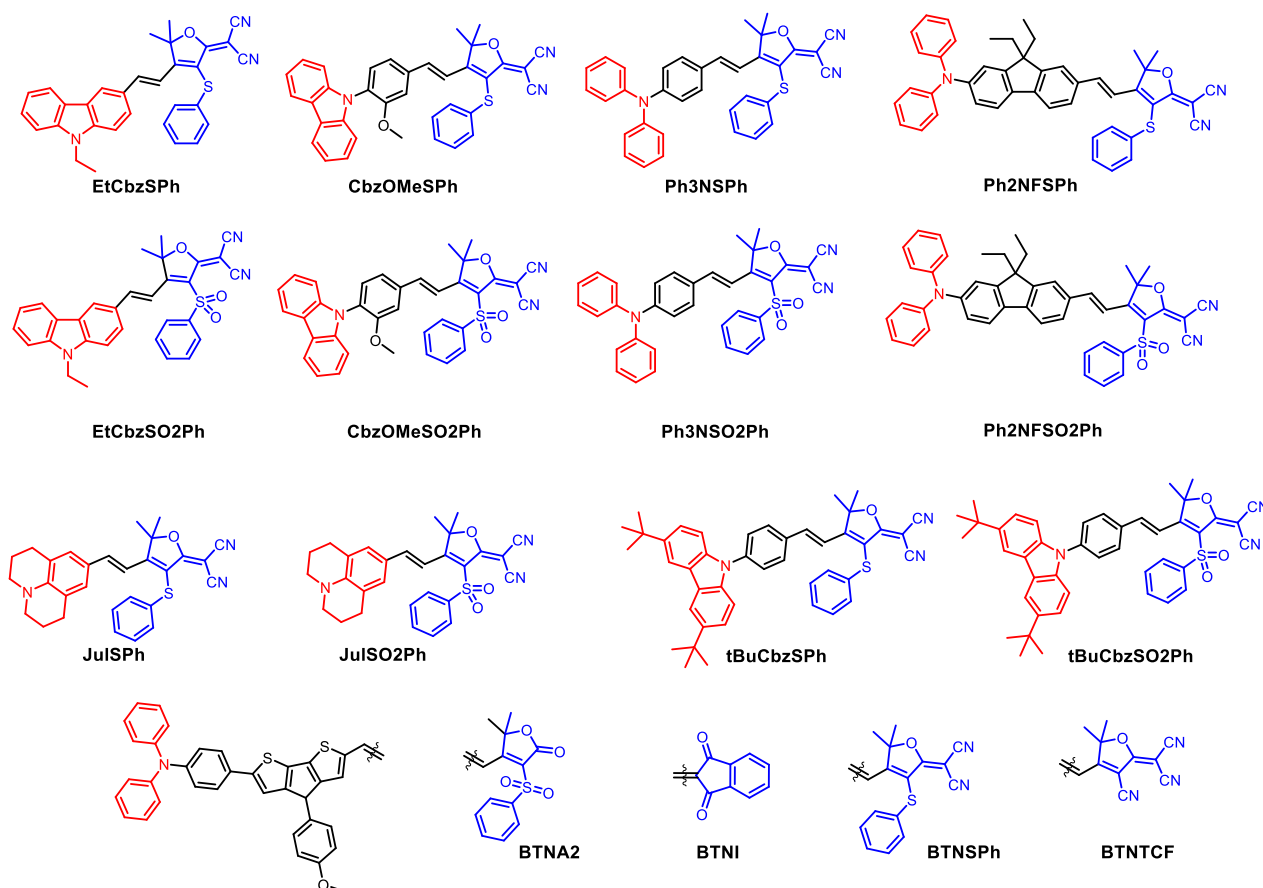


Figure III-18. Structure des chromophores étudiés en agrégats.

1. Propriétés spectroscopiques des chromophores en mélanges acétone/eau

Nous avons tout d'abord étudié la fluorescence des chromophores dans des mélanges acétone/eau à une concentration de 10 μM , sans agent tensioactif. Deux cas de figure ont été rencontrés lors de l'augmentation de la fraction volumique d'eau : l'accroissement (AIE) de la fluorescence ou son extinction (ACQ). Ces cas de figure coïncident plutôt bien avec la propriété de fluorescence à l'état solide des fluorophores. Ainsi, les chromophores ne présentant pas de fluorescence à l'état solide possèdent un caractère ACQ.

a) Chromophores avec un caractère ACQ

Quelques chromophores possèdent un caractère ACQ, soit une extinction de la fluorescence lors du passage solution-agrégats. Ces chromophores sont ceux basés sur le donneur julolidine, **JuISPh** et **JuISO2Ph**, ainsi que ceux basés sur le pont conjugué dithiénopyrrole : **BTNSPh**, **BTNI**, **BTNA2** et **BTNTCF**. La Figure III-19 présente les spectres d'absorption et d'émission de **JuISPh** dans différents mélanges acétone/eau.

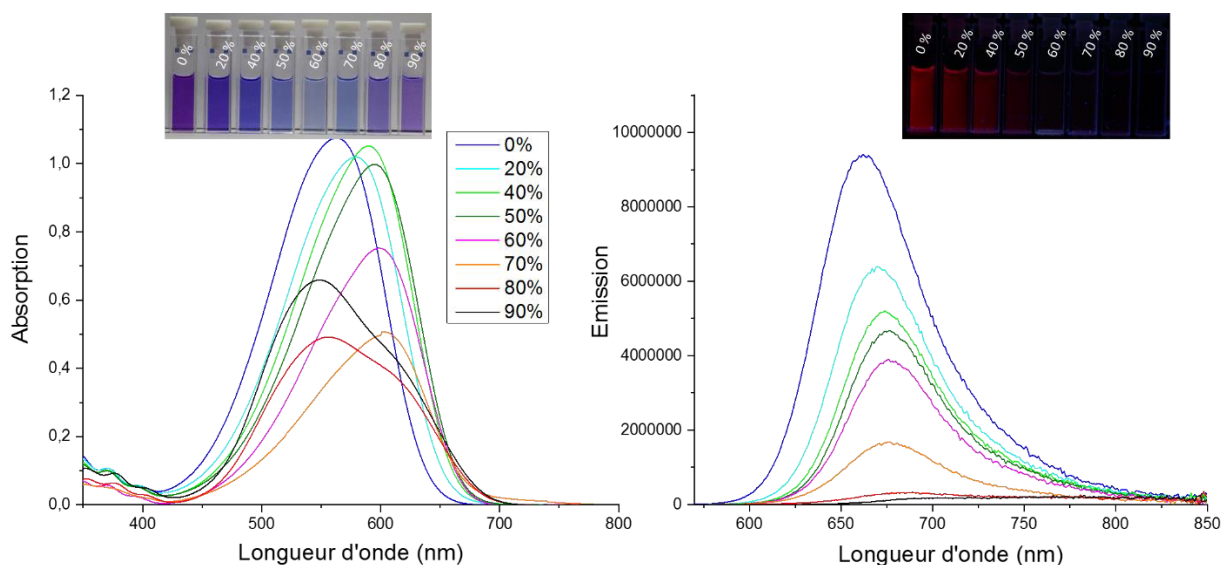


Figure III-19. Propriétés optiques de **JuISPh** dans différents mélanges acétone/eau. Les pourcentages correspondent à la proportion d'eau dans le mélange.

Entre 0 % d'eau et 70 % d'eau, les spectres d'absorption et d'émission de **JuISPh** sont décalés vers le rouge suite à l'augmentation de la polarité du milieu. Cette augmentation de la polarité entraîne une diminution de la fluorescence du chromophore. Au-delà de 70 %, la précipitation du chromophore engendre un fort décalage hypsochrome de l'absorption ainsi que l'extinction de la fluorescence, signes d'une agrégation de type H.

Similairement, les autres composés **JuISO2Ph** et les dithiénopyrrole présentent aussi une agrégation H et une extinction de leur fluorescence en agrégats.

b) Chromophores AIE

A l'inverse, les autres composés présentent une augmentation de la fluorescence lors de la précipitation.

Les composés **tBuCbzSPh** et **tBuCbzSO2Ph** sont particulièrement intéressants car ils présentent un excellent caractère « turn-on » pendant le passage acétone-agrégats. Par exemple, pour **tBuCbzSPh**, à la concentration de 10 μ M (Figure III-20), la précipitation a lieu entre 50 % et 60 % d'eau. Cette précipitation entraîne un décalage bathochrome de l'absorption de 450 nm à 475 nm et l'apparition d'une fluorescence intense à 660 nm. Cette fluorescence dans la fenêtre biologique devrait être avantageuse pour l'imagerie *in vivo*.

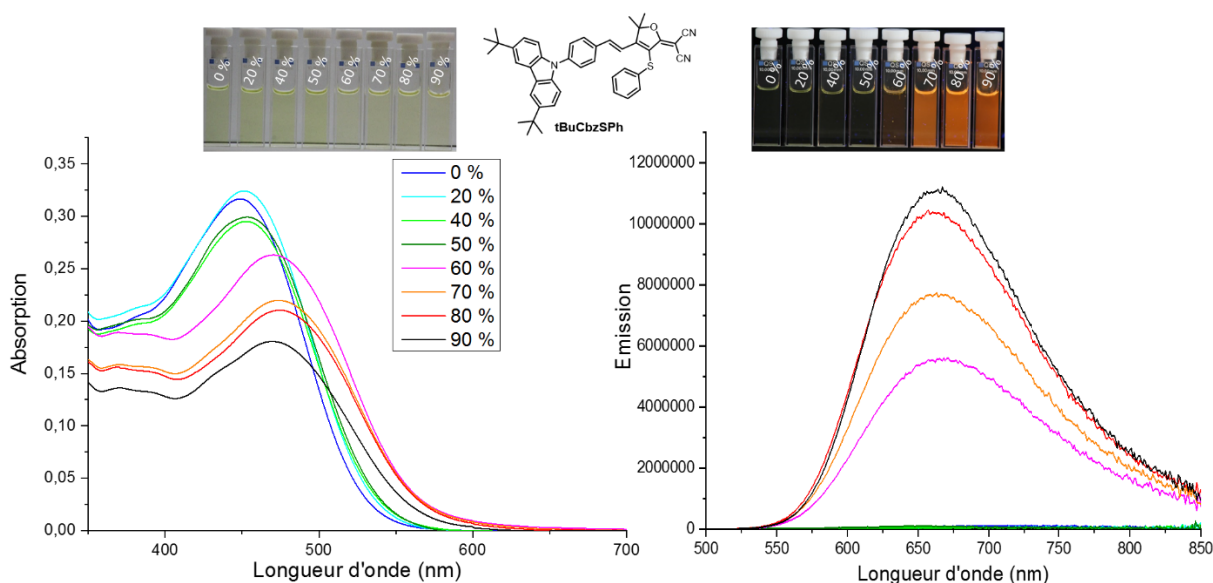


Figure III-20. Spectres d'absorption (gauche) et d'émission (droite) de **tBuCbzSPh** dans différents mélanges acétone/eau. Les pourcentages correspondent à la proportion d'eau dans le mélange.

Les spectres d'absorption et d'émission normalisés dans un mélange acétone/eau 10:90 des autres chromophores sont représentés dans la Figure III-21. Selon le chromophore, l'absorption varie de 425 nm pour **CbzOMeSPh** à 550 nm pour **Ph3NSO2Ph** et **Ph2NFSO2Ph**. Les maxima d'émission des agrégats de cette série couvrent une gamme de 200 nm entre 640 nm et 840 nm avec la quasi-totalité des chromophores possédant leur maximum d'émission dans la fenêtre de transparence biologique.

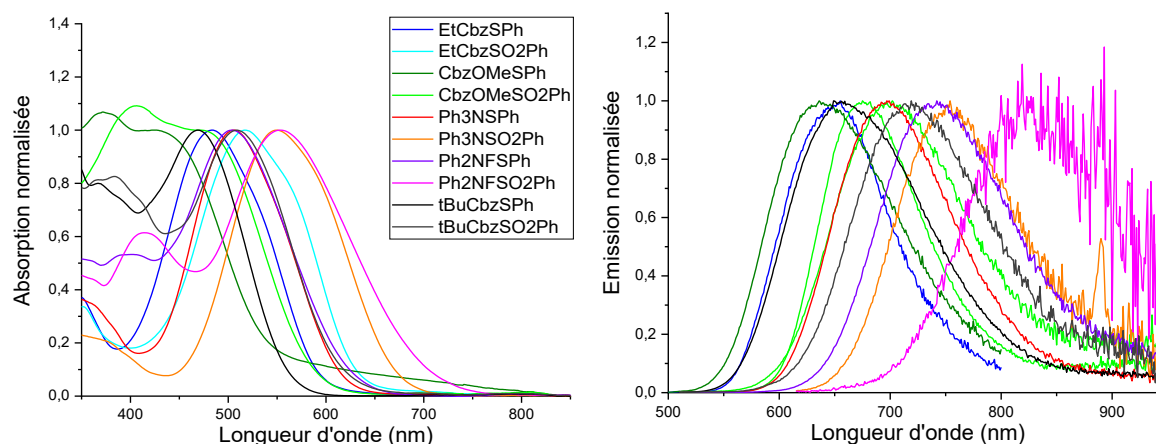


Figure III-21. Spectres d'absorption (gauche) et d'émission (droite) normalisés des agrégats dans un mélange acétone/eau 10:90.

Les rendements quantiques de fluorescence des agrégats dans un mélange acétone/eau 10:90 ont été mesurés avec comme références la coumarine 153 (pour **EtCbzSPh** et **CbzOMeSPh**), le styril 9M (**Ph2NFSO2Ph** et **Ph3NSO2Ph**) ou le rubrène (pour le reste des fluorophores). Les propriétés optiques ainsi que les rendements quantiques en agrégats et en poudre sont résumées dans le Tableau III-4.

Fluorophore	Acétone/eau 10:90			Poudre	
	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	ϕ (%)	λ_{em} (nm)	ϕ (%)
EtCbzSPh	484	650	6	635	24
EtCbzSO2Ph	517	675	4	670	9
CbzOMeSPh	425	640	8	640	46
CbzOMeSO2Ph	478	700	3	664	9
Ph3NSPh	505	697	8	690	15
Ph3NSO2Ph	550	750	4	690	3
Ph2NFSPh	505	740	5	700	28
Ph2NFSO2Ph	555	825	2	820	1
tBuCbzSPh	470	660	16	660	29
tBuCbzSO2Ph	505	720	2	710	8

Tableau III-4. Propriétés optiques des chromophores dans des mélanges acétone/eau 10:90 et comparaison avec les propriétés optiques en poudre.

Par rapport aux poudres, les agrégats de ces chromophores présentent des maxima d'émission décalés de manière bathochrome ainsi qu'une diminution significative des rendements quantiques. Par exemple, les agrégats de **Ph2NFSPh** émettent à 740 nm avec un rendement quantique de 5 % ce qui correspond, par rapport à la poudre, à un décalage de 40 nm pour un rendement quantique cinq fois plus faible. Ces différences proviennent d'une part de la formation d'agrégats amorphes aux arrangements intermoléculaires différents de ceux de la poudre cristalline, mais aussi du milieu extérieur aux agrégats fortement polaire.

Bien que les rendements quantiques soient plus faibles qu'en poudre avec ce type de nanoparticules, cette série comporte plusieurs candidats prometteurs pour l'imagerie de fluorescence.

2. Synthèse de nanoagrégats pour l'imagerie cellulaire

Quelques composés nous ont semblé particulièrement avantageux pour l'imagerie cellulaire : **CbzOMeSPh**, **tBuCbzSPh**, **Ph3NSPh** et **Ph2NFSPH** (Figure III-22). En effet, ces composés présentent une forte fluorescence dans un mélange acétone/eau 10:90 avec un maximum d'émission respectivement à 640 nm, 660 nm, 697 nm et 740 nm. Bien qu'il ait aussi été intéressant d'utiliser les agrégats les plus décalés vers le rouge, **Ph3NSO2Ph** et **Ph2NFSPH**, nous ne les avons pas sélectionnés à cause de la limite à 740 nm du détecteur du microscope biphotonique.

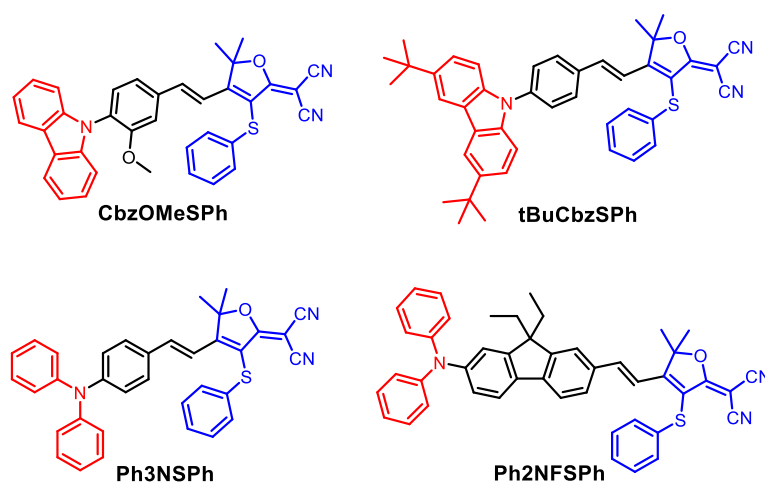


Figure III-22. Structures des chromophores sélectionnés pour l'imagerie cellulaire.

a) Synthèse et caractérisation des agrégats

Pour l'imagerie cellulaire, les agrégats ont été formés en utilisant du tampon phosphate salin (PBS) au lieu d'eau distillée. Afin d'améliorer la stabilité des agrégats et afin d'éliminer complètement les traces d'acétone, une étape de trempage suivie de l'évaporation de l'acétone à l'aide d'un évaporateur rotatif ont été réalisées. Les solutions sont filtrées à 0,2 μm afin d'éliminer d'éventuels agrégats volumineux ou poussières. Les agrégats sont obtenus avec une concentration moléculaire en colorant finale de 24 μM .

Similairement à ce qui a été obtenu dans des mélanges acétone/eau, les agrégats présentent un maximum d'absorption entre 450 nm et 515 nm et un maximum d'émission entre 640 nm et 740 nm, comme cela est visible dans la Figure III-23. Les rendements quantiques de fluorescence des agrégats de **CbzOMeSPh**, **tBuCbzSPh**, **Ph3NSPh** et **Ph2NFSPH** ont été mesurés à respectivement 10 %, 11 %, 7 % et 6 % par rapport au rubrène.

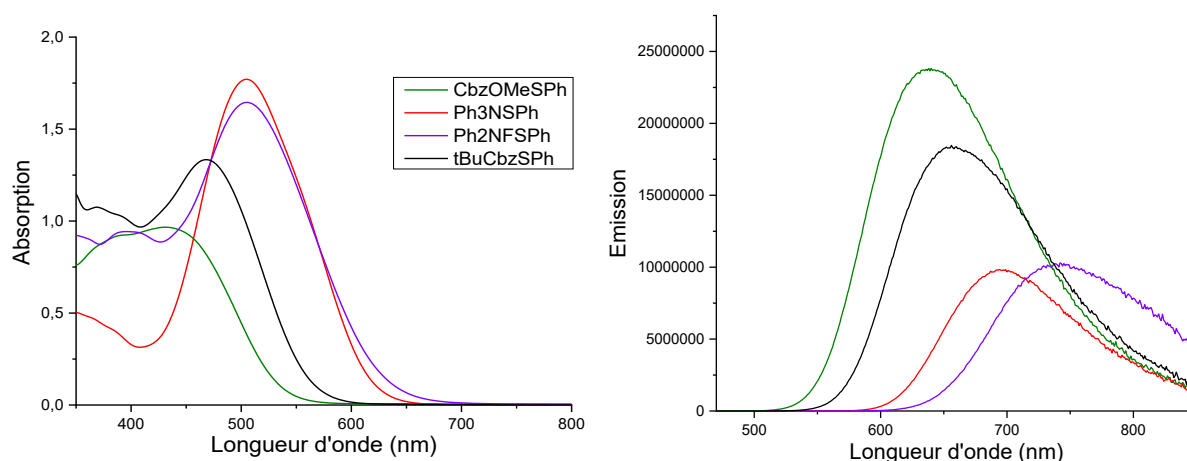


Figure III-23. Spectres d'absorption et d'émission des agrégats pour l'imagerie à 25 μM en colorant dans le PBS. L'excitation est effectuée au maximum d'absorption.

Des mesures DLS nous ont permis d'obtenir les tailles des agrégats formés. Les agrégats de **Ph2NFSPH** sont les plus petits avec un diamètre de 68 nm alors que les autres agrégats mesurent environ 90 nm.

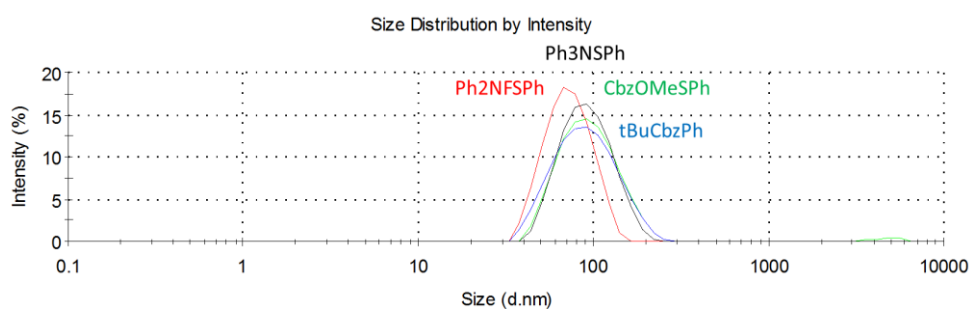


Figure III-24. Diamètres hydrodynamiques des agrégats pour l'imagerie cellulaire.

b) Imagerie cellulaire

L'imagerie cellulaire a été faite en collaboration avec Damien Curton à l'ENS de Lyon pour la culture cellulaire et l'incubation ainsi qu'avec Christophe Chamot au PLATIM pour l'utilisation du microscope biphotonique.

Nous avons fait deux séances d'imagerie cellulaire. Dans la première, les solutions d'agrégats décrites ci-dessus sont diluées au neuvième avec du milieu de culture. Les cellules HeLa sont incubées à 37 °C pendant deux heures avec ces solutions diluées, de concentration 2,6 μM en colorant. Puis, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS pour finalement être reprises dans une solution de Sérum de Veau Fœtal à 10 % dans du PBS jusqu'à l'imagerie.

Les cellules ont ensuite été observées au microscope sous excitation biphotonique à 880 nm pour **CbzOMeSPh**, 940 nm pour **tBuCbzSPh** et 1000 nm pour **Ph3NSPh** et **Ph2NFSPH**. La détection est effectuée en mode Lambda : les photons émis sont séparés en fonction de leur longueur d'onde et sont collectés sur 24 détecteurs.

Curieusement, c'est le composé le moins fluorescent **Ph3NSPh** qui a donné les meilleurs résultats. Les agrégats de ce fluorophore pénètrent bien à l'intérieur des cellules et marquent principalement le cytosquelette avec une fluorescence rouge. Outre le cytosquelette, des petites sphères fluorescentes en jaune peuvent aussi être observées. Ces sphères semblent correspondre à des organites à l'intérieur des cellules, aussi marqués avec les agrégats de **Ph3NSPh**. La fluorescence de ces organites est décalée vers le bleu par rapport au cytosquelette et démontre donc une polarité plus faible à l'intérieur de ces organites. Ces organites peuvent correspondre à des gouttelettes lipidiques, des organelles riches en lipides.^[91,248,324]

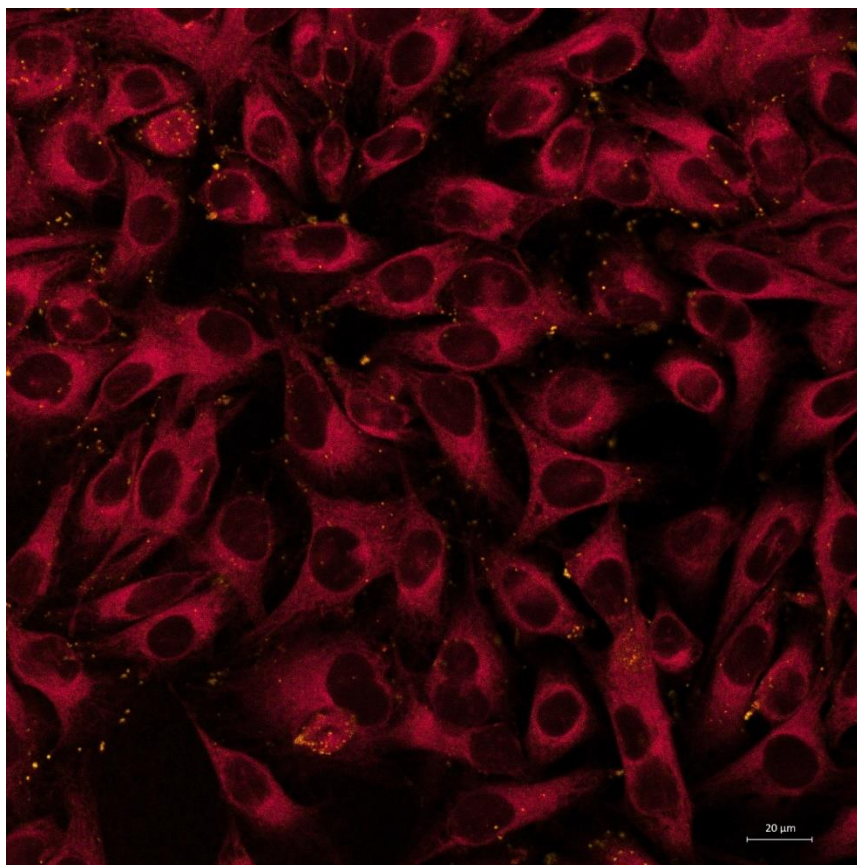


Figure III-25. Imagerie biphotonique de cellules HeLa incubées pendant 2h avec **Ph3NSPh**. Excitation à 1000 nm.

Le mode Lambda nous permet de définir une région d'intérêt (ROI) et d'obtenir la réponse de chacun des détecteurs dans cette région d'intérêt de l'image. Cela nous permet de tracer le spectre de fluorescence dans ce ROI. Nous avons donc défini deux régions : une dans le cytosquelette (ROI rouge) et une dans les organites décalés de manière hypsochrome (ROI jaune).

Le premier constat des spectres de fluorescence dans ces deux ROI est que le signal est coupé brutalement à 670 nm. Il est possible que cela provienne du filtre dichroïque MBS 690+. Cette coupure du signal dès 670 nm entraîne une perte significative du signal global et devra donc être investiguée pour les prochaines séances d'imagerie cellulaire.

Malgré cette coupure qui peut altérer la position des maxima, les spectres tracés nous permettent d'estimer le décalage hypsochrome entre la fluorescence dans le cytosquelette et celle dans les organites à environ 30 nm. Cependant, les maxima ne sont pas directement comparables à nos études de solvatochromisme à cause de corrections différentes entre notre fluorimètre et le microscope biphotonique.

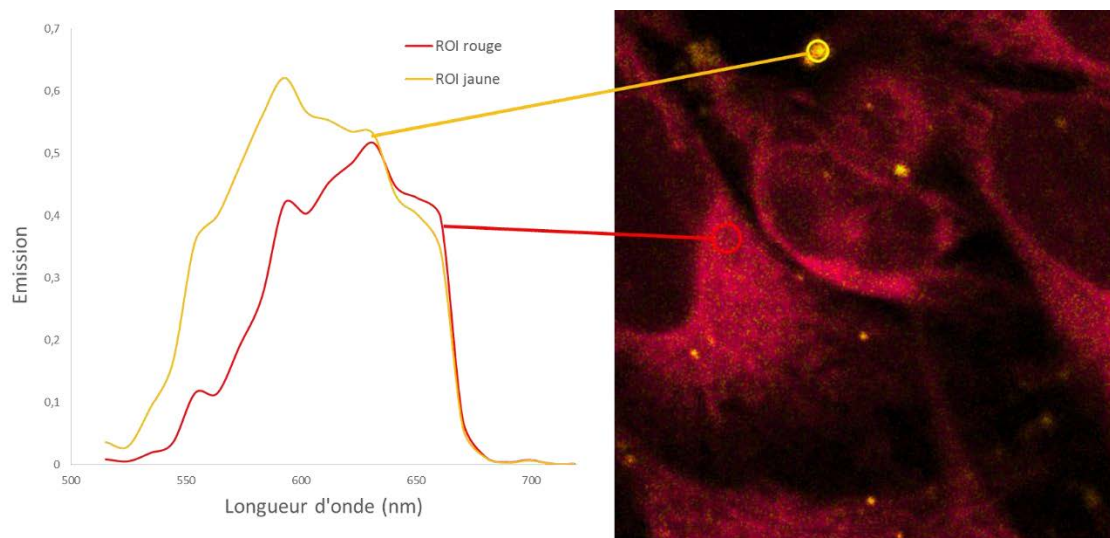


Figure III-26. Spectres de fluorescence et localisation des ROI rouge et jaune. Excitation à 1000 nm.

Concernant les autres fluorophores, les agrégats de **CbzOMeSPh** ont pu être observés à l'intérieur des cellules avec, cependant, un signal très faible, sous excitation biphotonique (Figure III-27, gauche) ou monophotonique. Comme pour **Ph3NSPh**, ce chromophore semble marquer des éléments du cytoplasme et ne pénètre pas dans le noyau.

Concernant **tBuCbzSPh**, nous avons observé seulement le marquage d'une unique cellule, probablement morte au vu de sa morphologie (Figure III-27, droite). Il semblerait que les agrégats de **tBuCbzSPh** n'aient pas pu pénétrer à l'intérieur des cellules ou alors qu'ils en soient ressortis pendant les lavages.

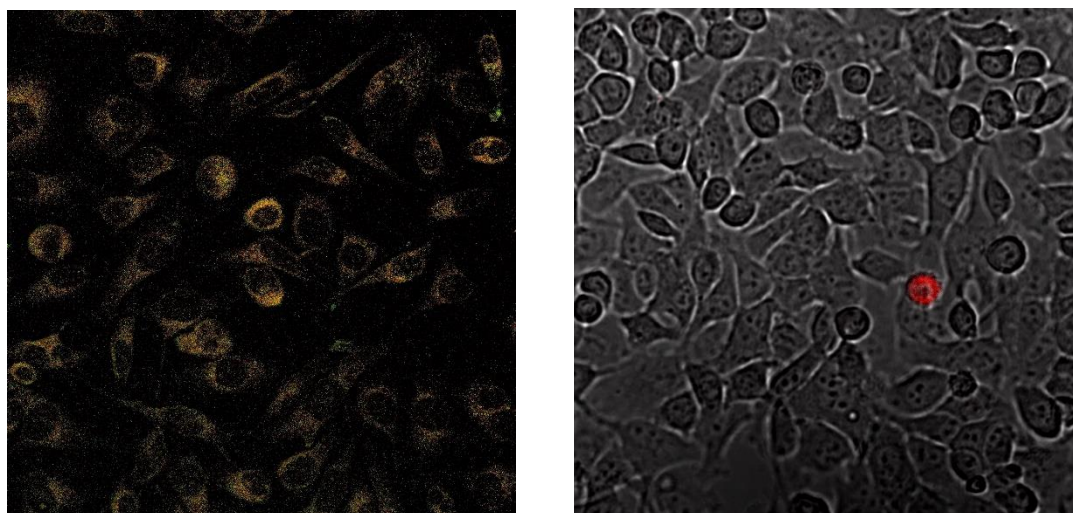


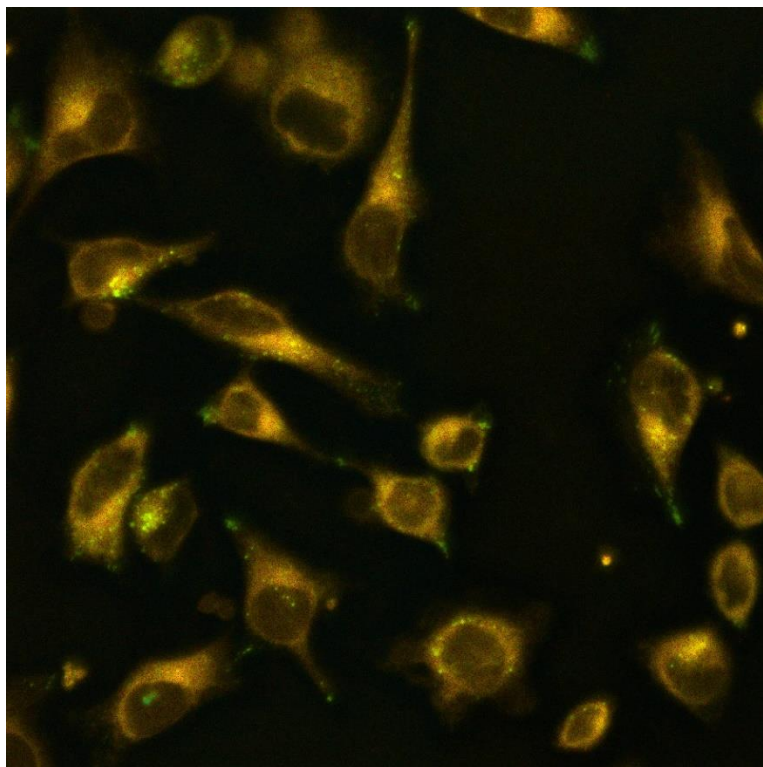
Figure III-27. Gauche : Imagerie biphotonique de cellules HeLa incubées pendant 2h avec **CbzOMeSPh**. Excitation à 880 nm.
Droite : Imagerie biphotonique de cellules HeLa incubées pendant 2h avec **tBuCbzSPh**. Excitation à 940 nm.

Enfin, aucune fluorescence n'a été observée dans les cellules incubées avec les agrégats de **Ph2NFSPh**. Bien que cela puisse provenir de la coupure du signal à 670 nm, il est aussi probable que ces agrégats ne pénètrent pas ou peu à l'intérieur des cellules.

Afin de tenter d'observer les agrégats de **CbzOMeSPh** et de **tBuCbzSPh**, nous avons effectué une deuxième séance d'imagerie cellulaire. Par rapport à la première séance, aucun changement n'a été réalisé

sur la préparation et la concentration des solutions d'agrégats. Cependant, cette fois, nous avons diminué le temps d'incubation à 30 minutes pour **CbzOMeSPh** et à une heure pour **tBuCbzSPh**. De plus, l'imagerie a été faite sans lavage et par excitation monophotonique en mode confocal. Ainsi l'excitation a été effectuée à l'aide d'un laser à 405 nm pour **CbzOMeSPh** ou à 488 nm pour **tBuCbzSPh**.

Ces changements de conditions nous ont permis d'obtenir des images des cellules marquées avec **CbzOMeSPh**. La localisation des chromophores au sein des cellules est identique à celle de **Ph3NSh** : le cytosquelette est clairement imagé, tout comme les organites de faible polarité.



*Figure III-28. Imagerie confocale de cellules HeLa incubées pendant 2h avec **CbzOMeSPh**. Les cellules sont excitées à 405 nm avec un laser argon.*

Malheureusement, ces conditions n'ont pas permis l'acquisition d'images des cellules marquées avec **tBuCbzSPh**.

En conclusion, nous avons formulé certains chromophores en agrégats pour l'imagerie de cellules HeLa. Parmi les quatre colorants choisis, seuls les nanoagrégats de **Ph3NSPh** et de **CbzOMeSPh** ont montré une accumulation dans les cellules vivantes menant à un marquage du cytosquelette et d'organites de faible polarité. Étonnamment, les agrégats de **tBuCbzSPh** n'ont pas permis l'imagerie des cellules dans les conditions testées. Ces agrégats ne semblent s'accumuler que dans les cellules mortes. Enfin, nous n'avons pas pu observer la fluorescence des cellules incubées avec **Ph2NFSPh** possiblement à cause d'une coupure de l'émission par le filtre dichroïque ainsi qu'une faible internalisation. Il pourrait être intéressant d'effectuer l'imagerie cellulaire avec des solutions des colorants dans le DMSO afin d'améliorer la pénétration membranaire des colorants.

3. FRET

Comme nous l'avons précisé au début de ce chapitre, le transfert d'énergie par résonance de type Förster entre deux chromophores au sein de co-agrégats permet d'exalter la fluorescence d'un accepteur peu émissif à l'état solide. Cette approche permet d'obtenir des agrégats présentant une forte fluorescence dans la fenêtre biologique ainsi que des pseudo- déplacements de Stokes exceptionnellement grands.

Dans cette partie, nous avons synthétisé différents co-agrégats donneur/accepteur. Les agrégats sont formés par l'ajout de deux fois 5 mL d'eau distillée à une solution de 500 μ L d'acétone contenant la même concentration de donneur (0,5 mM), la même quantité de pluronic F127 (0,25 mg) et un certain pourcentage molaire d'accepteur. Après formation des agrégats, l'acétone est évaporée à l'aide d'un évaporateur rotatif.

a) Variation de l'accepteur

Tout d'abord, nous avons utilisé le donneur précédemment utilisé au laboratoire, **a3**, qui présente comme avantage de former des agrégats très stables et émettant à 595 nm. Nous avons choisi quatre fluorophores très émissifs en solution au-delà de 700 nm mais dont la fluorescence devient négligeable en agrégats. Les accepteurs choisis sont **Ph2NFSOPh**, **Ph2NFSO2Ph**, **BTNSPh** et **BTNTCF** (Figure III-29).

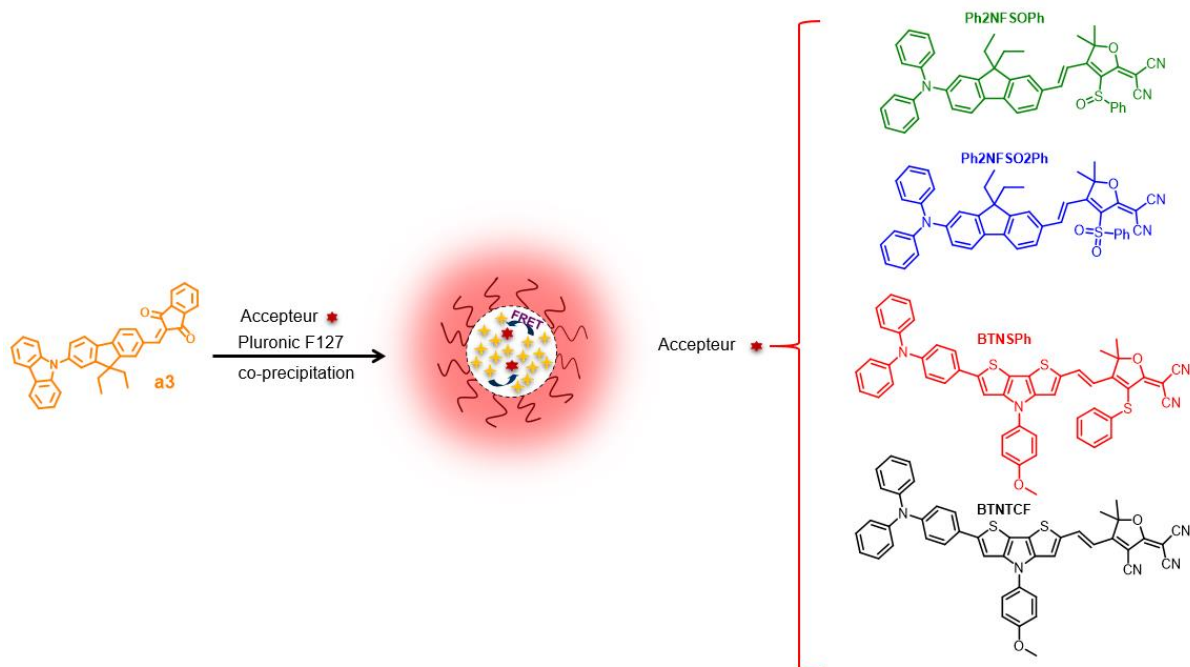


Figure III-29. Co-agrégats de **a3** dopés avec différents accepteurs.

La Figure III-30 superpose l'absorption des accepteurs dans le chloroforme avec l'émission du donneur **a3** en agrégats. Tous les composés possèdent un recouvrement non négligeable entre l'émission du donneur et l'absorption de l'accepteur. Les intégrales de recouvrement J ont été calculées avec le

logiciel a|e comme étant croissant dans l'ordre **Ph2NFSOPh** ($2,0 \cdot 10^{15} \text{ nm}^4\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), **Ph2NFSO2Ph** ($2,9 \cdot 10^{15} \text{ nm}^4\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), **BTNSPh** ($3,8 \cdot 10^{15} \text{ nm}^4\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) et enfin **BTNTCF** ($6,3 \cdot 10^{15} \text{ nm}^4\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

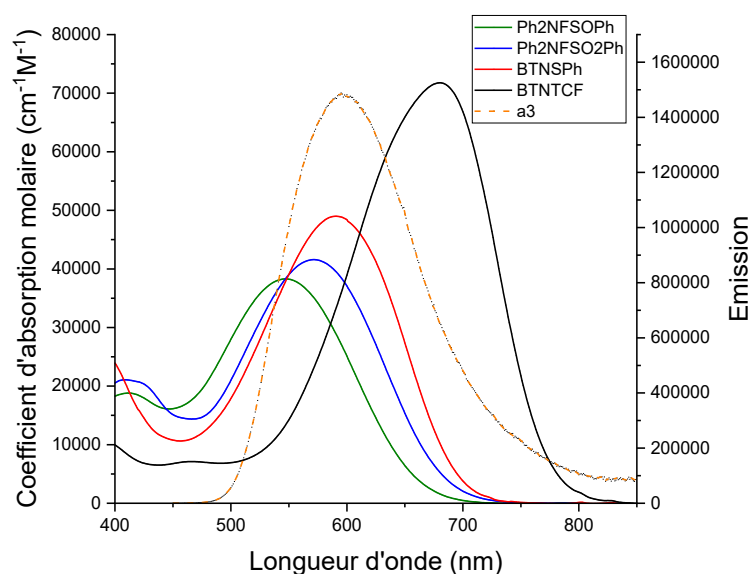


Figure III-30. Superposition des spectres d'absorption des accepteurs dans le chloroforme (lignes pleines) avec le spectre d'émission des agrégats **a3** (pointillées). Excitation à 435 nm.

Pour le premier couple que nous avons étudié **a3/Ph2NFSO2Ph**, nous avons fait varier le pourcentage molaire entre les deux chromophores entre 0 et 4 % (Figure III-31). Ces co-agrégats ont été comparés aux agrégats purs en **Ph2NFSO2Ph** (100 %). L'augmentation de la proportion d'accepteur se fait en parallèle de l'apparition d'une bande d'absorption à 575 nm. L'accroissement de l'absorption à 435 nm provient en partie de la superposition entre les spectres d'absorption de **a3** et de **Ph2NFSO2Ph**.

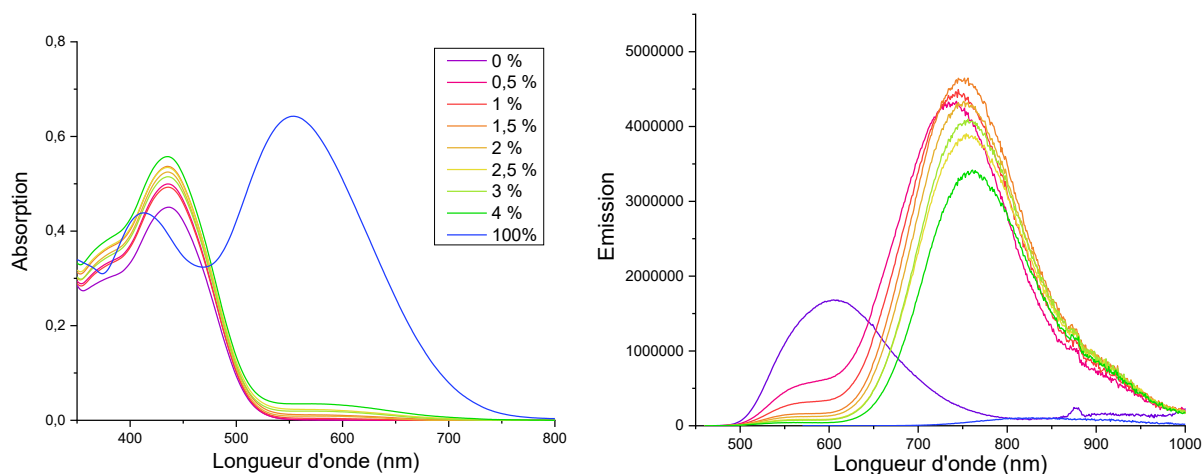
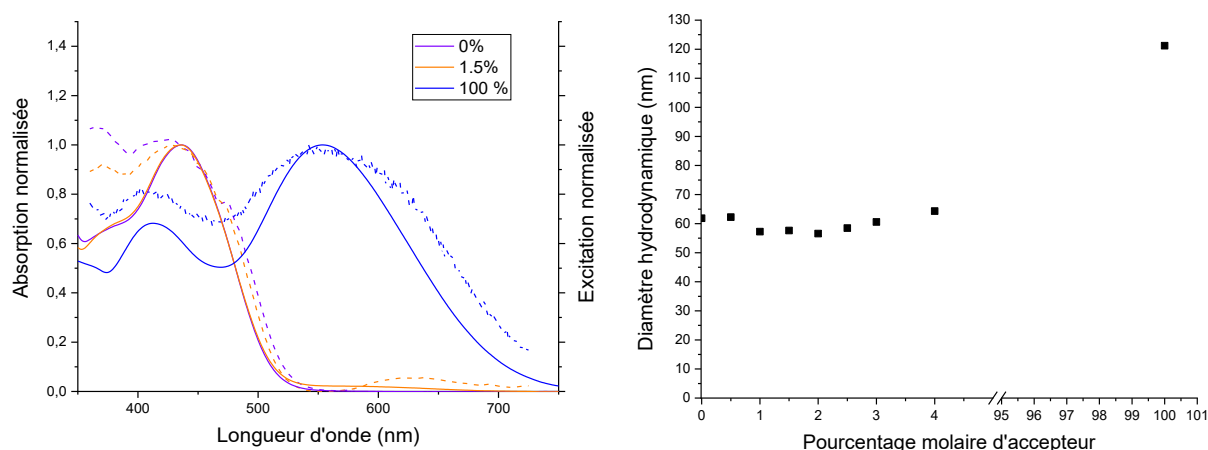


Figure III-31. Absorption (gauche) et émission (droite) des co-agrégats **a3/Ph2NFSO2Ph** dopés avec différents pourcentages molaires d'accepteur ainsi que des agrégats purs de **Ph2NFSO2Ph**. Excitation à 435 nm.

L'émission de **a3** diminue progressivement avec l'augmentation de la proportion d'accepteur jusqu'à devenir négligeable pour 4 % d'accepteur. En même temps, une nouvelle bande d'émission apparaît dans la fenêtre biologique avec un maximum qui se décale progressivement entre 740 nm et 760 nm avec l'augmentation de la quantité de **Ph2NFSO2Ph** et donc de la polarité du milieu. Le maximum d'émission de **Ph2NFSO2Ph** est atteint pour un ratio de 1,5 % avec une émission à 750 nm. Lorsque le ratio

dépasse la valeur de 1,5 %, l'augmentation de la polarité des agrégats ainsi que le rapprochement entre accepteurs entraînent une légère diminution de la fluorescence.

Il est intéressant de noter que les co-agrégats dopés à 1,5 % sont 3 fois plus fluorescents que les agrégats de **a3** et 52 fois plus fluorescents que les agrégats purs en **Ph2NFSO2Ph**. Cependant, à cause de la faible polarité de **a3**, l'émission des co-agrégats dopés à 1,5 % est décalée de 70 nm vers le bleu par rapport aux agrégats de **Ph2NFSO2Ph**.



La Figure III-32 compare les spectres d'absorption (lignes pleines) et d'excitation (pointillées) des agrégats purs de **a3** (violet) et de **Ph2NFSO2Ph** (bleu) et des co-agrégats dopés à 1,5 % (orange). Ces courbes montrent que l'excitation de l'accepteur se fait principalement par une absorption du donneur à 435 nm suivie d'un transfert d'énergie vers l'accepteur. Il est aussi possible d'exciter directement l'accepteur cependant cela est peu efficace étant donné la faible quantité de molécules de **Ph2NFSO2Ph**. Étonnamment, la bande d'excitation directe de l'accepteur est décalée de manière bathochrome par rapport à l'excitation des agrégats de **Ph2NFSO2Ph** ou par rapport à l'absorption de l'accepteur dans les co-agrégats.

Nous avons vérifié la variation du diamètre hydrodynamique des agrégats en fonction du taux de dopage. Avec les faibles taux de dopage de cette série, l'augmentation de la quantité d'accepteur n'a que peu d'effet sur la taille des co-agrégats qui reste similaire à la taille des agrégats de **a3**, vers 60 nm. Il est probable que si le taux est grandement augmenté, le système tende vers la taille des agrégats de **Ph2NFSO2Ph**, autour de 120 nm.

Pour les trois autres accepteurs, des co-agrégats avec des ratios molaires entre les deux chromophores entre 0 et 1,5 % ont été synthétisés. Pour **Ph2NFSOPh** et pour **BTNSPh**, la fluorescence maximale est atteinte pour 1 % d'accepteur alors que pour **BTNTCF**, elle est atteinte pour 0,5 % d'accepteur. La Figure III-33 représente les spectres d'émission des agrégats de **a3** dopés chacun des quatre accepteurs étudiés (au ratio donnant la fluorescence de l'accepteur maximale). La faible bande à 870 nm correspond au deuxième ordre de l'excitatrice, visible malgré le filtre passe-haut à 455 nm.

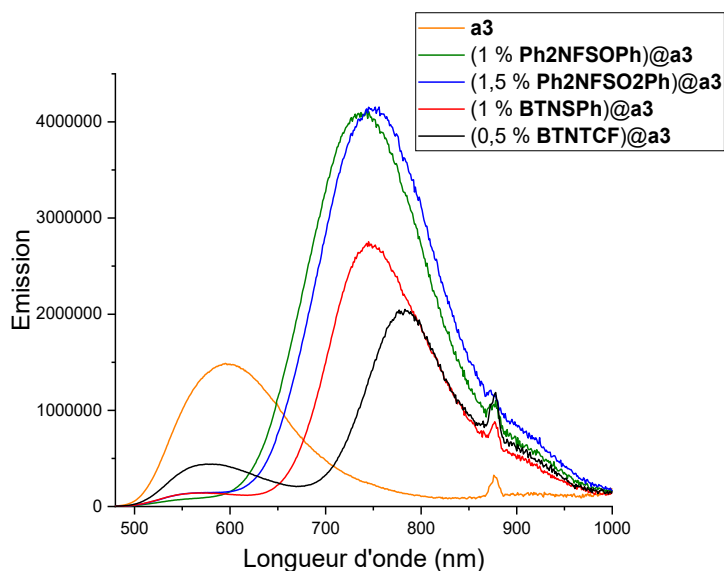


Figure III-33. Spectres d'émission des agrégats de **a3** ainsi que des co-agrégats **a3**/accepteur. Excitation à 435 nm.

Contrairement aux autres accepteurs, pour **BTNTCF**, le ratio de 0,5 % d'accepteur ne permet pas d'éteindre la totalité de la fluorescence de **a3**. L'augmentation de la quantité d'accepteur permet de diminuer cette fluorescence résiduelle mais entraîne aussi une baisse significative de la fluorescence de l'accepteur.

Donneur	Accepteur	% d'accepteur	λ_{em} (nm)	QY (%)	Diamètre (nm)
a3	-	-	595	17	62
a3	Ph2NFSOPh	1 %	737	74	68
a3	Ph2NFSO2Ph	1,5 %	750	71	58
a3	BTNSPh	1 %	746	11	62
a3	BTNTCF	0,5 %	782	20	88

Tableau III-5. Récapitulatif des maxima d'émission, des rendements quantiques ainsi que des diamètres hydrodynamiques des co-agrégats de **a3** dopés avec différents accepteurs.

Ainsi, la modification de l'accepteur et du ratio donneur/accepteur nous permet de contrôler précisément la position du maximum de fluorescence entre 730 nm et 790 nm. Pour ces co-agrégats, nous avons mesuré les rendements quantiques des accepteurs. Cependant, le déplacement de Stokes apparent d'environ 10 000 cm^{-1} apporté par le FRET rend impossible le choix d'une référence ayant les mêmes gammes d'excitation et d'émission. Nous avons choisi d'utiliser une référence avec la même gamme d'émission (le styryl 9M), cependant une erreur peut provenir d'une différence d'excitation entre la référence et les agrégats. Les rendements quantiques ont donc été estimés à 74 % pour (1 % **Ph2NFSOPh**)@**a3**, 71 % pour (1,5 % **Ph2NFSO2Ph**)@**a3**, 11 % pour (1 % **BTNSPh**)@**a3** et 20 % pour (0,5 % **BTNTCF**)@**a3**. Le faible rendement quantique de **BTNSPh** par rapport à **BTNTCF** est surprenant au vu des intensités des courbes de fluorescence de la Figure III-33.

La forte fluorescence au-delà de 730 nm de ces co-agrégats en fait des candidats prometteurs pour l'imagerie de fluorescence. De plus, nous avons montré que **a3** est excitable par ADP (section efficace de 130 GM à 880 nm dans le chloroforme).^[105]

b) Variation du donneur

Par la suite, nous avons voulu améliorer la fluorescence des co-agrégats dopés avec le fluorophore émettant le plus loin dans le proche infrarouge, **BTNTCF**. Nous avons donc sélectionné plusieurs donneurs aux émissions décalées vers le rouge par rapport à **a3** afin de maximiser l'intégrale de recouvrement J. Les deux nouveaux donneurs que nous avons sélectionnés sont **CbzOMeSPh** et **tBuCbzSPh** (Figure III-34).

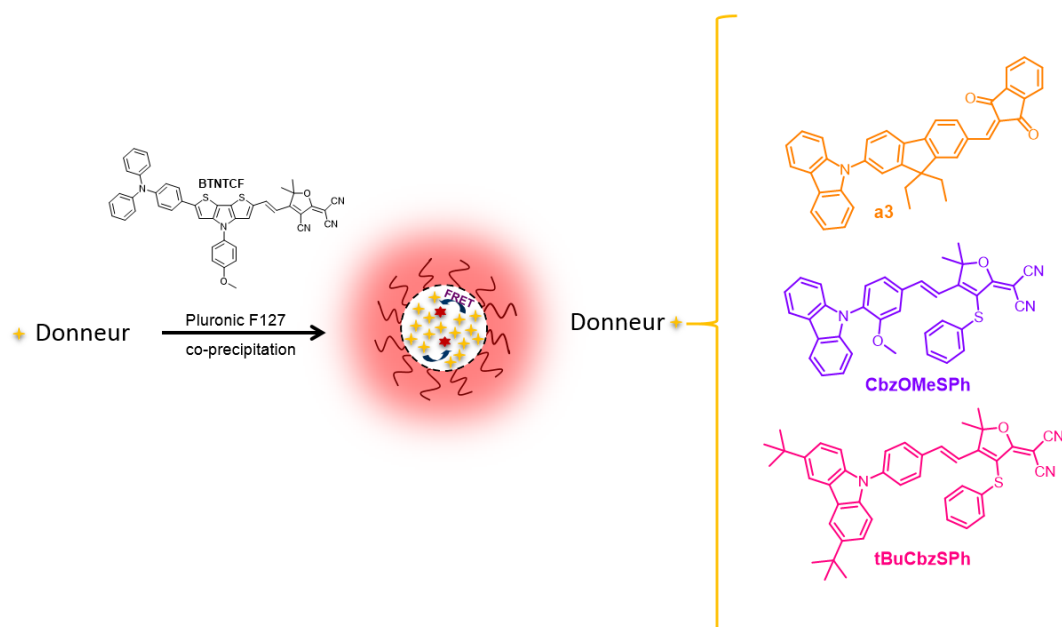


Figure III-34. Co-agrégats de différents donneurs dopés avec **BTNTCF**.

Les spectres d'émission normalisés des donneurs ainsi que le spectre d'absorption de **BTNTCF** sont représentés sur la Figure III-35. Le décalage bathochrome du spectre d'émission du donneur entraîne une meilleure superposition avec le spectre d'absorption de l'accepteur et donc une augmentation de l'intégrale de recouvrement depuis **a3** ($J = 6,3 \cdot 10^{15} \text{ nm}^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) vers **CbzOMeSPh** ($J = 9,0 \cdot 10^{15} \text{ nm}^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) et enfin **tBuCbzSPh** ($J = 9,1 \cdot 10^{15} \text{ nm}^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

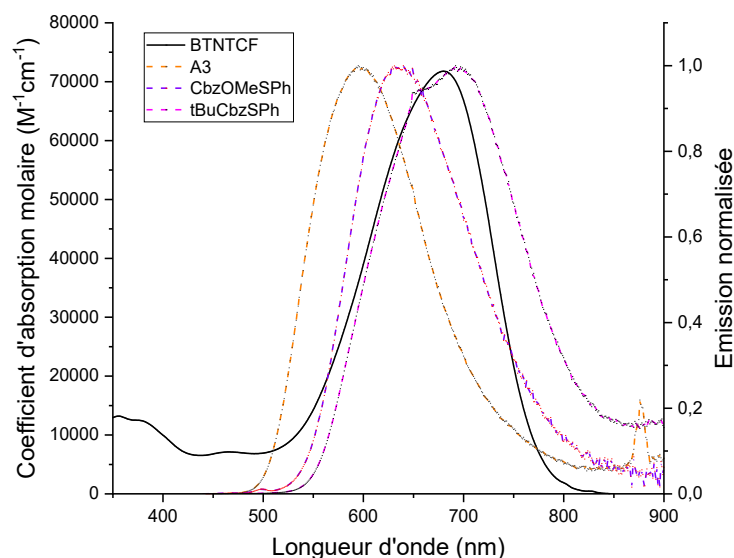


Figure III-35. Superposition du spectre d'absorption de **BTNTCF** (lignes pleines) avec les spectres d'émission des agrégats des donneurs (lignes pointillées). Excitation à 435 nm pour **a3**, 425 nm pour **CbzOMeSPh** et 470 nm pour **tBuCbzSPh**.

Nous avons synthétisé les co-agrégats avec des pourcentages molaires entre 0 % et 1,5 %. Pour les trois couples donneur/accepteur, le maximum de fluorescence est atteint pour 0,5 % d'accepteur. Les spectres d'émission des agrégats des donneurs ainsi que des co-agrégats dopés à 0,5 % avec **BTNTCF** sont représentés dans la Figure III-36. Les spectres des agrégats utilisant **tBuCbzSPh** comme donneur sont coupés à 915 nm pour éliminer le second ordre de l'excitatrice à 940 nm.

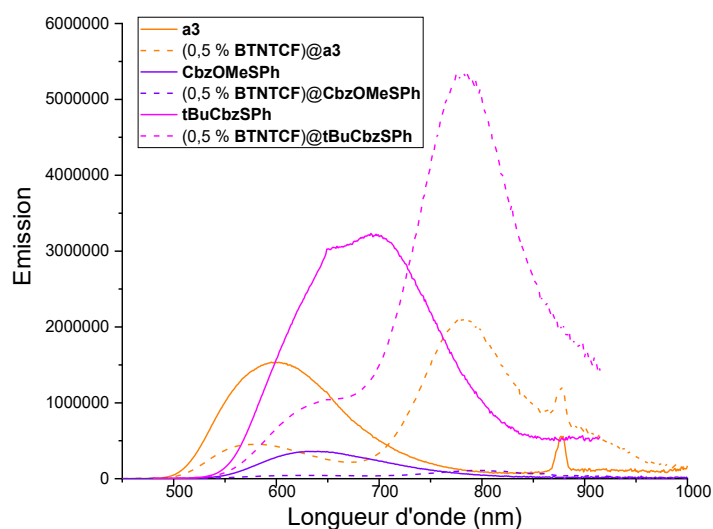


Figure III-36. Spectres d'émission des agrégats des donneurs (lignes pleines) ainsi que des co-agrégats dopés avec **BTNTCF** (lignes pointillées). Excitation à 435 nm pour **a3**, 425 nm pour **CbzOMeSPh** et 470 nm pour **tBuCbzSPh**.

Le meilleur donneur pour **BTNTCF** semble être **tBuCbzSPh**. En effet, les co-agrégats de ce donneur dopés à 0,5 % avec **BTNTCF** sont fortement fluorescents à 783 nm. Cette quantité d'accepteur ne suffit pas à éteindre complètement l'émission du donneur. Comme ce qui avait été observé pour le couple **a3/BTNTCF**, une augmentation de la quantité d'accepteur jusqu'à 1,5 % permet d'éteindre le donneur au prix d'une chute d'environ 50 % de la fluorescence de l'accepteur.

Cependant, les résultats pour **CbzOMeSPh** sont incohérents avec ce que nous attendions. Même la fluorescence des nanoagrégats de **CbzOMeSPh** purs à 640 nm est beaucoup plus faible que celle des agrégats de **tBuCbzSPh**, contrairement à ce que nous avons obtenu précédemment avec ces composés. L'ajout de l'accepteur éteint rapidement l'émission du donneur sans parvenir à obtenir une forte émission de l'accepteur (Figure III-37). Ce résultat sera à confirmer.

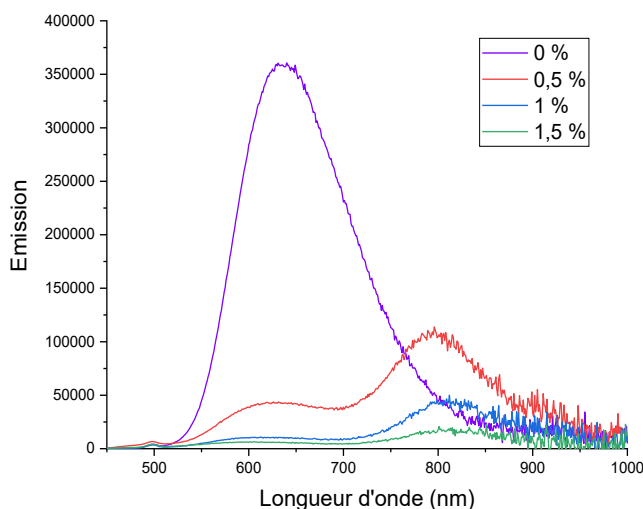


Figure III-37. Spectres d'émission des co-agrégats de **CbzOMeSPh** dopés avec **BTNTCF**. Excitation à 425 nm.

Le rendement quantique de la fluorescence des co-agrégats **tBuCbzSPh/BTNTCF** a été mesuré à 54 % par rapport au Styryl 9M. Les propriétés optiques des co-agrégats contenant **BTNTCF** comme accepteur sont résumées dans le Tableau III-6.

Donneur	Accepteur	% d'accepteur	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)	QY (%)	Diamètre (nm)
a3	BTNTCF	0,5 %	435	782	20	88
CbzOMeSPh	BTNTCF	0,5 %	425	794	-	102
tBuCbzSPh	BTNTCF	0,5 %	470	783	54	139

Tableau III-6. Propriétés optiques et diamètres hydrodynamiques des co-agrégats dopés avec **BTNTCF**.

Enfin, les tailles des co-agrégats ont été mesurées par DLS. **tBuCbzSPh** a donné des co-agrégats avec un diamètre hydrodynamique de 139 nm, bien plus gros que ceux formés avec **a3** et ceux formés pour l'imagerie cellulaire avec ce chromophore. Ce diamètre de 139 nm reste néanmoins dans la gamme acceptable pour l'imagerie *in vivo* (< 200 nm) ce qui permet d'éviter un captage rapide par le système réticulo-endothélial.

En conclusion, nous avons montré qu'il était possible de restaurer la fluorescence de chromophores aux agrégats faiblement émissifs en les incorporant avec des faibles taux de dopage dans les agrégats d'un donneur d'énergie. Ces co-agrégats ont montré un FRET extrêmement efficace, puisque quelques pourcents permettent d'éteindre complètement la fluorescence du donneur. A partir d'un ancien donneur, **a3**, nous avons étudié 4 différents accepteurs et avons obtenu de fortes fluorescences avec des maxima entre 730 nm et 780 nm et d'excellents rendements quantiques. Nous avons aussi montré que l'incorporation d'un accepteur dans l'agrégat du donneur n'a qu'un faible impact sur les tailles des nanoagrégats. Puis à partir de l'accepteur le plus décalé dans le rouge **BTNTCF**, nous avons essayé différents donneurs afin de maximiser son rendement quantique. L'utilisation du donneur **tBuCbzSPh** nous

a permis d'améliorer le rendement quantique des co-agrégats avec **BTNTCF** grâce à un recouvrement grandement amélioré.

Dans une prochaine étape, nous devons vérifier les capacités d'absorption multiphotonique de ces nouveaux donneurs afin de confirmer leur possible utilisation en imagerie biphotonique. Puis ces co-agrégats seront testés pour l'imagerie biphotonique de la microvascularisation d'oreilles de souris en collaboration avec Boudewijn van der Sanden. Nous sommes aussi en train de monter une collaboration avec Emmanuel Beaurepaire au laboratoire d'optique et de biosciences à l'Ecole Polytechnique pour l'imagerie de poissons zèbres avec absorption à trois photons.

D. Nanoparticules pluronic/silice pour l'angiographie

L'encapsulation de chromophores dans des matrices polymériques constitue une méthode de choix pour obtenir des nanoparticules fortement émissives pour l'imagerie de fluorescence. En effet, le taux de dopage relativement faible des chromophores au sein de la matrice permet la fluorescence de composés, même ACQ. De plus, cette solution solide peut aussi permettre d'améliorer la fluorescence des composés normalement peu émissifs en solution en diminuant les voies de désexcitation possibles et notamment en limitant les mouvements moléculaires.

Dans cette partie, nous allons présenter la synthèse et les propriétés de nanoparticules F127-SiO₂ encapsulant nos chromophores contenant les groupes accepteurs **SPh** et **SO2Ph**, ainsi que les chromophores basés sur le pont conjugué dithiénopyrrole présentés dans le Chapitre II.

1. Chromophores **SPh** et **SO2Ph**

La synthèse des NPs F127-SiO₂ avait été optimisée sur des chromophores très solubles, basés sur un pont fluorényle. L'extension de la synthèse à cette nouvelle famille s'est avérée plus difficile que prévue. En effet, plusieurs de nos composés semblent cristalliser pendant la synthèse de la couche de silice, entraînant la formation d'objets volumineux mélangés aux nanoparticules de silice. Pour la plupart des composés, la filtration finale permet l'élimination de ces agrégats mais ce problème entraîne une perte de fluorophores. Pour **Ph3NSO2Ph**, seuls des agrégats de 710 nm de diamètre ont été observés et leur filtration à 0,2 µm ne donne qu'une solution transparente, sans chromophore.

Les distributions de taille obtenues par DLS après filtration sont représentées dans la Figure III-38. Quatre composés (**Ph2NFSO2Ph**, **EtCbzSPh**, **EtCbzSO2Ph** et **tBuCbzSO2Ph**) sont polydisperses avec la présence de gros agrégats. Cependant, le mode intensité surestime la quantité de grosses nanoparticules car la diffusion est proportionnelle au diamètre à la puissance six. Ainsi, ces deuxièmes bandes au-delà de 100 nm disparaissent complètement si les résultats sont affichés en mode volume ou nombre. Les autres F127-SiO₂ NPs mesurent entre 20 et 30 nm de diamètre.

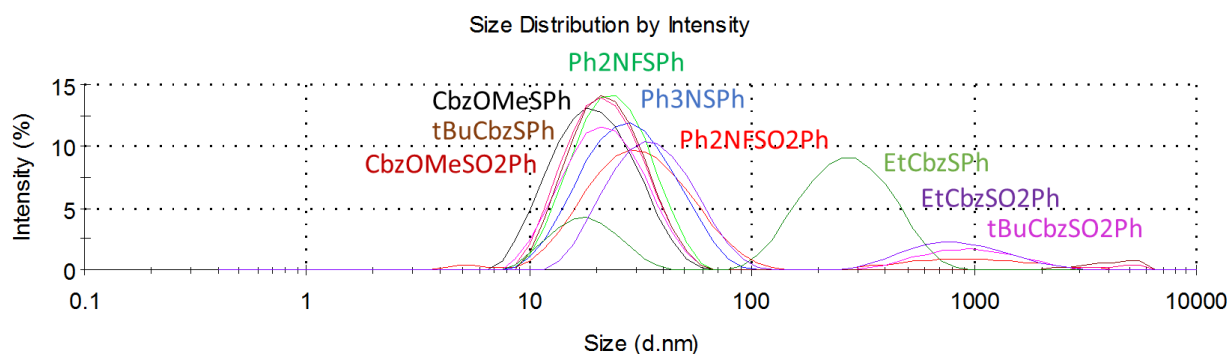


Figure III-38. Diamètres hydrodynamiques des NPs F127-SiO₂ encapsulant les chromophores basés sur les accepteurs **SPh** et **SO2Ph**.

En dépit de ces problèmes de taille, nous avons quand même étudié les propriétés optiques des agrégats. Les spectres d'absorption et d'émission normalisés des NPs F127-SiO₂ sont représentés dans la Figure III-39.

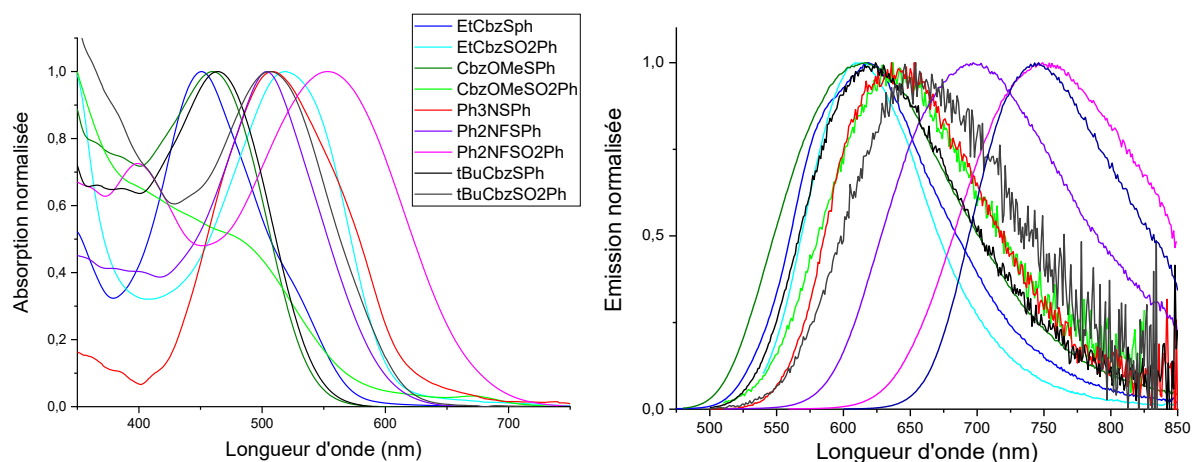


Figure III-39. Spectres d'absorption (gauche) et d'émission (droite) normalisés des NPs F127-SiO₂ encapsulant les chromophores basés sur les accepteurs **SPh** et **SO2Ph**.

Les positions des bandes d'absorption et d'émission des chromophores encapsulés dans les nanoparticules de silice sont très proches des propriétés optiques en solution dans un mélange équimolaire de toluène et de chloroforme. Les rendements quantiques de fluorescence des nanoparticules NPs F127-SiO₂ ont été mesurés et sont résumés dans le Tableau III-7. A part pour les deux chromophores basés sur un pont fluorène, le passage de la solution au milieu confiné de la matrice de pluronic entraîne une augmentation du rendement quantique. Cette augmentation est cependant moins marquée que celle entre la solution et la poudre. Cela peut provenir d'un blocage des mouvements moléculaires plus faibles en solution solide qu'au sein de la poudre ou alors du manque d'interactions favorables entre les chromophores dans cette matrice faiblement dopée.

Cependant, la faible polarité de la poche hydrophobe des NPs limite les longueurs d'onde d'émission de la plupart des chromophores en dessous de la fenêtre biologique. Ainsi, seuls trois composés émettent au-delà de 650 nm lorsqu'ils sont encapsulés dans ce type de nanoparticules : **tBuCbzSO2Ph**, **Ph2NFSPh** et **Ph2NFSO2Ph**. En particulier, les chromophores basés sur le pont fluorène sont particulièrement remarquables avec des rendements quantiques autour de 40 % et des émissions à 700 nm et 750 nm.

Fluorophore	Toluène/CHCl ₃				NP F127-SiO ₂			
	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	ϕ (%)	$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	ϕ (%)	$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)
EtCbzSPh	466	585	0,4	4 350	451	618	4	6 000
EtCbzSO ₂ Ph	505	596	0,4	3 000	519	612	10	2 900
CbzOMeSPh	424	601	7	6 950	460	615	17	5 500
CbzOMeSO ₂ Ph	483	676	5	5 900	477	640	6	5 350
Ph3NSPh	502	632	5	4 10	508	645	16	4 200
Ph3NSO ₂ Ph	555	689	11	3 500	-	-	-	-
Ph2NFSPh	502	711	37	5 850	504	700	37	5 550
Ph2NFSO ₂ Ph	563	759	53	4 600	554	750	43	4 700
tBuCbzSPh	463	620	10	5 450	464	622	11	5 500
tBuCbzSO ₂ Ph	513	699	n.d.	5 200	506	660	4	4 600

Tableau III-7. Comparaison des propriétés optiques des chromophores dans un mélange toluène/CHCl₃ et dans les nanoparticules de silice.

2. Chromophores basés sur un dithiénopyrrole

Tout comme la série de chromophores précédente, la synthèse des NPs F127-SiO₂ encapsulant les chromophores basés sur un pont dithiénopyrrole est limitée par la faible solubilité de ceux-ci. Même après filtration, les solutions de NPs des quatre chromophores sont composées de NPs de deux tailles différentes. La majorité des NPs ont un diamètre hydrodynamique moyen de 18 nm pour **BTNA2**, 28 nm pour **BTNSPh** et **BTNTCF** et 30 nm pour **BTNI**. Quelques agrégats sont aussi observés avec des diamètres moyens de 255 nm pour **BTNI**, 400 nm pour **BTNTCF** et **BTNSPh** et enfin 455 nm pour **BTNA2**.

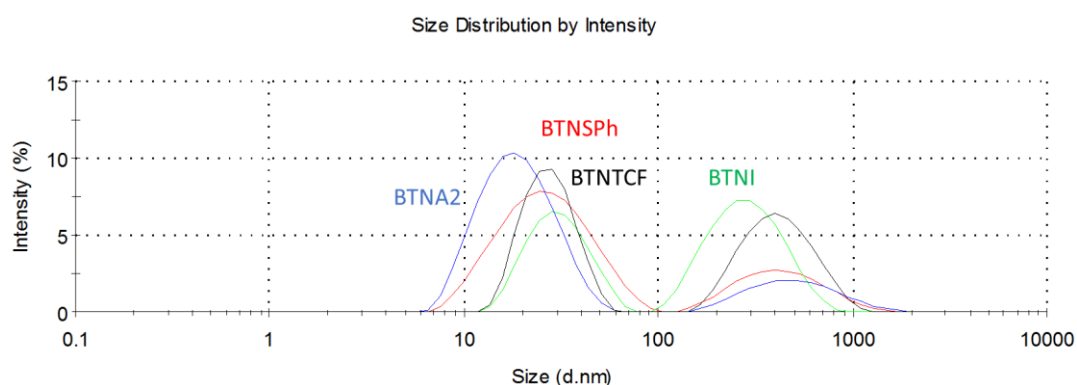


Figure III-40. Diamètres hydrodynamiques des NPs F127-SiO₂ encapsulant les chromophores basés sur le pont dithiénopyrrole.

Les propriétés optiques de ces NPs F127-SiO₂ sont répertoriées dans la Figure III-41 et le Tableau III-8. Les propriétés spectroscopiques de ces nanoparticules semblent idéales pour l'imagerie deuxième fenêtre/première fenêtre avec une absorption monophotonique entre 550 nm et 625 nm et une émission entre 655 nm et 775 nm.

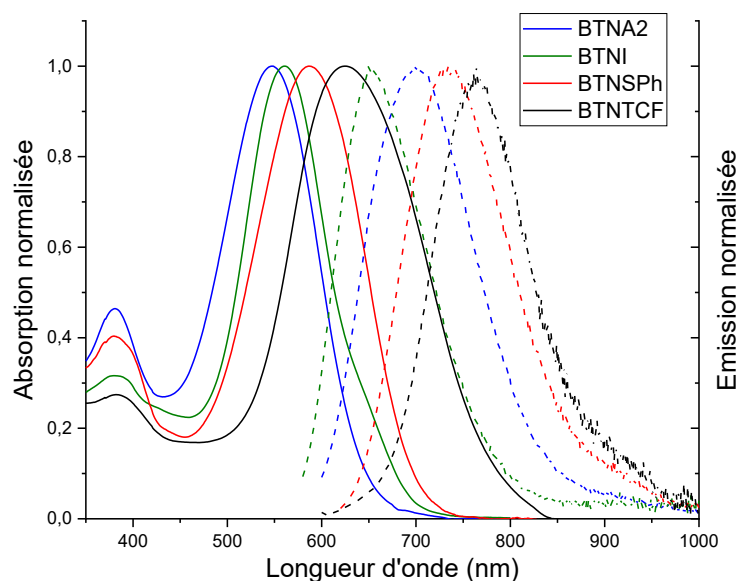


Figure III-41. Spectres d'absorption (lignes pleines) et d'émission (pointillées) normalisés des NPs F127-SiO₂ encapsulant les chromophores basés sur le pont dithiénopyrrole.

Les rendements quantiques ont été mesurés par rapport au Styryl 9M. Les NPs F127-SiO₂ encapsulant les chromophores **BTNA2**, **BTNI** et **BTNSPh** sont particulièrement intéressantes avec des rendements quantiques de plus de 70 % dans la fenêtre biologique. Une chute de rendement quantique est observée pour le dernier fluorophore **BTNTCF** qui possède un rendement de 20 % à 775 nm, ce qui reste remarquable.

Fluorophore	Toluène/CHCl ₃				NP SiO ₂			
	λ_{abs}	λ_{em}	ϕ	$\Delta\nu$	λ_{abs}	λ_{em}	ϕ	$\Delta\nu$
	(nm)	(nm)	(%)	(cm ⁻¹)	(nm)	(nm)	(%)	(cm ⁻¹)
BTNA2	550	705	62	4 000	550	700	77	3 900
BTNI	571	688	75	3 000	560	655	73	2 600
BTNSPh	582	739	58	3 650	590	735	70	3 350
BTNTCF	670	783	70	2 150	625	775	20	3 100

Tableau III-8. Comparaison des propriétés optiques des chromophores dans un mélange Toluène/CHCl₃ et dans les nanoparticules de silice.

3. Imagerie cellulaire

Malgré cette cristallisation imprévue lors de la synthèse qui reste à investiguer, la forte fluorescence dans la fenêtre biologique de certaines de ces nanoparticules en fait de bons candidats pour l'imagerie de fluorescence. En attendant la disponibilité du microscope biphotonique de Boudewijn van der Sanden, nous avons voulu tester la nanoparticule **Ph2NFSPH@F127-SiO₂** pour le marquage cellulaire.

Les séances d'imagerie cellulaire sur ces NPs ont été faites avec des protocoles proches de ceux avec les agrégats et toujours avec Damien Curton et Christophe Chamot au PLATIM.

Lors de la première séance, les cellules HeLa ont été incubées pendant deux heures avec une solution diluée de concentration 5 μM en colorant puis les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS, pour finalement être reprises dans une solution de Sérum de Veau Foetal à 10 % dans du PBS jusqu'à l'imagerie.

Cependant, lors de l'excitation biphotonique à 1000 nm des cellules, nous n'avons obtenu qu'un faible signal provenant des cellules mortes (Figure III-42, gauche).

La deuxième session d'imagerie, pendant laquelle les cellules ont été observées sans lavage préalable, a permis de confirmer que ces nanoparticules ne passent pas la membrane cellulaire (Figure III-42, droite). En effet, l'observation de cet échantillon au microscope confocal donne une forte fluorescence dans tout le milieu de culture et des taches sombres correspondant aux cellules.

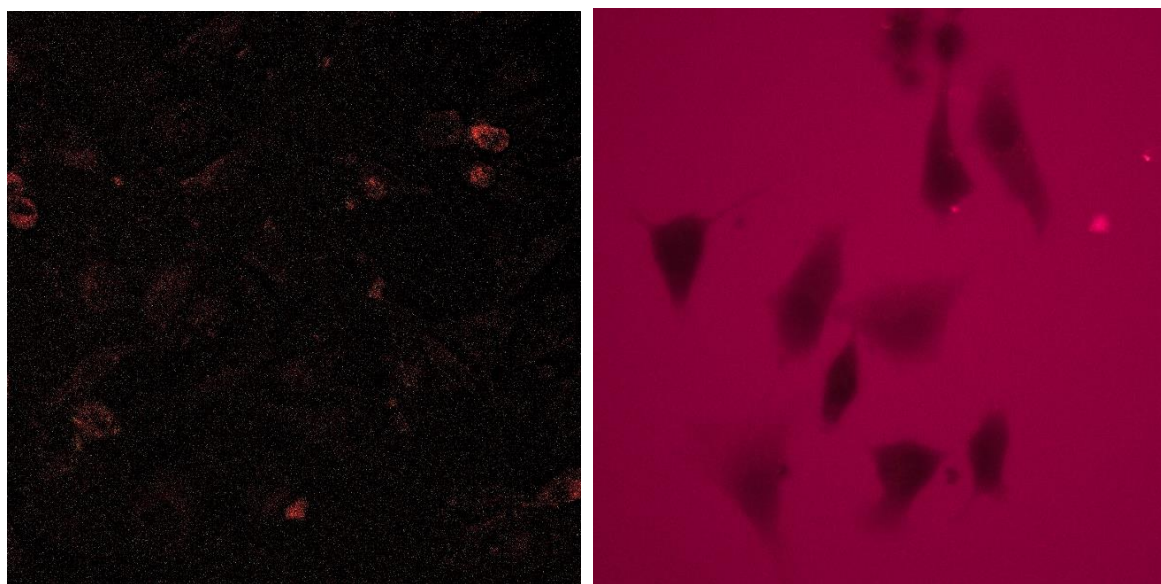


Figure III-42. Imagerie cellulaire avec les NPs **Ph2NFSPh**@F127-SiO₂.
Gauche : imagerie biphotonique après deux heures d'incubation et trois lavages au PBS. Excitation à 1000 nm.
Droite : imagerie monophotonique après une heure d'incubation sans lavages. Excitation à 514 nm.

Ce résultat nous a tout d'abord surpris, puisque plusieurs articles montrent des expériences d'imagerie cellulaire à l'aide de NPs F127-SiO₂.^[193,315] Cependant, dans une étude de Liu *et al.* sur des NPs F127-SiO₂ de deux chromophores, le NileRed connu pour sa capacité à franchir la membrane cellulaire et la fluorescéine qui à l'inverse est peu internalisée, les auteurs ont montré que seuls les NPs de NileRed permettaient l'imagerie cellulaire. Cela suggère que les nanoparticules ne sont pas internalisées et que le colorant diffuse hors des nanoparticules et dans les cellules. L'imagerie effectuée avec **Ph2NFSPh**@F127-SiO₂ confirme donc la faible internalisation par les cellules du chromophore **Ph2NFSPh**.

E. Bilan

Dans ce chapitre nous avons présenté la synthèse de nanoagrégats et de nanoparticules F127-SiO₂ à partir de nos chromophores. Dans un premier temps, nous avons voulu améliorer la synthèse des

agrégats à l'aide d'un fluorophore modèle, **Ph2NF**. Nous avons exploré l'influence de la fraction volumique d'eau initiale, puis l'influence de la concentration initiale en colorant sur les propriétés optiques et la taille des nanoagrégats. Ces études nous ont permis d'ajouter à la synthèse une étape de trempe et l'évaporation rapide de l'acétone, afin de retarder le murissement d'Ostwald. De plus, nous avons constaté que l'intensité de fluorescence atteint rapidement un plateau lorsqu'on augmente trop la concentration initiale en colorant.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié la fluorescence de nos chromophores dans des mélanges eau/acétone en fonction de la proportion d'eau. Nous avons pu identifier les chromophores présentant des propriétés intéressantes en agrégats (caractère AIE) et nous en avons sélectionné quatre pour de l'imagerie cellulaire. Parmi ces agrégats, **Ph3NSPh** et **CbzOMeSPH** ont permis l'imagerie biphotonique et confocale de cellules HeLa. Ces agrégats permettent un marquage efficace du cytosquelette ainsi que d'un organite, probablement des gouttelettes lipidiques. Malheureusement, les deux autres agrégats ne semblent pas être endocytés par les cellules, puisque seules quelques cellules mortes sont marquées.

Ces agrégats ont aussi été utilisés comme plateformes pour effectuer du FRET entre un donneur d'énergie et un accepteur. Plusieurs co-agrégats donneur/accepteur ont montré que cette stratégie permettait de restaurer la fluorescence d'accepteurs normalement peu émissifs à l'état solide. Par cette méthode, nous avons obtenu plusieurs co-agrégats fortement fluorescents au-delà de 730 nm. Ces co-agrégats sont prometteurs pour l'imagerie biphotonique *in vivo* et seront prochainement testés pour l'angiographie d'oreille de souris.

Enfin, nous avons aussi synthétisé des nanoparticules pluronic/silice encapsulant nos chromophores. Cette solution s'est avérée très intéressante pour les chromophores fortement fluorescents en solution apolaire. En particulier, les composés basés sur les ponts conjugués rigides fluorène ou dithiénopyrrole ont donné des nanoparticules fortement fluorescentes au-delà de 700 nm. Cependant, la caractérisation de certaines nanoparticules a montré la présence d'agrégats de plusieurs centaines de nanomètres. La synthèse devra donc être revue avant toute application en imagerie *in vivo*. Enfin, l'imagerie *in cellulo* des nanoparticules encapsulant **Ph2NFSPH** a confirmé que ce chromophore n'est pas internalisé par les cellules HeLa.

Dans ce chapitre nous avons donc pu effectuer le premier pas vers les applications d'imagerie de fluorescence *in vivo*. La non-disponibilité du microscope biphotonique pendant la deuxième moitié de ma thèse a cependant retardé l'acquisition d'images d'angiographie. En attendant, plusieurs points peuvent être améliorés. Même si la méthode de nanoprécipitation nous a permis l'obtention d'agrégats de taille satisfaisante, les rendements quantiques restent faibles par rapport aux rendements des poudres. Cela provient du caractère amorphe des agrégats formés. En collaboration avec l'INSA de Lyon, nous avons récemment développé une méthode de cristallisation contrôlée de nanoagrégats qui permet une multiplication par 5 du rendement quantique et de retrouver des propriétés similaires à la poudre.^[266] Cette technique sera prochainement appliquée à nos chromophores. Parallèlement, il nous faudra élucider les problèmes de taille des synthèses de nanoparticules pluronic/silice.

Chapitre IV. Chromophores pour l'imagerie photoacoustique

Le contraste de l'imagerie photoacoustique est grandement amélioré par l'utilisation d'agents de contraste. Ces colorants organiques ou inorganiques permettent de s'affranchir des limitations des colorants endogènes : faible absorption dans le NIR, flux discontinu des globules rouges... En outre, ils peuvent aussi permettre l'imagerie de domaines non-absorbants ou la localisation de biomarqueurs. Cependant, l'absorption dans le NIR est une propriété relativement rare : la majeure partie des chromophores du laboratoire possède un maximum d'absorption inférieur à 550 nm. Ainsi, dans ce chapitre, nous présenterons la synthèse de deux nouvelles séries de chromophores aux absorptions décalées vers le proche infrarouge. Dans un deuxième temps, nous présenterons quelques rares chromophores absorbant dans la fenêtre biologique préalablement synthétisés au laboratoire. Enfin, nous montrerons les résultats d'imagerie photoacoustiques obtenus avec ces chromophores.

A. Synthèse de nouveaux chromophores

1. Objectifs

Afin de synthétiser de nouveaux colorants dipolaires absorbant dans le proche infrarouge, nous avons décidé d'incorporer des thiophènes dans le pont conjugué. En effet, il a été montré que la substitution d'un pont phényle par un pont thiophène entraîne un décalage bathochrome conséquent de l'absorption. Cela provient de la faible aromaticité du cycle thiophène, qui permet une meilleure délocalisation des électrons, et de sa facilité à s'arranger de manière coplanaire avec les groupements alentour. Par exemple, Twieg *et al.* ont synthétisé des chromophores à transfert de charge entre une dihexylamine et un groupement **TCF** au travers de deux phényles ou thiophènes (Figure IV-1).^[325] Le dérivé avec un pont bithiophène a une absorption décalée de 130 nm par rapport au composé biphenyle ainsi qu'un coefficient d'absorption molaire deux fois plus élevé.

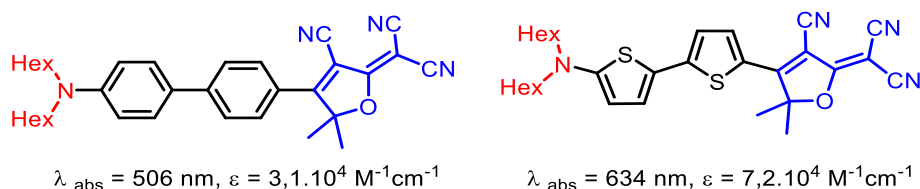


Figure IV-1. Comparaison des propriétés d'absorption entre un pont biphenyle et bithiophène.^[325]

Ainsi, nous avons décidé de synthétiser deux nouvelles familles basées sur un pont monothiophène et bithiophène (Figure IV-2).

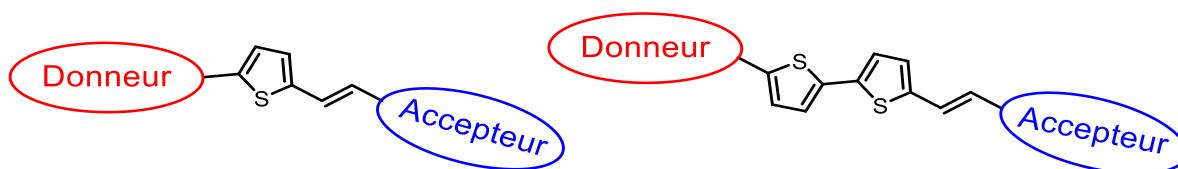


Figure IV-2. Chromophores cibles.

Pour ces séries, dans l'idéal, nous voulions utiliser la *N,N*-diphénylamine comme groupement donneur. Cependant, bien que plusieurs articles détaillent le couplage de Buchwald-Hartwig ou de Ullmann entre la diphénylamine et un thiophène,^[326–328] nos tentatives n'ont pas permis d'obtenir les produits souhaités avec ces deux couplages. Nous avons essayé sans succès les réactions de Buchwald-Hartwig entre la *N,N*-diphénylamine et le 2-bromothiophène ($\text{Pd}(\text{OAc})_2/\text{tBuONa}/\text{P}(\text{tBu})_3$) ou avec le 5-bromothiophène-2-carboxaldéhyde ($\text{Pd}2(\text{dba})_3/\text{Cs}_2\text{CO}_3/\text{P}(\text{tBu})_3$), ainsi que le couplage de Ullmann entre la *N,N*-diphénylamine et le 2-bromothiophène (CuI , Ki , *L*-Proline, K_2CO_3). Comme expliqué dans le Chapitre II.C.2, cela provient d'un couplage C-N difficile en position 2 des thiophènes. Ces couplages nécessiteraient l'utilisation de catalyseurs plus riches et plus encombrés.

A l'inverse, une pipéridine peut être introduite de manière excessivement simple sur le 5-bromothiophène-2-carboxaldéhyde comme nous le verrons dans le paragraphe suivant. C'est donc ce donneur que nous avons choisi pour ces deux séries de chromophores.

2. Monothiophène

a) Synthèse

La synthèse de l'aldéhyde **PT** se fait en une étape à partir de la pipéridine et du 5-bromothiophène-2-carboxaldéhyde. Cette substitution nucléophile aromatique est effectuée dans l'eau, à reflux, et mène à la précipitation du produit (Schéma IV-1).^[329]

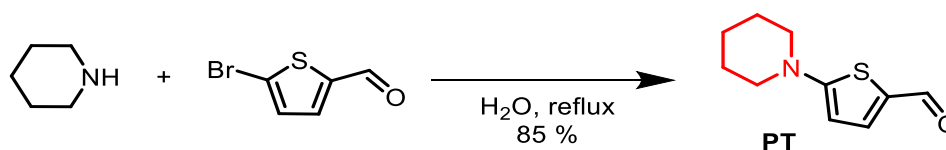


Schéma IV-1. Synthèse de l'aldéhyde de la famille monothiophène.

Une fois l'aldéhyde obtenu, nous avons effectué les condensations de Knoevenagel avec plusieurs accepteurs classiques selon le Schéma IV-2.

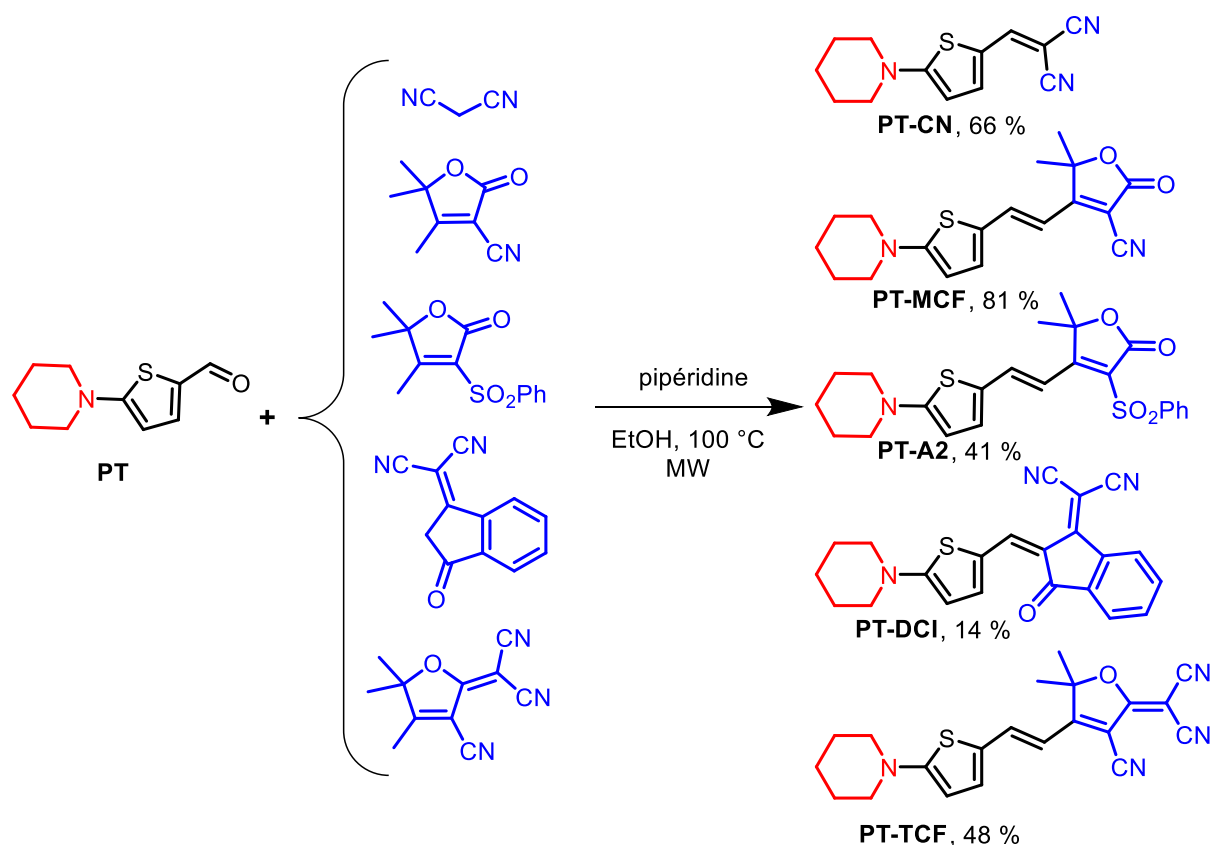


Schéma IV-2. Condensations de Knoevenagel et rendements de synthèse de la série PT.

Enfin, un dernier chromophore possédant le groupe accepteur 2-oxo-4-cyano-5-dicyanométhylène-pyrrolidine (**TCP**) a été synthétisé (Schéma IV-3). En effet, la grande force électroacceptrice de ce groupement le rend prometteur pour décaler l'absorption vers le rouge.^[330,331]

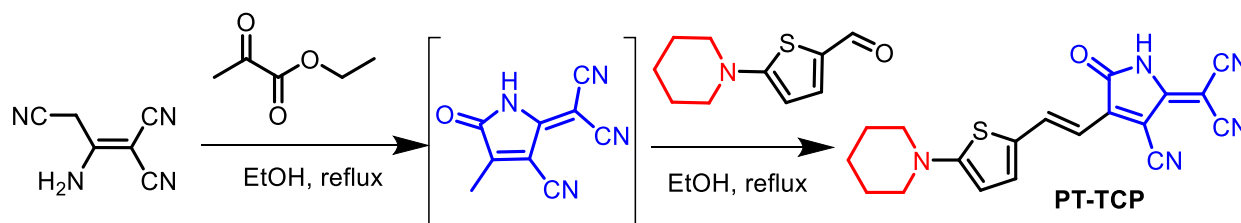


Schéma IV-3. Synthèse de **PT-TCP**.

Le groupement **TCP** est généré in situ par réaction entre le dimère du malononitrile et le pyruvate d'éthyle dans l'éthanol à reflux. **TCP** n'est pas isolé à cause de sa forte réactivité qui lui donne tendance à dimériser. Dans un deuxième temps, l'ajout de l'aldéhyde permet de former le chromophore voulu.

Néanmoins, le groupement lactame de cet accepteur induit une perte de solubilité du chromophore à cause de la possibilité de formation de liaisons hydrogènes intermoléculaires. La faible solubilité a grandement compliqué la purification de ce groupement. Finalement, une recristallisation dans le DCM d'une partie du brut a permis d'isoler **PT-TCP**. Il est possible de fonctionnaliser le groupement lactame par l'addition d'un halogénure d'alkyle ou d'acyle en milieu basique, afin de restaurer une bonne solubilité ou d'introduire un groupement pour le ciblage.

b) Propriétés optiques en solution

- Propriétés dans le chloroforme

Les maxima d'absorption et les coefficients d'absorption molaire des chromophores sont représentés sur la Figure IV-3 et résumés dans le Tableau IV-1.

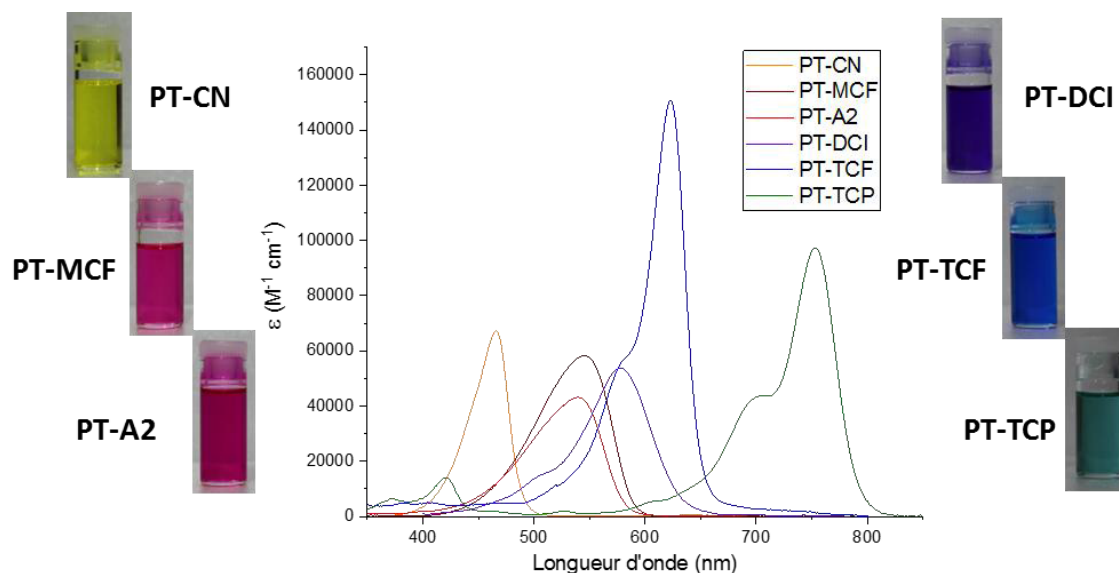


Figure IV-3. Coefficients d'absorption molaire de la famille monothiophène et photographies des solutions à la concentration de $1 \mu\text{M}$ pour **PTT-TCF** et de $2,5 \mu\text{M}$ pour les autres chromophores.

Cette famille de chromophores est caractérisée par un pont conjugué court et une forte délocalisation des électrons π grâce à la faible aromaticité du thiophène. Ainsi, l'augmentation de la force de l'accepteur permet de franchir la barrière cyanine. Plus la force de l'accepteur augmente, plus le caractère cyanine du chromophore augmente et plus ses propriétés optiques deviennent caractéristiques d'une forme cyanine (absorption intense et fine, déplacement de Stokes et solvatochromisme faibles). Le composé **PT-TCF** se distingue des autres par son fort coefficient d'absorption molaire ($150\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ similaire à la valeur de $148\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ publiée par *Ma et al.*).^[332] Le chromophore **PT-TCP** possède une absorption particulièrement remarquable pour une structure si petite, avec une absorption intense à 750 nm dans le chloroforme.

Parmi les composés étudiés, seulement **PT-CN**, **PT-A2**, **PT-MCF** et **PT-TCF** sont fluorescents dans le chloroforme. Leurs spectres d'absorption et d'émission normalisés sont montrés dans la Figure IV-4.

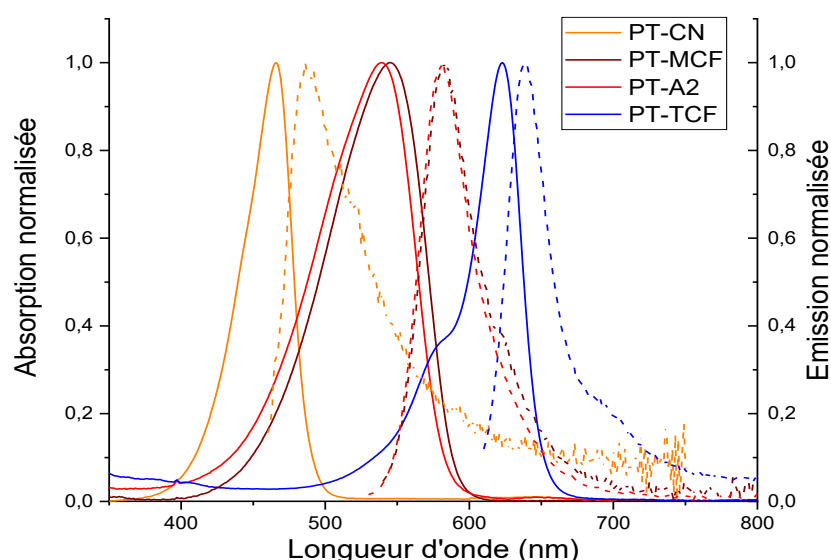


Figure IV-4. Absorption (lignes pleines) et émission (pointillés) de **PT-CN**, **PT-A2**, **PT-MCF** et **PT-TCF** dans le chloroforme.

Ces composés présentent des déplacements de Stokes très faibles, ce qui est cohérent avec le caractère cyanine élevé. Les rendements quantiques de ces chromophores ont été mesurés dans le chloroforme à l'aide d'une sphère d'intégration. Ils sont faiblement fluorescents avec des rendements de l'ordre de quelques pourcents.

Fluorophore	λ_{abs} (nm)	ϵ ($\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$)	λ_{em} (nm)	ϕ (%)	$\Delta\nu$ (cm^{-1})
PT-CN	465	67 200	487	< 1	970
PT-A2	540	43 100	582	1	1 350
PT-MCF	545	58 300	582	0,5	1 150
PT-DCI	580	53 800	(665)	<< 0,1	2 200
PT-TCF	620	150 450	640	3	500
PT-TCP	750	97 300	-	-	-

Tableau IV-1. Propriétés optiques des chromophores dans le chloroforme.

- Solvatochromisme

Une étude du solvatochromisme a été effectuée pour deux composés caractéristiques : **PT-A2** et **PT-TCF**. Les spectres d'absorption et d'émission normalisés dans des solvants de polarité croissante sont représentés dans la Figure IV-5 et la Figure IV-6.

PT-A2 présente un solvatochromisme de 45 nm en absorption entre le toluène et le DMSO, ce qui montre une meilleure stabilisation de l'état de Franck-Condon dans les solvants polaires. En émission, son solvatochromisme est seulement de 25 nm.

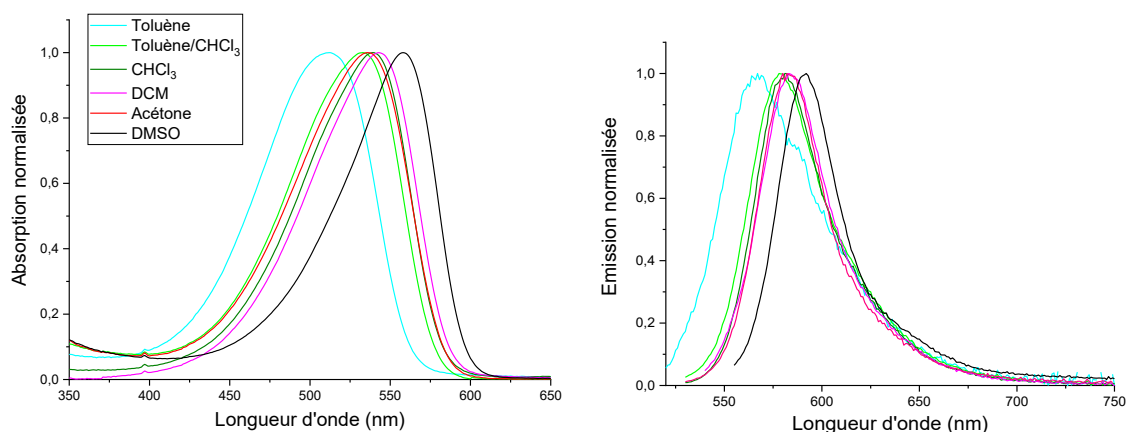


Figure IV-5. Gauche : solvatochromisme en absorption de **PT-A2**.
Droite : solvatochromisme en émission de **PT-A2**.

Le solvatochromisme de **PT-TCF** est très faible en absorption. Seule l'absorption dans le solvant le plus apolaire, le toluène, est décalée d'une dizaine de nanomètres. Cependant, ce décalage hypsochrome semble plutôt provenir d'une agrégation du composé dans ce solvant au vu de la largeur du spectre. Ce composé n'est absolument pas solvatochromique en émission. Le faible solvatochromisme de **PT-TCF** est cohérent avec le fort caractère cyanine de ce colorant.

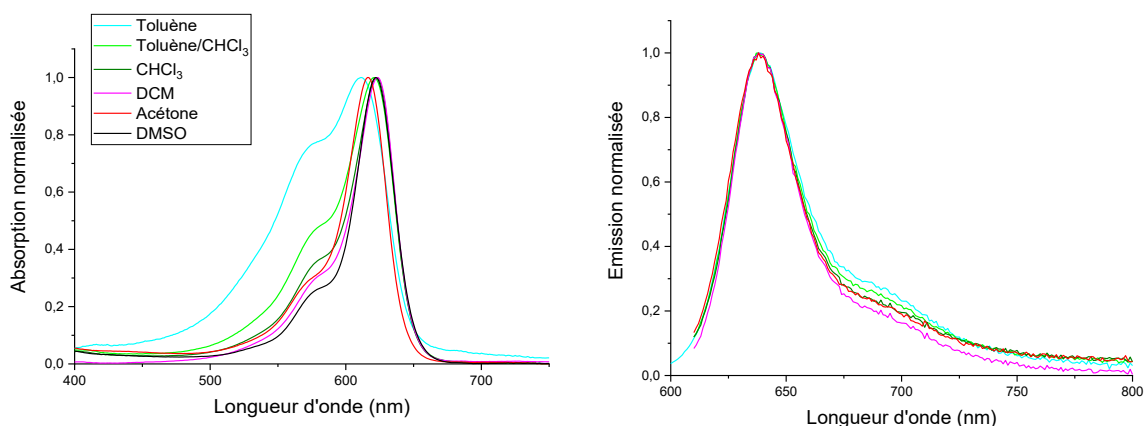


Figure IV-6. Gauche : solvatochromisme en absorption de **PT-TCF**.
Droite : solvatochromisme en émission de **PT-TCF**.

Les fortes absorptions et faibles rendements quantiques de ces chromophores en font des candidats prometteurs pour la photoacoustique. De plus, les bandes d'absorption étant fines, il serait possible d'exciter sélectivement **PT-CN** à 455 nm, **PT-A2** ou **PT-MCF** à 530 nm, **PT-TCF** à 620 nm et **PT-TCP** à 750 nm et donc potentiellement de pouvoir imager quatre localisations avec quatre couleurs différentes.

Cependant, comme nous le verrons plus tard, nous avons accès à quatre diodes lasers aux longueurs d'onde 415 nm, 445 nm, 660 nm et 750 nm (Figure IV-7). Ainsi, selon les propriétés optiques dans le chloroforme, seul le composé **PT-CN** est excitable dans la configuration actuelle.

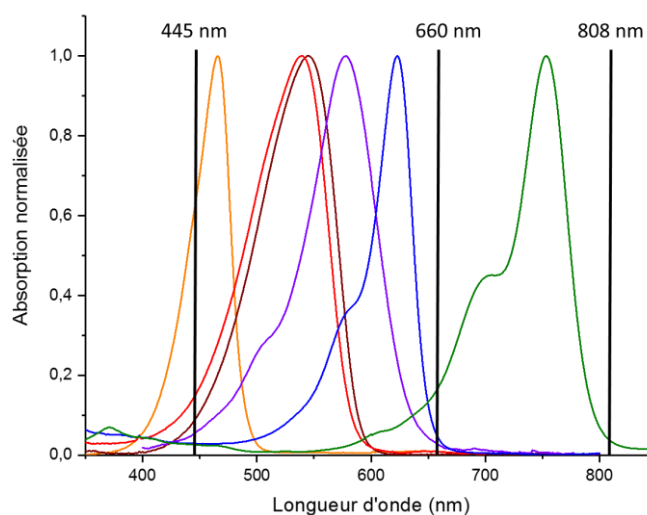


Figure IV-7. Absorptions normalisées de la famille des monothiophènes et longueur d'onde des diodes lasers disponibles pour la photoacoustique.

c) Propriétés optiques en mélange acétone / eau

Comme nous l'avons vu précédemment, ces composés n'absorbent pas dans les bonnes gammes de longueur d'onde pour la configuration du microscope PA à notre disposition. Cependant, la méthode de solubilisation dans l'eau que nous utilisons est la nanopréciipitation afin de former des nanoagrégats. Or, les propriétés optiques peuvent varier de manière importante lors de cette agrégation. Nous avons donc étudié les propriétés optiques des composés dans des mélanges acétone/eau.

Tous les composés fluorescents présentent une extinction progressive de leur fluorescence lorsque la proportion d'eau augmente. Les comportements des composés **PT-MCF** et **PT-TCF** dans différents mélanges acétone/eau sont représentés respectivement dans la Figure IV-8 et dans la Figure IV-9.

Le comportement le plus curieux est celui de **PT-MCF** et de **PT-A2** (non présenté ici car identique à **PT-MCF**). L'augmentation de la fraction volumique en eau se traduit par un décalage bathochrome de l'absorption ainsi qu'une augmentation de l'intensité d'absorption et une diminution de la largeur de la bande. Ainsi, l'absorption passe de 550 nm dans l'acétone à 575 nm lorsque la fraction volumique d'eau est de 90 %. Ce décalage bathochrome et hyperchrome serait intéressant pour une imagerie PA avec absorption à 575 nm. Côté émission, un déplacement de 10 nm vers le rouge ainsi qu'une décroissance conséquente de l'intensité d'émission sont observés.

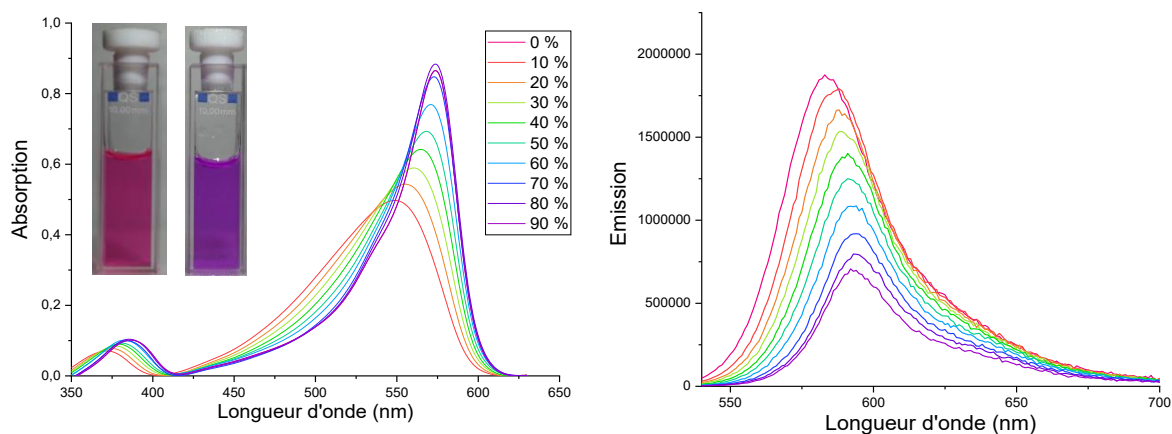


Figure IV-8. Absorption (gauche) et émission (droite) de **PT-MCF** dans des mélanges acétone/eau. Les pourcentages correspondent aux pourcentages volumiques d'eau dans le mélange.
Insert : photographie de **PT-MCF** dans l'acétone et dans un mélange acétone/eau 20:80.

Pour **PT-TCF**, lors de l'augmentation de la fraction volumique en eau, l'absorption commence par augmenter légèrement en même temps que la polarité puis diminue de nouveau lorsque le chromophore commence à s'agréger. La proportion d'eau n'a pas d'influence sur la position du maximum d'absorption. Une extinction rapide de la fluorescence avec l'augmentation de la polarité est observée.

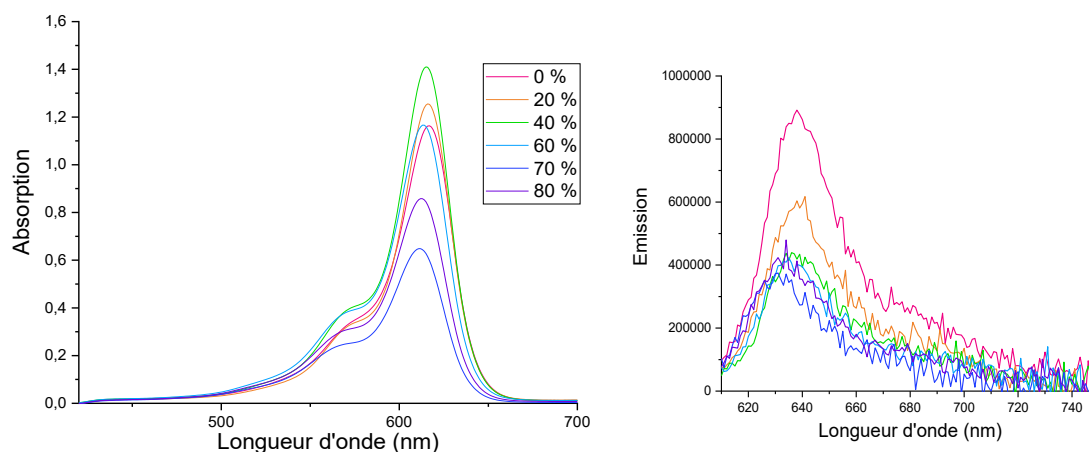


Figure IV-9. Absorption (gauche) et émission (droite) de **PT-TCF** dans des mélanges acétone/eau. Les pourcentages correspondent aux pourcentages volumiques d'eau dans le mélange.

d) Fluorescence à l'état solide et structures DRX

Les deux composés **PT-CN** et **PT-A2** présentent une fluorescence sous forme de poudre (Figure IV-10). Les maxima d'émissions de **PT-CN** et de **PT-A2** sont respectivement à 590 nm et 680 nm avec des rendements quantiques de 4 % et 9%. De plus, **PT-A2** présente un épaulement à 705 nm d'intensité proche de celle du maximum. Cette bande d'émission large couplée au bon rendement quantique pour ces longueurs d'onde font de **PT-A2** un fluorophore intéressant pour l'émission solide.

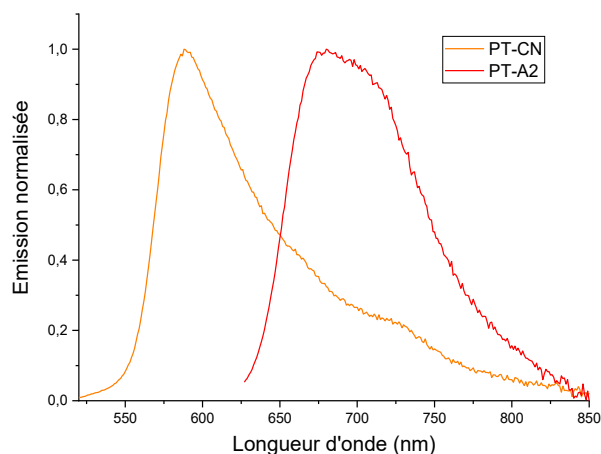


Figure IV-10. Spectres de fluorescence des poudres de **PT-CN** et de **PT-A2**.

Nous avons obtenu les structures DRX de **PT-A2** et de **PT-TCF**. La Figure IV-11 représente une molécule de **PT-A2** dans la maille. Le phényle de l'accepteur **A2** est disposé avec un angle de 60° par rapport au plan de l'accepteur. Il est intéressant de noter que dans ce fluorophore, la pipéridine forme un angle de 50° avec le plan du chromophore. Les longueurs des liaisons entre atomes de carbones du système π sont reportées dans la Figure IV-11. Au sein du groupement thiophène, les longueurs de liaisons sont quasiment identiques puis, dans la double liaison ainsi que l'accepteur, la BLA devient de 0,05 Å. Cela montre que la charge du donneur est bien délocalisée dans le cycle thiophène, puis que le chromophore se comporte comme un dipôle entre le thiophène et **A2**.

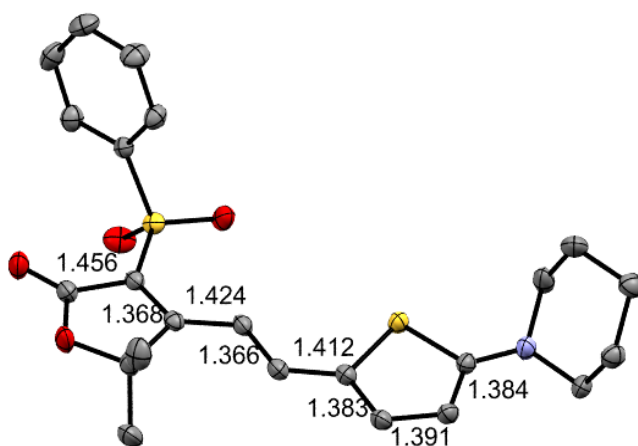


Figure IV-11. Structure DRX d'une molécule de **PT-A2** et longueur des liaisons C-C impliquées dans la conjugaison.

L'arrangement intermoléculaire est représenté dans la Figure IV-12. Une maille est constituée de quatre molécules antiparallèles deux à deux. A plus grande échelle, l'agencement selon l'axe cristallographique *b* se fait sous la forme de chevrons.

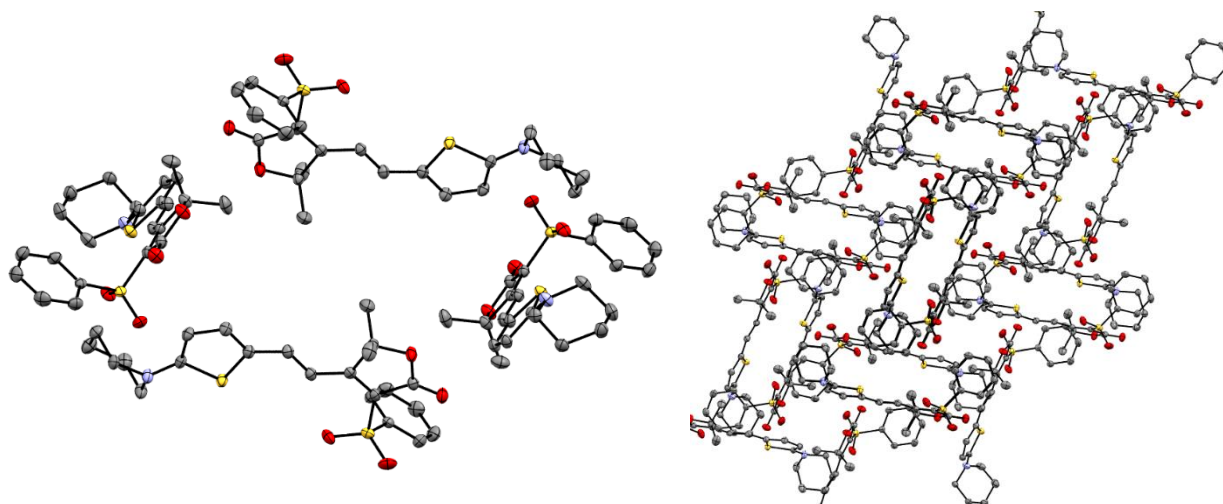


Figure IV-12. Gauche : arrangement des chromophores au sein d'une maille.
Droite : arrangement intermoléculaire vu selon l'axe cristallographique b.

La structure DRX de **PT-TCF** est présentée dans la Figure IV-13. Contrairement à **PT-A2** ci-dessus, le plan moyen de la pipéridine est quasiment identique au plan du chromophore. La disposition de l'accepteur est aussi inversée : dans le cas de **PT-A2**, les doubles liaisons du cycle 2,5-dihydrofurane et du pont conjugué sont en conformation *s-trans* et *s-cis* dans le cas de **PT-TCF**. Cette conformation *s-cis* est très rare chez nos chromophores. La BLA est aussi sensiblement différente de celle de **PT-A2**. Ici, la conjugaison est bien meilleure du côté de l'accepteur avec une BLA très faible dans l'accepteur et la double liaison, puis la BLA augmente dans le groupement thiophène.

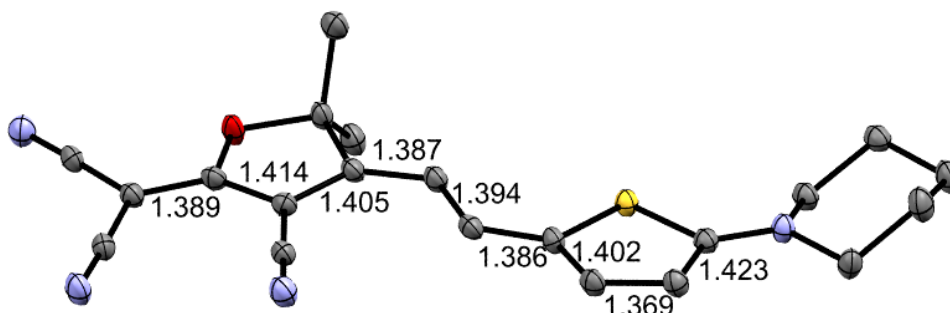


Figure IV-13. Structure DRX d'une molécule de **PT-TCF** et longueur des liaisons C-C impliquées dans la conjugaison.

3. Bithiophène

Parallèlement, nous avons synthétisé une famille de chromophores basée sur un pont π conjugué bithiophène (Figure IV-14). L'allongement de la longueur du pont devrait se traduire par un décalage bathochrome des propriétés optiques.

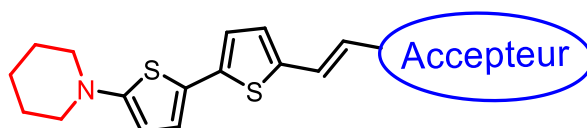


Figure IV-14. Structure générale des chromophores basés sur un pont bithiophène.

a) Première voie de synthèse

Dans une première approche pour obtenir les chromophores avec un pont bithiophène, nous avons voulu effectuer la substitution nucléophile aromatique entre la pipéridine et le 5'-bromo-5,2'-bithiophène-2-carboxaldéhyde **IV-2**. Afin d'obtenir ce synthon, nous avons effectué un couplage de Suzuki-Miyaura entre l'acide thiophène-2-boronique et le 5-bromothiophénecarboxaldéhyde afin d'obtenir **IV-1**, puis une bromation à l'aide du N-bromosuccinimide (Schéma IV-4).

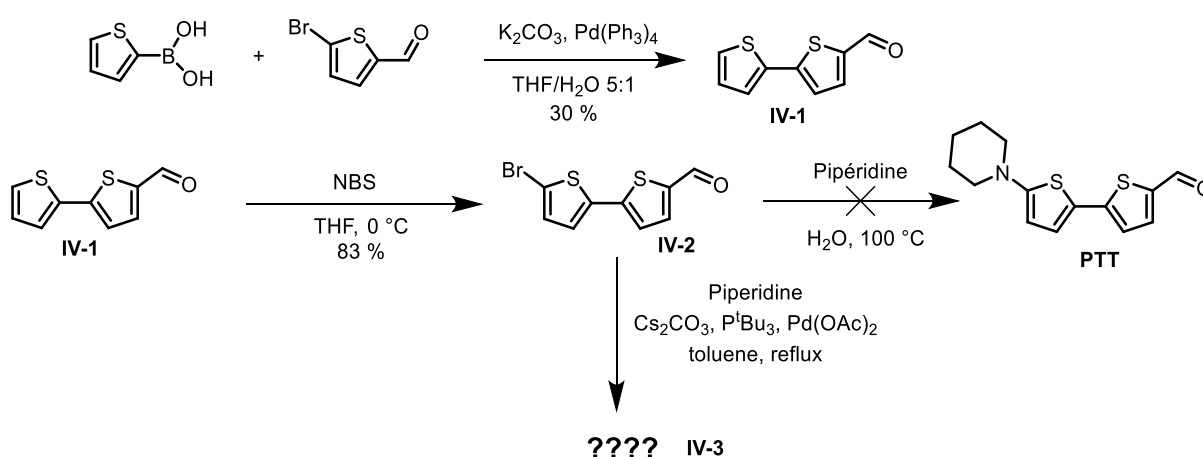


Schéma IV-4. Première voie de synthèse pour le pont bithiophène.

Cependant, la S_NAr sur **IV-2** ne permet pas d'obtenir le produit souhaité. En effet, dans la partie précédente, le 5-bromo-thiophénecarboxaldéhyde est un liquide miscible avec l'eau chaude. Ici, l'ajout d'un deuxième thiophène augmente le point de fusion à 140 °C.^[333] Un non solvant tel que l'eau ne parvient pas à solubiliser ce composé qui ne peut pas réagir. Même un ajout de 30 % de THF, qui permet une dissolution à chaud du réactif, mène à une précipitation du produit de départ peu après.

Nous avons ensuite essayé d'introduire la pipéridine par réaction de Buchwald-Hartwig. Ce couplage est supposé être plus aisé avec des amines aliphatiques qu'avec la *N,N*-diphénylamine. Le couplage est réalisé avec Pd(OAc)₂ en présence de Cs₂CO₃ et de P^tBu₃ et donne le produit majoritaire **IV-3**. Cependant, le spectre RMN du proton de ce produit (Figure IV-15) contient bien les signaux des protons d'une pipéridine et de protons aromatiques mais aucun signal d'aldéhyde. De plus, cinq protons aromatiques sont observés au lieu des quatre attendus. La première hypothèse est donc que la liaison C-N s'est bien formée aux dépens de la liaison entre le deuxième thiophène et le groupement aldéhyde.

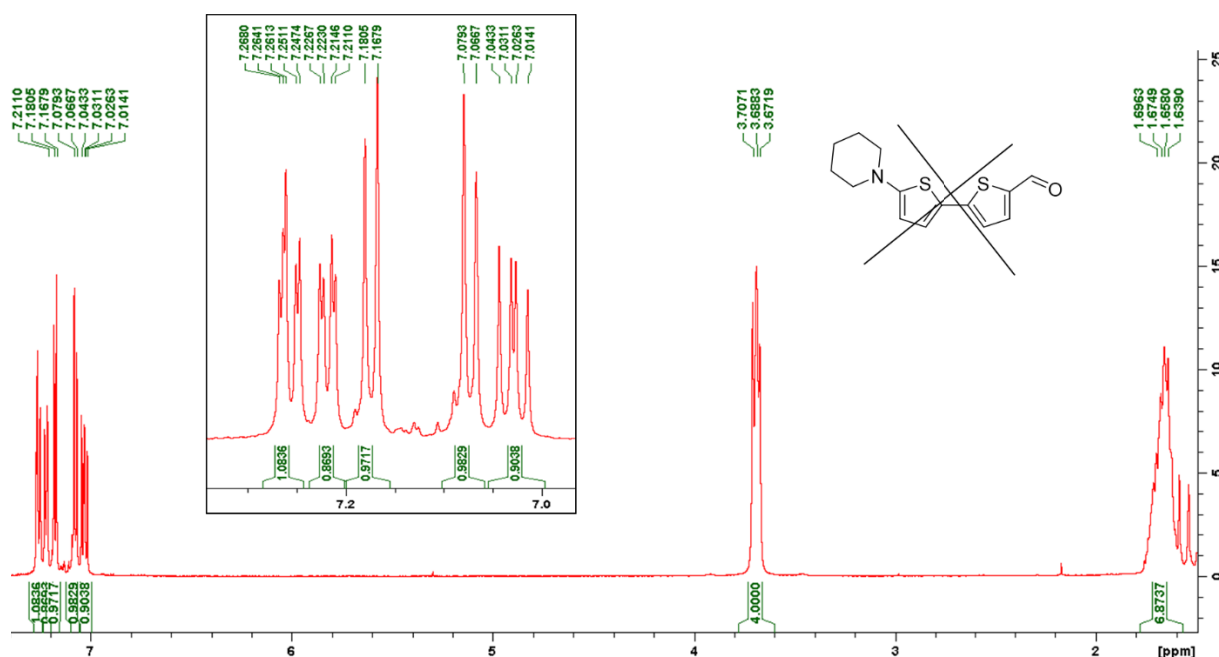


Figure IV-15. Spectre ^1H RMN dans CDCl_3 de **IV-3** isolé après le couplage de Buchwald-Hartwig.

Pourtant, une analyse par masse nous donne un ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ à 278,1, ce qui correspond plutôt bien au produit attendu **PTT** dont la masse exacte est de 277,06.

Les analyses RMN publiées du 5'-piperidinyl-2',5-bithiophène-2-carboxaldéhyde, **PTT**, et du 5'-piperidino-2',2-bithiophène nous indiquent qu'un des C-H aromatiques du thiophène lié à une pipéridine se situe vers 6 ppm, soit beaucoup plus blindé que nos signaux aromatiques.^[334,335]

Finalement, l'analyse des spectres RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC) ainsi que d'une NOESY nous a permis d'identifier **IV-3** comme étant le produit de transformation de l'aldéhyde en amide et de la perte de l'atome de brome (Schéma IV-5). **IV-3** et **PTT** sont des isomères de fonction et possèdent donc la même masse exacte.

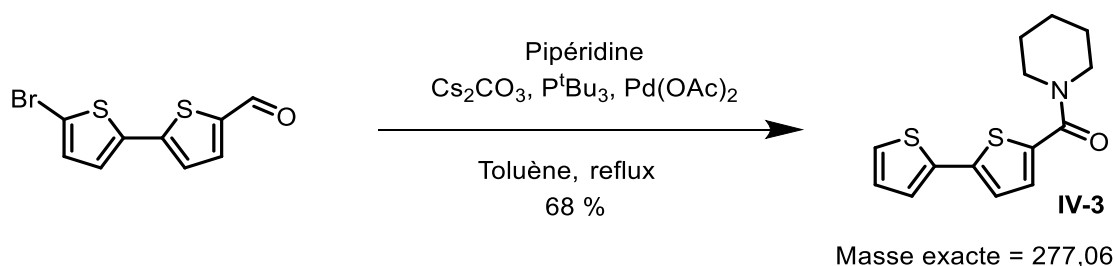


Schéma IV-5. Produit de la réaction palladocatalysée entre la pipéridine et **IV-2**.

Bien que rare, la formation palladocatalysée d'amide à partir d'aldéhyde a déjà été rapportée.^[336] Le mécanisme proposé pour cette réaction passe par un intermédiaire hémiaminal qui est ensuite oxydé en amide selon le Schéma IV-6. L'oxydant peut-être un bromure d'aryle comme dans notre cas.

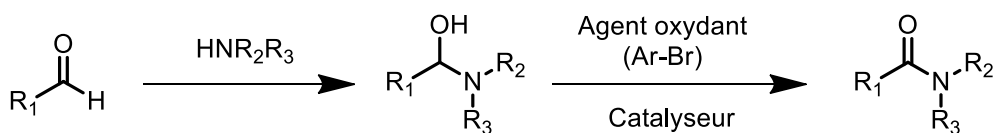


Schéma IV-6. Mécanisme générale de la formation métallocatalysée d'un amide à partir d'un aldéhyde (tiré de [336]).

b) Deuxième voie de synthèse

La première voie de synthèse ne nous ayant pas permis d'obtenir le produit souhaité, nous avons décidé d'utiliser une deuxième méthode initialement proposée par Kirsch *et al.*^[335] L'étape clé de cette synthèse est la cyclisation d'un bicarbonyl en groupement thiophène à l'aide du réactif de Lawesson (Schéma IV-7).

Une acylation de Friedel-Crafts avec l'anhydride succinique permet d'obtenir l'acide 4-oxo-4-(thiophèn-2-yl)butanoïque, **IV-4**. Cet acide est activé par le *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) puis par l'hydroxybenzotriazole (HOBt) avant d'être transformé en amide lors de l'addition de pipéridine pour donner **IV-5**. Le réactif de Lawesson permet alors d'obtenir le second groupement thiophène et de former **IV-6**. Enfin, la formylation vers **PTT** est effectuée par déprotonation de la position 5 du thiophène original puis par action du lithien formé sur le *N,N*-diméthylformamide. **PTT** est obtenu sans encombre avec un rendement global de 47 %.

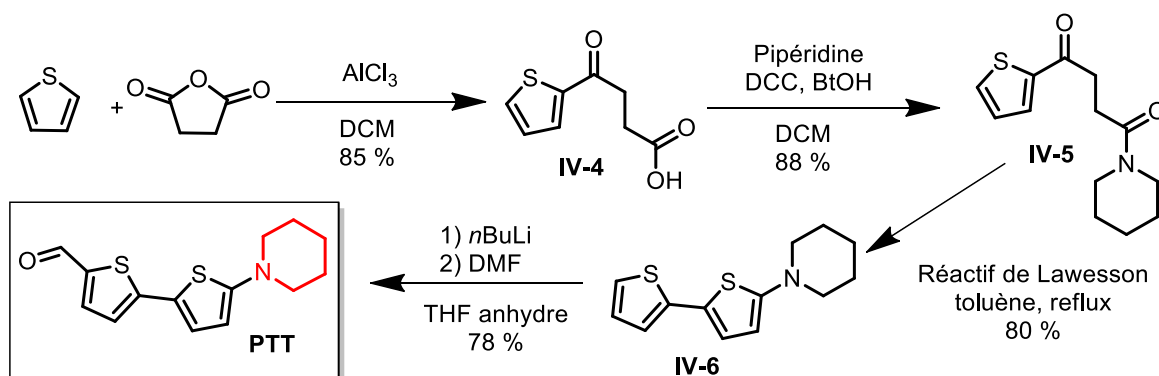


Schéma IV-7. Deuxième voie de synthèse du pont bithiophène.

Dans cette voie de synthèse, la liaison C-N est créée par une réaction d'amidation plutôt que par un couplage palladocatalysé. Nous nous sommes donc demandé s'il était possible d'introduire la *N,N*-diphénylamine par cette voie. Toutefois, la *N,N*-diphénylamine ne s'est pas montrée réactive envers **IV-4** activé par DCC/HOBt.

Une fois l'aldéhyde **PTT** obtenu, les chromophores peuvent être synthétisés par condensation de Knoevenagel et sont représentés dans la Figure IV-16 avec les rendements de synthèse.

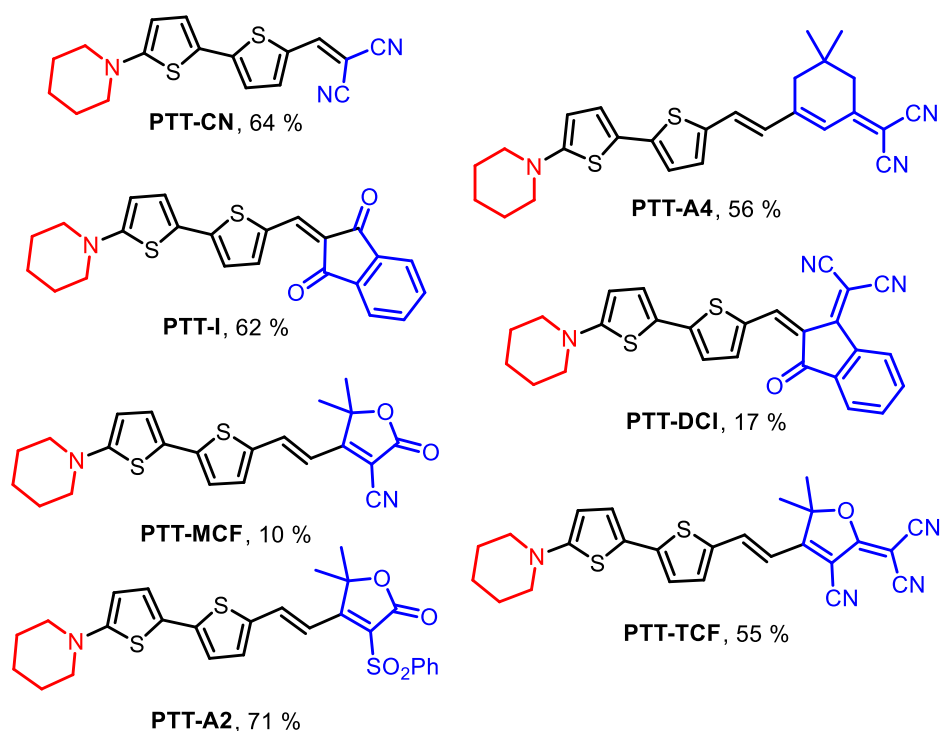


Figure IV-16. Chromophores basés sur un pont bithiophène et rendements des condensations de Knoevenagel.

De plus, nous avons aussi synthétisé le chromophore **PTT-TCP** avec l'accepteur **TCP** selon le Schéma IV-8.

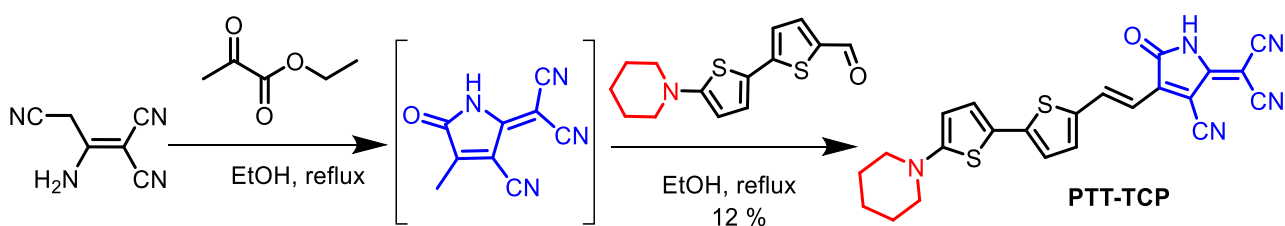


Schéma IV-8. Synthèse de **PTT-TCP**.

c) Propriétés optiques en solution

- Propriétés dans le chloroforme

Nous avons tout d'abord étudié les propriétés optiques des colorants dans le chloroforme. **PTT** s'est avéré être en lui-même un fluorophore intéressant et a été étudié avec les autres. Les spectres d'absorption et d'émission des chromophores sont représentés dans la Figure IV-17.

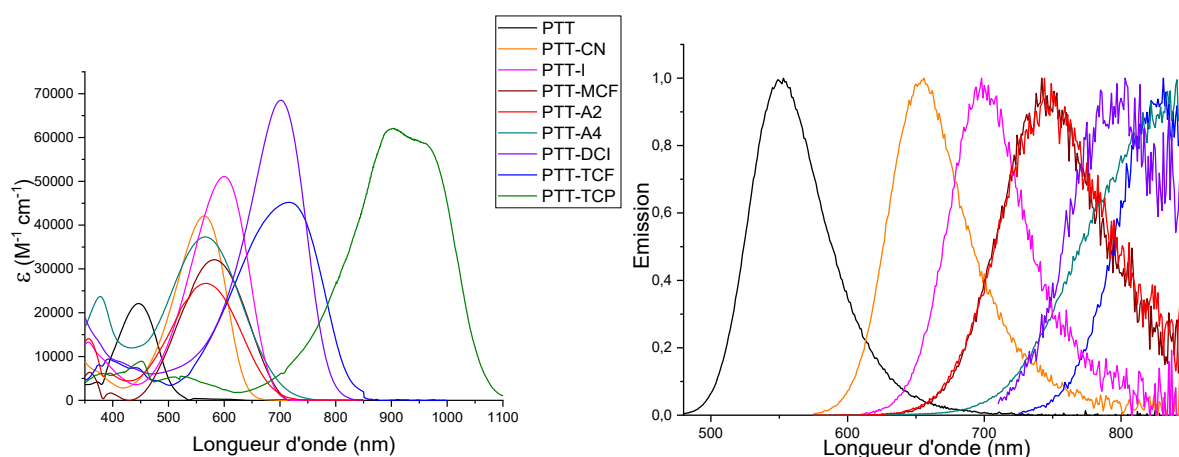


Figure IV-17. Coefficients d'absorption molaire (gauche) et spectres normalisés d'émission des chromophores **PTT** dans le chloroforme.

L'ajout d'un deuxième thiophène a bien permis de décaler les propriétés optiques vers le rouge. Ce décalage est accompagné par une perte du caractère cyanine pour les accepteurs les plus forts. Cette localisation des charges provient de l'augmentation de la longueur du pont conjugué. Le décalage bathochrome de l'absorption lors de l'augmentation du pont conjugué est très inhomogène (Tableau IV-2). Par exemple, avec les accepteurs **CN**, **DCI**, **TCF** et **TCP**, le décalage est d'environ 100 nm. A l'inverse, pour les accepteurs **A2** et **MCF**, le décalage n'est que de 30 nm. L'allongement de la conjugaison entraîne une chute des coefficients d'absorption molaire, sauf pour les composés avec l'accepteur **DCI** pour lequel l'intensité d'absorption augmente. Concernant l'émission dans le chloroforme, trois composés possèdent une fluorescence intéressante dans le chloroforme : **PTT**, **PTT-CN** et **PTT-I** avec des maxima d'émission (rendements quantiques) respectivement à 552 nm (39 %), 653 nm (22 %) et 698 nm (12 %). Les autres composés sont faiblement émissifs vers 750 nm et au-delà. Seul **PTT-TCP** ne présente aucune fluorescence. Notamment, le composé **PTT-A4** possède un déplacement de Stokes de 275 nm (5 800 cm⁻¹) et un maximum d'émission à 840 nm, mais un rendement quantique inférieur à 1 %.

Accepteur	PT					PTT				
	λ_{abs}	ϵ	λ_{em}	ϕ	$\Delta\nu$	λ_{abs}	ϵ	λ_{em}	ϕ	$\Delta\nu$
	(nm)	(cm ⁻¹ M ⁻¹)	(nm)	(%)	(cm ⁻¹)	(nm)	(cm ⁻¹ M ⁻¹)	(nm)	(%)	(cm ⁻¹)
Ald	-	-	-	-	-	448	22 100	552	39	4 200
CN	465	67 200	487	< 1	970	565	42 100	653	22	2 400
I	-	-	-	-	-	600	51 300	698	12	2 300
A2	540	43 100	582	1	1 350	570	26 700	745	< 1	4 100
MCF	545	58 300	582	0,5	1 150	580	32 100	744	< 1	3 800
A4	-	-	-	-	-	565	37 300	840	< 1	5 800
DCI	580	53 800	(665)	<< 0,1	2 200	700	68 500	792	< 1	1 650
TCF	620	150 450	640	3	500	713	45 200	827	< 1	1 900
TCP	750	97 300	-	-	-	902	62 100	-	-	-

Tableau IV-2. Comparaison des propriétés optiques dans le chloroforme de la série **PT** et de la série **PTT**.

Ainsi, deux composés semblent particulièrement intéressants pour notre application : **PTT-DCI** et **PTT-TCF**. Le léger décalage des maxima d'absorption par rapport à la longueur d'onde de la diode laser

(660 nm) est compensé par des spectres larges. Ainsi, à 660 nm, les coefficients d'absorption molaire de ces deux composés sont respectivement de 51 500 et 38 400 M⁻¹cm⁻¹. A 808 nm, le composé le plus intéressant est **PTT-TCP** avec un coefficient d'absorption à 39 200 M⁻¹cm⁻¹. Cependant, le spectre de ce chromophore semble agrégé dans le chloroforme. Sa faible solubilité risque de compliquer son utilisation.

- Solvatochromisme

Le solvatochromisme a été évalué uniquement avec trois solvants : le toluène, le chloroforme et le DMSO, à 3 µM (Tableau IV-3). Pour les composés avec un accepteur de force moyenne, l'augmentation de la polarité entraîne un faible déplacement bathochrome de l'absorption de moins de 40 nm entre le toluène et le DMSO. Pour les trois accepteurs les plus forts, ce décalage est plus conséquent : 68 nm pour **PTT-DCI** et 77 nm pour **PTT-TCF**. Pour **PTT-TCP**, le passage du toluène au chloroforme engendre un décalage de 115 nm, cependant, lors du passage au DMSO, un décalage hypsochrome de plus de 200 nm est observé. Ce décalage provient probablement de la formation de liaisons hydrogène entre le lactame et le DMSO.

		PTT	PTT-CN	PTT-I	PTT-A2	PTT-MCF	PTT-A4	PTT-DCI	PTT-TCF	PTT-TCP
Absorption	Toluène	434	542	574	535	545	550	672	648	775
	CHCl ₃	448	565	600	570	580	565	700	713	902
	DMSO	451	575	618	575	579	567	740	725	650
Emission	Toluène	515	625	665	693	693	750	756	792	-
	CHCl ₃	552	653	698	745	744	840	792	827	-
	DMSO	575	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau IV-3. Solvatochromisme des chromophores PTT.

Pour la plupart des composés, le DMSO éteint complètement la fluorescence. Pour la moitié des chromophores, la fluorescence maximale est atteinte dans le chloroforme : **PTT-CN**, **PTT-A2**, **PTT-MCF** et **PTT-A4**. Les autres composés sont plus fluorescents dans le toluène. En exemple, les spectres d'absorption et d'émission de **PTT-DCI** sont représentés dans la Figure IV-18.

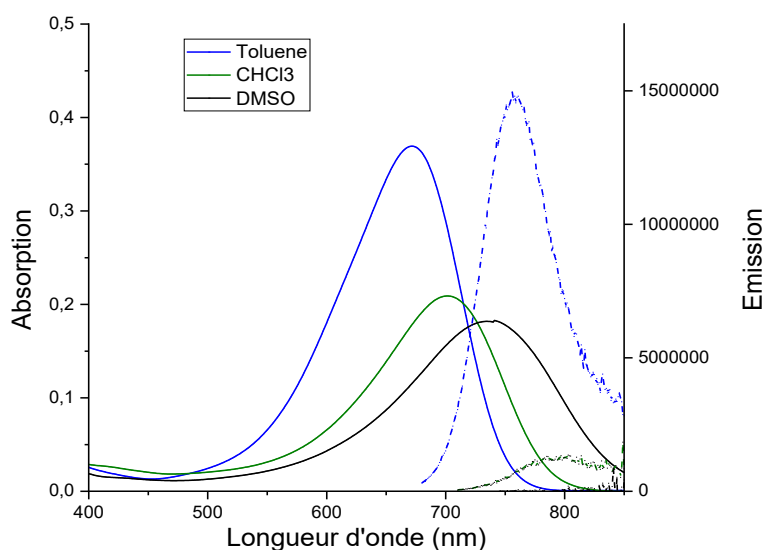


Figure IV-18. Spectres d'absorption et d'émission de **PTT-DCI** dans le toluène, chloroforme et le DMSO à 3 µM.

d) Propriétés optiques dans des mélanges acétone/eau

Nous avons étudié les propriétés optiques de ces chromophores dans des mélanges acétone/eau. Similairement aux monothiophènes, cette série présente une forte extinction de la fluorescence lorsque la fraction d'eau augmente. Ainsi, tous les composés **PTT** perdent leur fluorescence en agrégats. Ainsi, seule l'absorption des chromophores dans un mélange acétone/eau 10:90 à 40 μM est représentée dans la Figure IV-19.

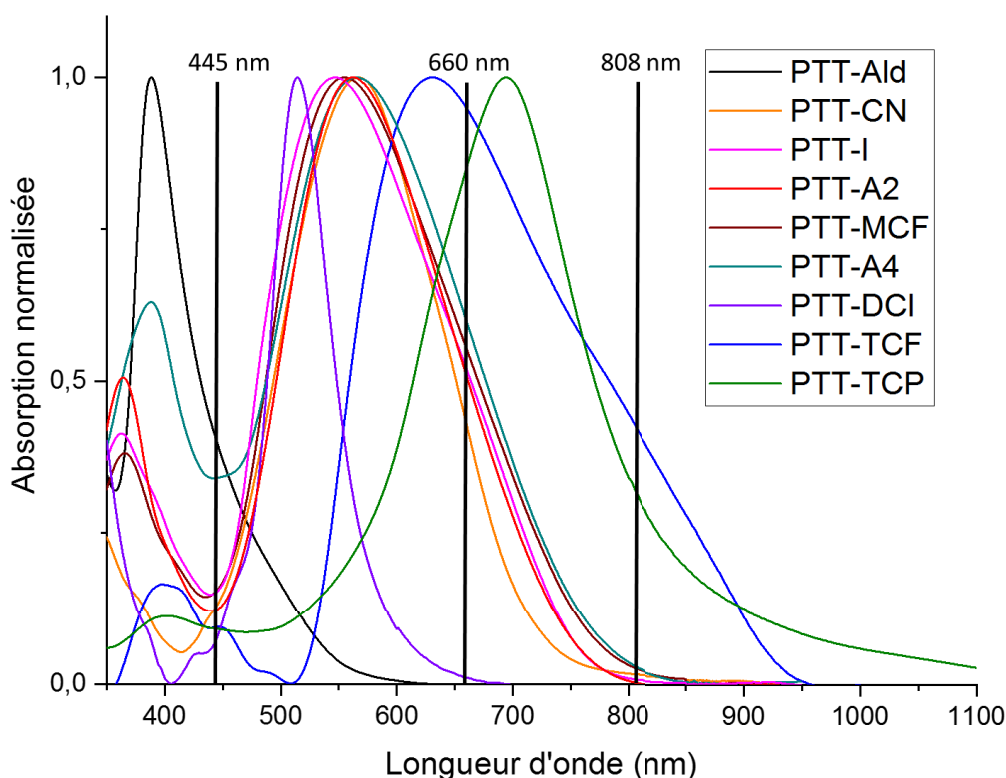


Figure IV-19. Spectres d'absorption normalisés des chromophores dans un mélange acétone/eau 10:90 à 40 μM .

Ces chromophores présentent un décalage hypsochrome conséquent de l'absorption lors de l'agrégation. Le Tableau IV-4 compare les maxima d'absorption en solution dans le chloroforme avec ceux en agrégats. Les composés les plus affectés par l'agrégation H sont **PTT-DCI** et **PTT-TCP**, avec un décalage respectif de 186 nm et 207 nm entre le chloroforme et l'agrégat. A l'inverse, les composés **PTT-CN** et **PTT-A4** ne présentent aucun décalage. Hormis **PTT-TCP**, les agrégats des chromophores **PTT** possèdent tous un maximum d'absorption en dessous de la fenêtre biologique.

	PTT	PTT-CN	PTT-I	PTT-A2	PTT-MCF	PTT-A4	PTT-DCI	PTT-TCF	PTT-TCP
CHCl_3	448	565	600	570	580	565	700	713	902
Acétone/eau 10:90	388	569	546	562	555	565	514	630	695

Tableau IV-4. Maxima d'absorption des chromophores **PTT** dans le chloroforme ainsi que dans un mélange acétone/eau 90:10.

En conclusion, l'utilisation de ces composés comme nanoagrégats risque d'être complexifiée par la forte agrégation H de cette série de chromophores.

e) Fluorescence à l'état solide et structure DRX

Seul **PTT** possède une fluorescence à l'état solide avec une émission prometteuse à 660 nm et un rendement quantique de 24 %. Son spectre d'émission est représenté dans la Figure IV-20.

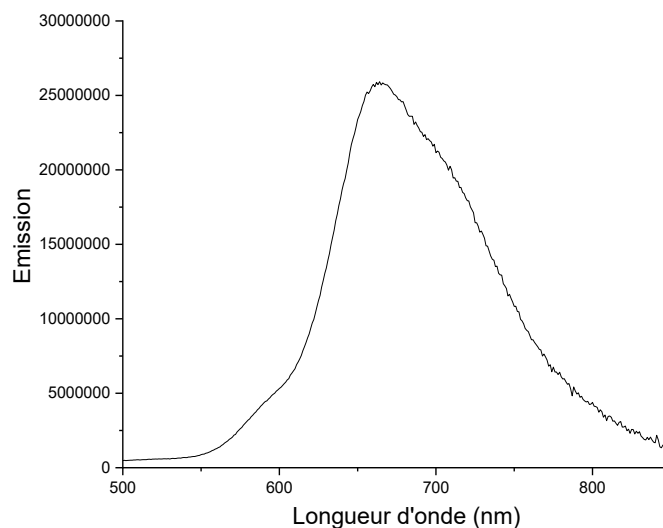


Figure IV-20. Spectre d'émission de **PTT** à l'état solide (poudre).

Nous avons obtenu la structure DRX d'un des fluorophores : **PTT-TCF**. Cette structure est représentée dans la Figure IV-21 avec les longueurs de liaisons dans le système π . Ce composé a cristallisé avec une molécule de dichlorométhane dans deux positions possibles. Les deux cycles thiophènes sont disposés tête-bêche. Similairement à **PT-TCF**, la pipéridine s'arrange dans le plan du chromophore. Enfin, la BLA du système conjugué est plus importante que dans les composés **PT-A2** et **PT-TCF**, ce qui est cohérent avec la plus forte localisation des charges et le caractère cyanine moins important des bithiophènes.

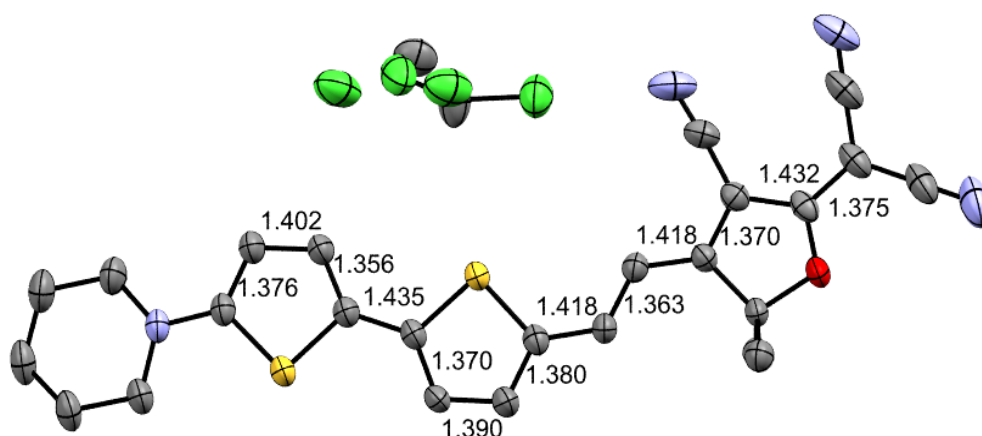


Figure IV-21. Structure DRX de **PTT-TCF** et longueur des liaisons du système conjugué.

4. Bilan

En conclusion, nous avons synthétisé des chromophores basés sur un pont thiophène ou bithiophène avec des absorptions couvrant toute la gamme du visible. Au vu des propriétés optiques en solution, plusieurs chromophores de ces deux séries s'avèrent prometteurs pour l'imagerie photoacoustique. De plus, nous avons aussi identifié deux chromophores possédant une fluorescence à l'état solide dans la fenêtre biologique ainsi que trois chromophores bithiophènes ayant une forte fluorescence en solution.

Cependant, pour la majorité des colorants, notamment bithiophènes, leur agrégation de type H entraîne un décalage hypsochrome de l'absorption ainsi qu'une extinction de la fluorescence en agrégats. Cette agrégation H nous empêche d'utiliser la méthode de nanoprécipitation pour formuler les colorants en milieu aqueux. Ces chromophores devront être incorporés dans des nanoparticules pluronic/silice.

B. D'anciens colorants pour une nouvelle application

1. Présentation des chromophores

Quelques chromophores préalablement synthétisés au laboratoire possèdent une absorption dans le rouge ou dans le proche infrarouge. Pour cette étude photoacoustique, quatre colorants nous paraissaient prometteurs au vu de leur spectre d'absorption et de leur coefficient d'absorption molaire. Trois de ces chromophores, **CPO1** et **CPO2** et **CPO5** sont des hémicyanines basés sur l'accepteur **TCF** et un donneur indoléine. Ces trois chromophores ont notamment été étudiés par notre groupe pour l'optique non-linéaire du second ordre et en particulier pour la modulation électro-optique ainsi que pour la limitation optique dans les longueurs d'onde des télécommunications.^[16,337] Nous avons aussi développé une synthèse robuste qui permet de les obtenir à une échelle de la dizaine de grammes.^[24]

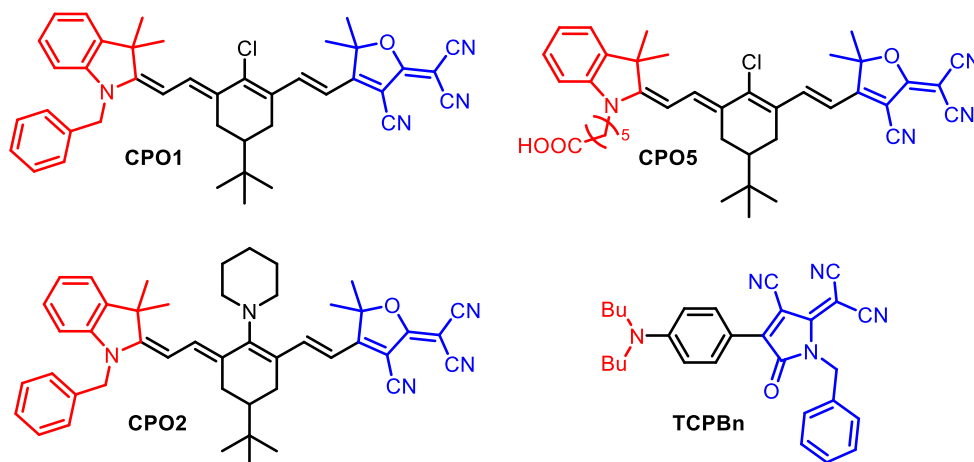


Figure IV-22. Structure des chromophores préalablement synthétisés au laboratoire.

Enfin, le dernier chromophore **TCPBn** est basé sur l'accepteur **TCP** et est synthétisé à partir du chromophore **IV-7** que nous avons fonctionnalisé par un groupement benzyle selon le Schéma IV-9. Cette fonctionnalisation permet d'améliorer la solubilité du colorant en empêchant la formation de liaison hydrogène intermoléculaire. Cette fonctionnalisation modifie très peu les propriétés optiques dans les solvants aprotiques.

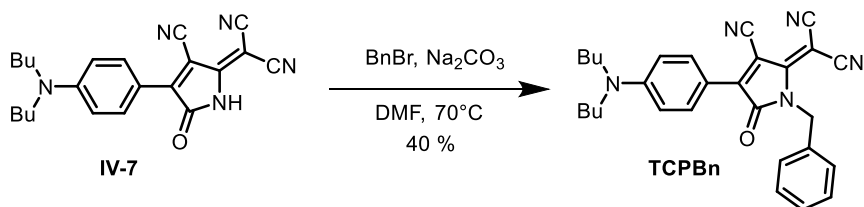


Schéma IV-9. Fonctionnalisation du groupement TCP afin d'obtenir **TCPBn**.

2. Propriétés optiques en solution

Ces composés présentent une forte absorption autour de 808 nm pour **CPO1** et **CPO5** et proche de 660 nm pour **CPO2** et **TCPBn** dans le chloroforme. Les spectres d'absorption dans le chloroforme à 10 μM sont représentés dans la Figure IV-23.

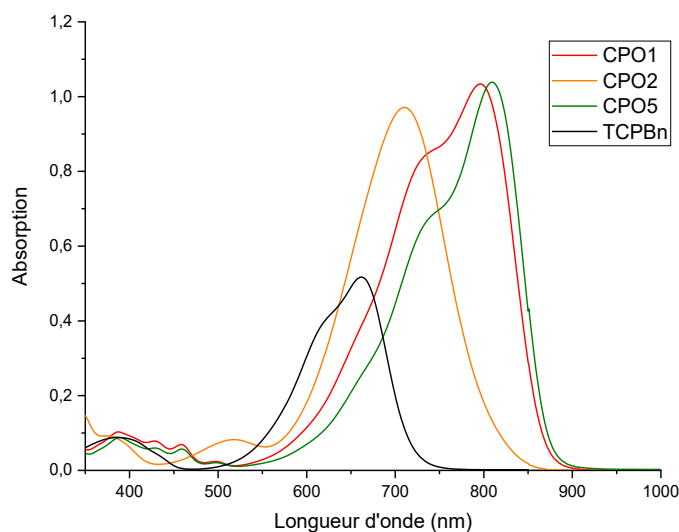


Figure IV-23. Absorption des chromophores dans le chloroforme à 10 μM .

Ces chromophores présentent des coefficients d'absorption relativement élevés, en particulier les trois hémicyanines. Ainsi, **TCPBn** possède un coefficient d'absorption molaire de 51 700 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à 660 nm et les coefficients de **CPO1**, **CPO2** et **CPO5** sont respectivement de 103 300, 97 100 et 103 750 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à 795 nm, 710 nm et 811 nm.

C. Imagerie photoacoustique

1. Présentation du microscope PA

Le microscope photoacoustique (PAM) que nous avons utilisé est un dispositif fait-maison assemblé par nos collaborateurs Olivier Hugon et Boudewijn Van der Sanden au Liphy à Grenoble. Le schéma du microscope est représenté dans la Figure IV-24.

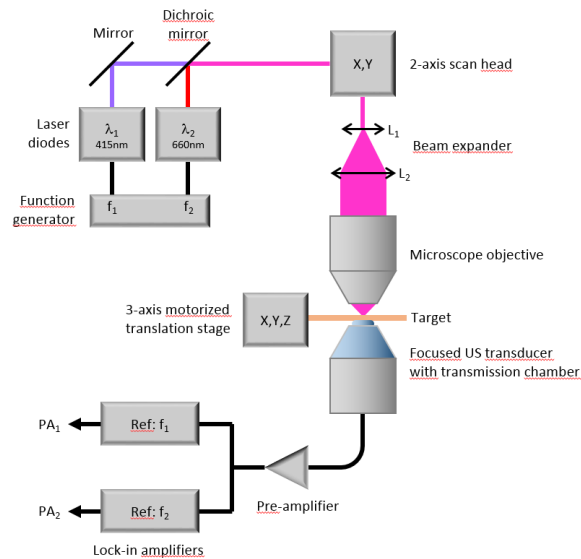


Figure IV-24. Schéma du microscope photoacoustique.

Leur PAM dispose de quatre diodes lasers (415 nm, 445 nm, 660 nm et 808 nm) qui peuvent être modulées par une fonction sinusoïdale d'une fréquence autour de 5 MHz. Pour l'instant, il est possible de travailler avec deux longueurs d'onde en même temps afin d'imager à la fois l'hémoglobine (415 nm) et un colorant absorbant dans la fenêtre biologique (660 nm ou 808 nm). Dans ce cas, l'un des lasers sera modulé à une fréquence de 5 MHz et l'autre à 5,3 MHz. Le faisceau laser est ensuite dirigé vers un miroir motorisé afin de pouvoir scanner l'échantillon dans le plan xy. Le faisceau est ensuite étendu pour couvrir toute l'entrée d'un objectif x20. Enfin, le faisceau est focalisé sur l'échantillon par l'objectif avec des puissances moyennes en sortie d'objectif de l'ordre de quelques milliwatts. Afin d'effectuer plus facilement la focalisation du laser sur l'échantillon, le montage dispose d'une caméra optique au-dessus de l'objectif.

La lumière est ensuite absorbée par l'agent de contraste qui produit une onde ultrasonique par effet photoacoustique. Cette onde est détectée par un transducteur piézoélectrique focalisé au travers d'un gel pour échographie entre l'échantillon et la sonde. Le signal électrique obtenu est amplifié puis démodulé afin d'obtenir l'amplitude du signal PA à chaque longueur d'onde pour ce pixel.

Nous disposons de trois supports pour tester l'effet PA de nos composés : en solution entre lame et lamelle sur un morceau de papier (les fibres du papier permettent de faire la mise au point), dans des circuits de microfluidique simulant la microvascularisation (Figure IV-25) ou alors *in vivo* pour imager la

vascularisation de l'oreille d'une souris. Le circuit de microfluidique possède des canaux de 10, 20, 40, 80 et 160 μm de largeur et de 5 μm de hauteur.

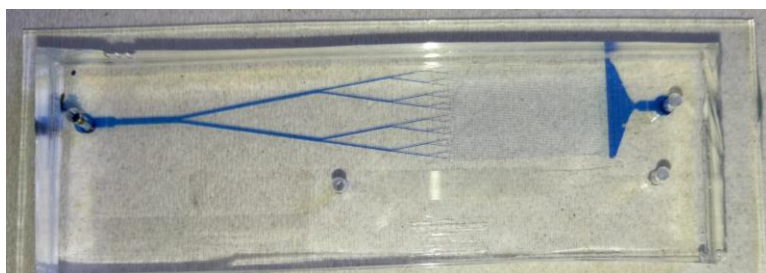


Figure IV-25. Circuit de microfluidique rempli avec **CPO2**.

2. Premiers essais

a) Solutions dans le chloroforme

Afin de déterminer la gamme d'absorbance visible par le microscope photoacoustique, nous avons mesuré le signal photoacoustique des colorants en solution dans le chloroforme à différentes concentrations. Cette expérience a été réalisée sur quatre chromophores : **PTT-TCF**, **PTT-DCI**, **TCPBn** et **CPO5** avec trois concentrations : 10 μM , 100 μM et 1 mM. Les absorptions de ces chromophores sont rappelées dans la Figure IV-26. Les trois premiers colorants ont été irradiés à 660 nm avec une puissance de 4,2 mW et CPO5 a été irradié à 808 nm avec une puissance de 1,5 mW, à 50 % de la puissance maximale des lasers.

Les circuits de microfluidique ne supportant pas les solvants organiques, nous avons dû utiliser des capillaires en verre d'environ 100 μm de diamètre afin de contenir les solutions de chloroforme. Cette solution n'est pas idéale car la forme cylindrique des capillaires crée des interférences et une image finale composée de stries au lieu d'un cylindre. De plus, il est difficile de se focaliser verticalement exactement au milieu du capillaire. Pour contourner ce problème, nous avons enregistré plusieurs images à différentes positions verticales dans le capillaire et nous avons moyenné les résultats sur la hauteur du capillaire.

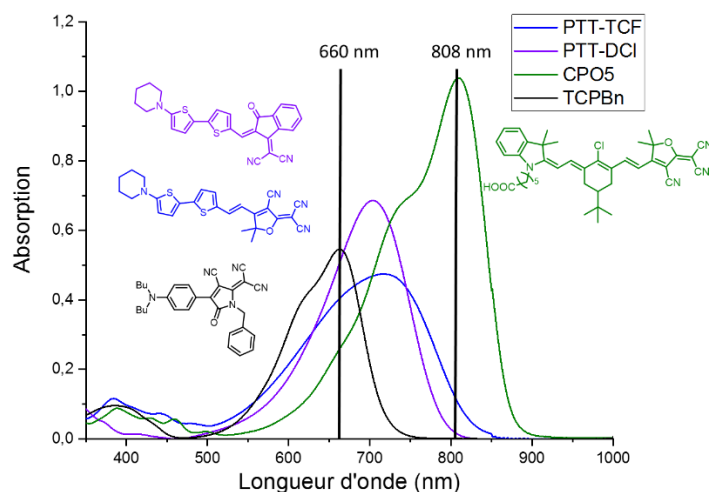


Figure IV-26. Absorption des chromophores dans le chloroforme à 10 μM . Les lignes noires représentent les longueurs d'onde des diodes lasers disponibles.

Malheureusement, les composés **PTT-TCF** et **PTT-DCI** ont montré un photoblanchiment rapide sous excitation laser à la concentration de 1 mM. En effet, en l'espace d'une minute d'irradiation, les portions éclairées des deux capillaires bleus sont devenues jaunes. Cela s'est traduit par une diminution rapide du signal photoacoustique.

Les deux autres chromophores **TCPBn** et **CPO5** se sont avérés beaucoup plus stables avec aucune dégradation visible, même à la plus basse concentration de 10 μM .

Pour ces deux colorants, le signal photoacoustique moyen en fonction de la concentration en colorant est donné dans la Figure IV-27 dans une échelle semi-log.

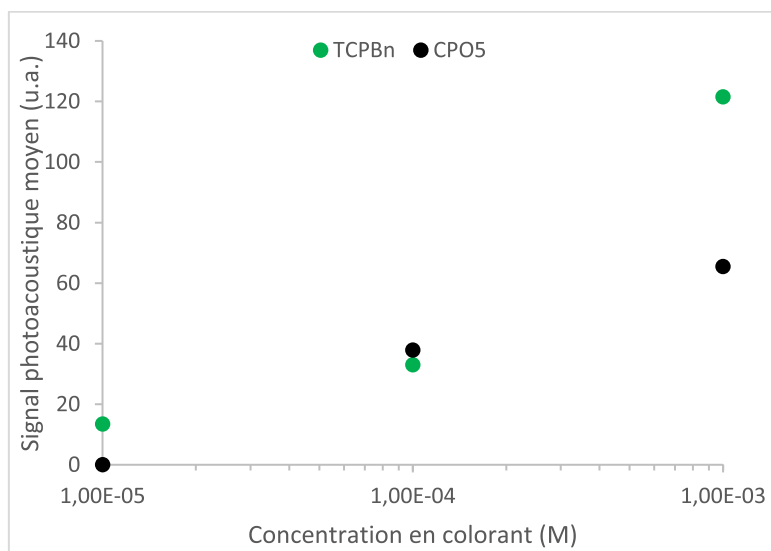


Figure IV-27. Variation du signal photoacoustique en fonction de la concentration en colorant.

A 10 μM , seul **TCPBn** est faiblement visible. Puis, à 100 μM , les deux colorants sont visibles avec des signaux moyens comparables. Enfin, l'augmentation de la concentration à 1 mM permet l'obtention d'une intensité appréciable, notamment pour **TCPBn**.

Dans ce cas, les ondes acoustiques n'ont qu'une couche de verre à traverser avant d'atteindre le gel à ultrason et le transducteur. Ainsi, la concentration de 1 mM (et donc des absorbances de 60 pour **TCPBn** et de 100 pour **CPO5**) pour obtenir des images de bonne qualité sont des limites basses. En effet, par la suite l'imagerie sera effectuée dans des milieux plus complexes et avec une plus grande distance à traverser avant d'atteindre le transducteur.

En première approche, **TCPBn** a l'air plus performant que **CPO5**, cependant il faut noter que le laser à 660 nm donne une intensité moyenne en sortie d'objectif presque trois fois plus élevée que le laser à 808 nm.

b) Bithiophènes et photodégradation

Afin d'identifier quelle partie des dérivés bithiophènes est responsable de la photodégradation observée, nous avons reproduit cette dégradation pour **PTT-TCF** en solution concentrée, dans un tube RMN, et en solution diluée, dans une cuvette. Pour cela, nous avons utilisé une lampe pour chambre noire, équipée d'un filtre rouge, capable d'exciter notre chromophore. La photodégradation du colorant est suivie par spectrométries UV-visible, de masse et RMN. Au bout de 20 heures d'irradiation, la solution diluée est devenue jaune. La solution concentrée du tube RMN a nécessité deux jours supplémentaires d'irradiation afin de dégrader la majorité de **PTT-TCF**.

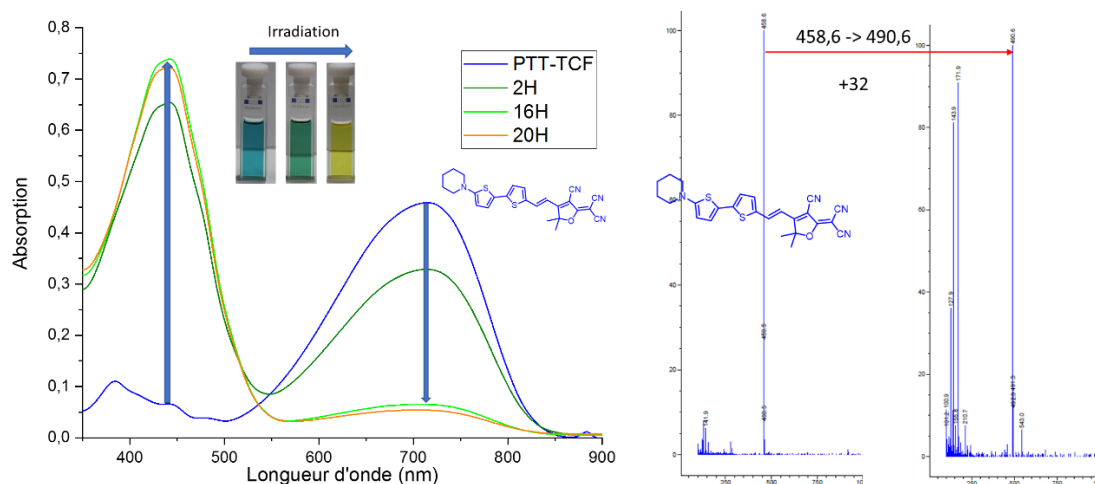


Figure IV-28. Gauche : absorption de **PTT-TCF** après différents temps d'irradiation.
Droite : spectre de masse de **PTT-TCF** et du produit après photodégradation.

Cette photodégradation se traduit par la diminution de la bande d'absorption à 710 nm et par l'apparition d'une bande d'absorption à 440 nm (Figure IV-28, gauche). La spectroscopie de masse nous donne une variation de masse de l'ion moléculaire de +32 (Figure IV-28, droite).

De plus, la RMN du proton nous indique une conservation du nombre de protons, le déblindage de la majorité des signaux ainsi qu'un dédoublement des deux signaux $-CH_2-$ en alpha de l'azote de la pipéridine (qui ne sont plus équivalents). De plus, la constante de couplage des protons aromatiques du thiophène côté pipéridine passe de 4,3 Hz à 9,9 Hz (signaux orange sur la Figure IV-29) alors que celle de l'autre thiophène reste à 4,4 Hz.

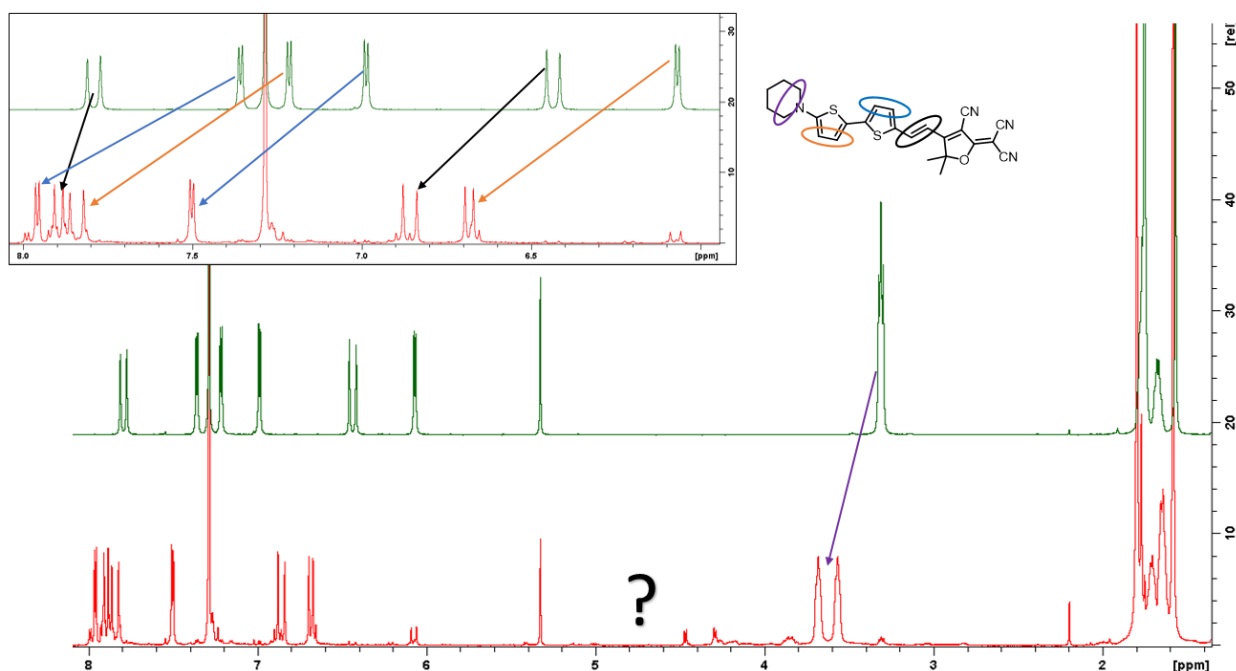


Figure IV-29. Spectre ^1H RMN de **PTT-TCF** (vert) et du produit après photodégradation (rouge) dans CDCl_3 . L'insert contient un zoom sur les protons aromatiques. Les flèches représentent l'évolution des signaux des protons au cours de la photodégradation.

Enfin, le spectre ^{13}C RMN nous confirme la présence des groupements nitriles de l'accepteur ainsi que la non-équivalence des deux carbones en alpha de l'azote dans la pipéridine. La photodégradation ne modifie pas non plus le nombre de carbones visibles.

Tout cela nous laisse penser que la photodégradation se fait par l'oxydation du soufre en sulfone dans le thiophène côté pipéridine. En effet, une augmentation de 32 dans la masse de la molécule correspond à l'ajout de deux atomes d'oxygène. Ainsi, le produit photo-oxydé supposé est représenté dans la Figure IV-30. Cependant, afin de s'assurer qu'il s'agit bien de ce produit, il nous faudrait effectuer la même expérience de photodégradation sans oxygène. Un spectre infrarouge pourrait nous permettre de vérifier la présence des liaisons $\text{S}=\text{O}$ de la sulfone vers 1140 et 1325 cm^{-1} .

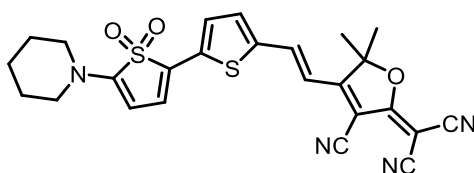


Figure IV-30. Produit photodégradé présumé.

La présence d'une sulfone acceptrice au milieu du système π coupe la conjugaison entre la pipéridine et le groupement **TCF**. Cette limitation du transfert de charge entraîne un décalage hypsochrome des propriétés optiques comme nous pouvons le constater dans la Figure IV-28. Li *et al.* ont synthétisé un chromophore avec un transfert de charge entre un groupement thiophène et le groupement **TCF** au travers d'une liaison double et ont mesuré une absorption à 433 nm dans le chloroforme, très proche de notre valeur de 440 nm .^[338]

Malheureusement, cette photodégradation empêche l'utilisation des chromophores **PTT-TCF** et **PTT-DCI** pour la photoacoustique. Nous n'avons pas vérifié la stabilité des autres chromophores de cette

série, ni de la série des monothiophènes, mais, puisque l'oxydation intervient sur le pont conjugué, nous pouvons raisonnablement supposer que tous les bithiophènes sont concernés par cette photodégradation en solution.

3. Concentration des agrégats

Cette première expérience d'imagerie photoacoustique nous a permis de tirer plusieurs conclusions. Les composés basés sur le pont bithiophène souffrent d'une photodégradation rapide par oxydation du pont conjugué. Nous les avons donc abandonnés pour le reste de notre étude. Les autres composés ne se dégradent pas à vue d'œil, mais nécessitent une concentration élevée afin d'obtenir les premières images photoacoustiques. Or, la synthèse des agrégats ou des nanoparticules de silice tels que nous les avons présentés dans le chapitre précédent donne des absorbances autour de 1 pour les agrégats (0,25 μmol de colorant) et de 4 pour les NPs F127-SiO₂ (0,55 μmol de colorant). Pour ces composés, à quantité de matière égale, l'absorbance en agrégats est plus faible que l'absorbance en NPs F127-SiO₂. Cela provient d'une agrégation H, notamment visible sur le spectre des agrégats de **CPO1** (Figure IV-31, courbe rouge) où on observe une inversion des intensités des deux pics d'absorption.

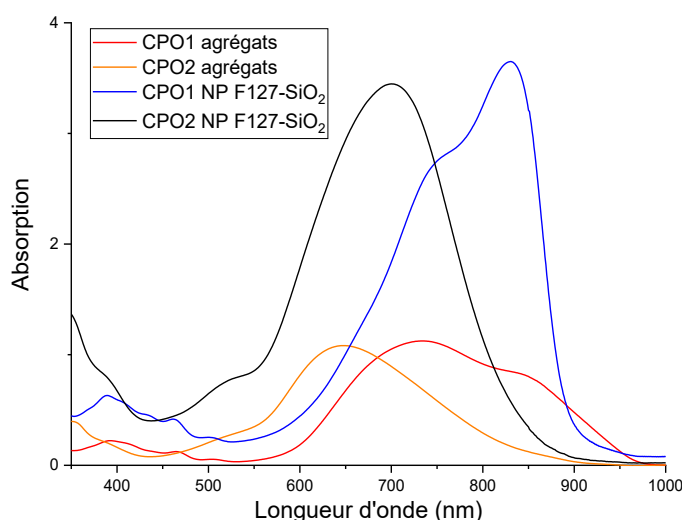


Figure IV-31. Absorption des nanoagrégats et des nanoparticules de silice de **CPO1** et de **CPO2** avant concentration.

Il nous faut donc concentrer grandement nos nanoparticules afin d'atteindre des absorbances supérieures à 100. Nous avons choisi de nous focaliser sur les agrégats des composés **CPO1** et **CPO2**.

En effet, les NPs SiO₂ sont difficilement concentrables : une augmentation de la quantité de colorant pendant la synthèse donne lieu à une agrégation H au sein des NPs (visible par l'augmentation du ratio d'absorption entre l'épaulement et le pic principal) et une évaporation de l'eau par un évaporateur rotatif donne rapidement un concentré très visqueux à cause de la forte quantité de pluronic dans cette synthèse.

Pour la concentration des agrégats, nous avons le choix entre augmenter la concentration initiale en colorant et augmenter toutes les quantités équitablement puis évaporer la majorité de l'eau à l'aide d'un évaporateur rotatif. Nous avons choisi la deuxième méthode.

Ainsi, les différentes solutions de nanoagrégats (solutions **A**, **B**, **C** et **D**) des deux chromophores CPO1 et CPO2 sont préparées avec les mêmes proportions que la synthèse des nanoagrégats du Chapitre III.C. L'acétone, ainsi que la majorité de l'eau, sont ensuite évaporées. Le Tableau IV-5 résume les quantités de chromophore, d'acétone, de pluronic F127 et d'eau utilisées pour la synthèse des différentes solutions de nanoagrégats, ainsi que le volume et la concentration massique en colorant après évaporation. Les concentrations finales données dans ce tableau sont calculées à partir de la masse introduite et du volume restant après évaporation (déterminé par pesée). Ces concentrations sont surestimées car elles ne prennent pas en compte la perte en chromophore pendant l'évaporation par dépôt sur les parois.

	CPO1-A	CPO2-A	CPO1-B	CPO2-B	CPO1-C	CPO2-C	CPO1-D	CPO2-D
m_{colorant} (mg)	0,51	0,55	3,2	3,5	7,7	8,4	10	10
m_{F127} (mg)	1	1	3,5	3,5	7,5	7,5	10	10
V_{total acétone} (mL)	2	2	10,2	10,2	20	20	20	20
V_{eau} (mL)	20	20	100	100	200	200	200	200
V_{eau trempe} (mL)	20	20	100	100	200	200	200	200
V_{concentré} (mL)	0,96	1,1	1,1	1,6	0,58	0,4	0,43	0,7
C_{colorant finale} (mg/mL)	0,53	0,5	2,9	2,2	13,3	21	23,3	14,3

Tableau IV-5. Volumes et masses introduits de chaque constituant et concentration finale en colorant.

La première limite de cette synthèse est sa reproductibilité. En effet, il est impossible de concentrer 400 mL d'eau en exactement 0,5 mL de manière consistante, et donc de déterminer à l'avance la concentration finale qu'aura la solution.

De plus, avec ces fortes concentrations, nous atteignons les limites de la mesure des tailles hydrodynamiques par DLS et de l'absorption. En particulier pour la DLS, notre appareil utilise un laser à 633 nm, directement dans la gamme d'absorption de nos chromophores. Cette absorption du laser peut en partie être limitée par l'utilisation du mode « backscattering » qui utilise la diffusion vers l'arrière, à 173°. Mais, même en utilisant la diffusion arrière, avec l'augmentation de la concentration, les mesures étaient de plus en plus longues à effectuer. Finalement, nous avons décidé de diluer une portion de nos solutions par 10 puis par 50 afin de diminuer l'absorption du laser. Ainsi, il est important de noter que les mesures de taille par DLS peuvent ne pas être représentatives de la solution concentrée, puisque la dilution peut séparer des assemblages d'agrégats. Cette dilution, combinée à une cuvette d'un millimètre d'épaisseur, nous permet de pouvoir mesurer les spectres d'absorption sans saturation. Les spectres d'absorption donnés ci-dessous sont recalculés pour la solution réelle avec une cuvette classique de 1 cm.

Les spectres d'absorption, ainsi que les spectres d'absorption normalisés des différentes solutions concentrées sont représentés dans la Figure IV-32. En fonction des quantités engagées dans la synthèse et surtout du volume final de la solution, l'absorbance au maximum d'absorption des solutions après évaporation varie entre 33 et 856 pour **CPO1** et entre 27 et 1112 pour **CPO2**.

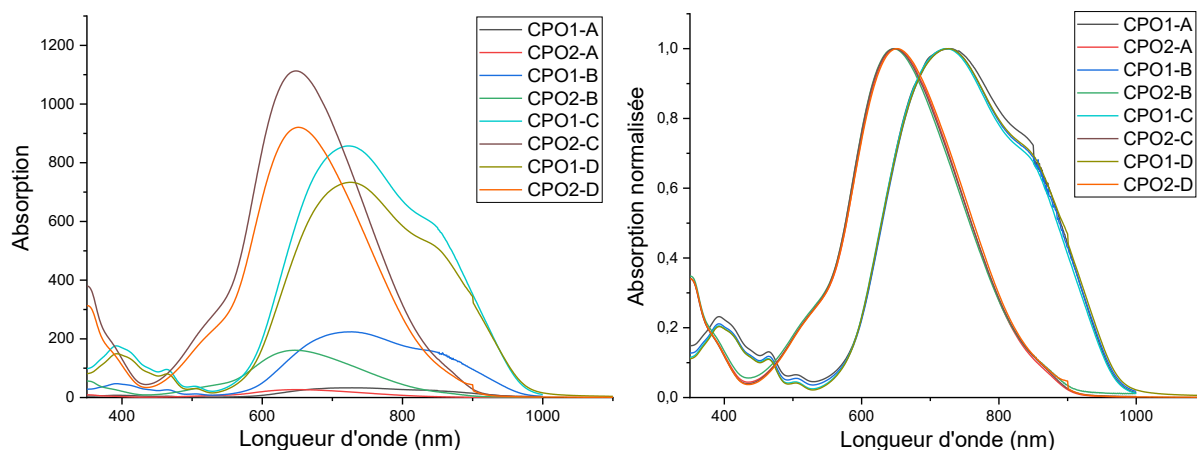


Figure IV-32. Spectres d'absorption (gauche) et spectres d'absorption normalisés (droite) des agrégats de CPO1 et CPO2 à différentes concentrations.

Lors de l'agrégation, **CPO1** (respectivement **CPO2**) présente un décalage hypsochrome important (léger) avec un maximum à 725 nm (650 nm). Les agrégats de **CPO1** montrent une agrégation H qui décale l'absorption entre les deux diodes laser à 660 nm et à 808 nm. Le spectre d'absorption large devrait permettre à ces agrégats d'absorber fortement aux longueurs d'onde des deux diodes lasers. En effet, l'absorption des agrégats de **CPO1** est de 78 % de l'absorption maximale à 660 nm et de 77 % à 808 nm. A l'inverse, le maximum d'absorption de **CPO2** est très proche de la diode laser à 660 nm.

Avec la concentration, l'allure du spectre reste globalement identique dans le cas de **CPO1** (la légère variation à 850 nm provient du changement entre le réseau visible et le réseau infrarouge). Dans le cas de **CPO2**, les spectres d'absorption normalisés des différentes synthèses sont parfaitement superposables.

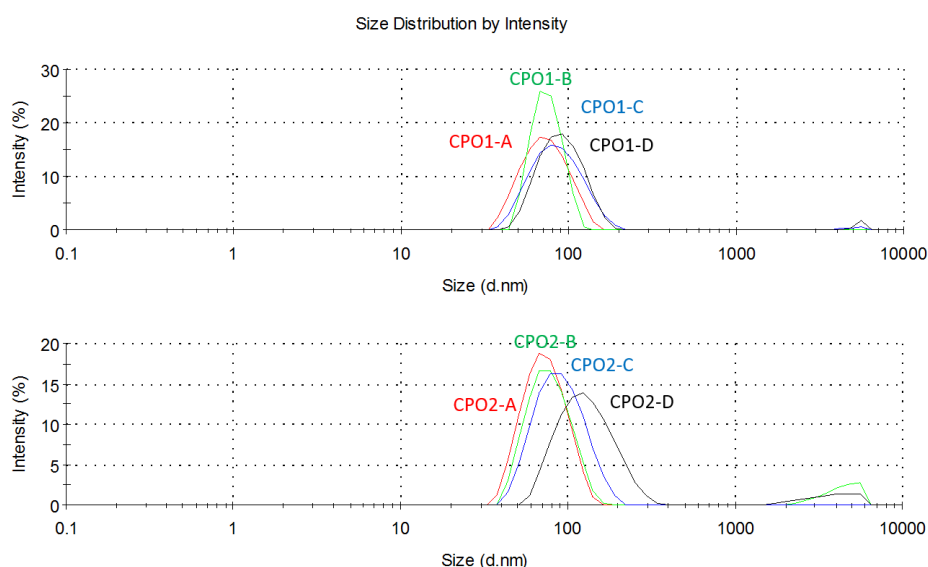


Figure IV-33. Diamètres hydrodynamiques des diverses solutions d'agrégats de **CPO1** (haut) et de **CPO2** (bas).

Les diamètres hydrodynamiques des solutions d'agrégats ont été mesurés par DLS et sont représentés dans la Figure IV-33. La concentration des agrégats entraîne une légère augmentation des tailles. Toutes les tailles restent inférieures à 100 nm, sauf **CPO2-D** à 120 nm. Les tailles plus importantes

dans la solution **CPO2-D** est probablement liée à une concentration plus rapide que pour les autres solutions.

4. Imagerie PA de circuits de microfluidique

Pour cette partie, l'impression diminue le contraste des images PA. Il est donc conseillé de se rapporter aux images de la version électronique.

Maintenant que nous avons détaillé les conditions de synthèse, les propriétés optiques et les tailles des solutions concentrées en agrégats de **CPO1** et **CPO2**, nous pouvons présenter les résultats obtenus par imagerie photoacoustique des circuits de microfluidique avec les solutions **A** à **C**. Les images contenant le colorant **CPO1** ont été colorées en vert et les images de **CPO2** en cyan.

- **CPO1-A et CPO2-A**

Les solutions d'agrégats les moins concentrées, **CPO1-A** et **CPO2-A**, aux absorbances respectivement de 33 et 27 n'ont pas pu être observées dans le circuit de microfluidique, même avec une puissance laser maximale.

- **CPO1-B et CPO2-B**

Ces solutions d'agrégats aux absorbances de 223 pour **CPO1-B** et de 160 pour **CPO2-B** nous ont permis d'atteindre la limite basse de détection avec les lasers à 100 % de puissance.

La Figure IV-34 représente les images PA à 660 nm (A) et à 808 nm (B) de canaux du circuit de microfluidique contenant la solution **CPO1-B** ainsi que les profils selon les lignes jaunes (C) et une image en transmission des canaux vue par la caméra optique (D).

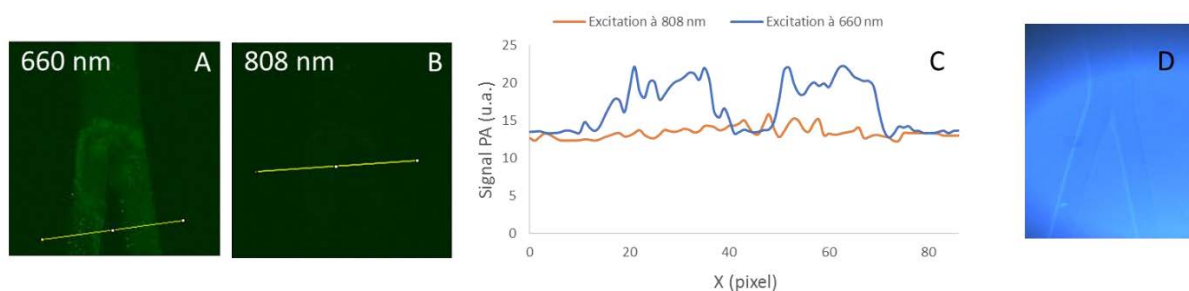


Figure IV-34. Imagerie PA d'un circuit de microfluidique contenant **CPO1-B**.

A : image PA moyennée de 52 acquisitions d'une bifurcation 80 μm - 160 μm sous excitation à 660 nm (puissance : 100 %).

B : image PA moyennée de 52 acquisitions d'une bifurcation 80 μm - 160 μm sous excitation à 808 nm (puissance : 100 %).

C : profils selon les lignes jaunes des images A et B.

D : image de la bifurcation 80 μm - 160 μm par la caméra optique.

Avec ce PAM, le chromophore **CPO1** est beaucoup plus visible à 660 nm (Figure IV-34, A) qu'à 808 nm (Figure IV-34, B) et ce malgré des absorbances similaires à ces deux longueurs d'onde. Cela provient de plusieurs différences expérimentales :

- La puissance maximale en sortie d'objectif est 2,4 fois plus grande avec la diode laser à 660 nm qu'avec celle à 808 nm.
- Les positions des focus optiques sont légèrement différentes. Le maximum de signal à 660 nm ne correspond pas au maximum à 808 nm.

Ainsi, il est possible de distinguer clairement les canaux du circuit à 660 nm alors qu'ils sont à peine distingués à 808 nm. Nous avons tracé les profils du signal PA le long des lignes jaunes afin de mesurer le ratio signal/bruit. A cette concentration de **CPO1**, ce ratio reste très modéré à 1,6 à 660 nm et 1,1 à 808 nm.

L'image PA du circuit contenant **CPO2-B** sous excitation à 660 nm ainsi que le profil selon la ligne jaune sont représentés dans la Figure IV-35.

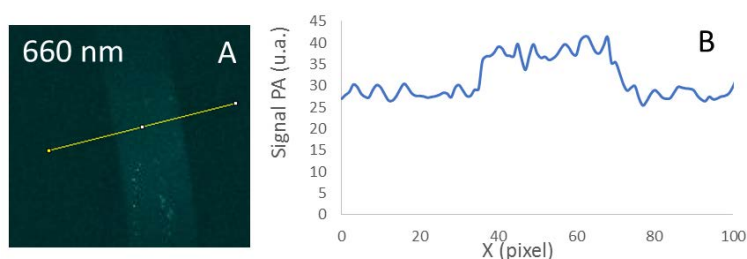


Figure IV-35. Imagerie PA d'un circuit de microfluidique contenant **CPO2-B**.
A : image PA moyennée de 38 acquisitions d'un canal de 160 μm sous excitation à 660 nm (puissance : 100 %).
B : profil selon la ligne jaune de l'image A.

Pour ce chromophore, le ratio signal/bruit est de 1,3. Cette valeur n'est pas directement comparable avec celle de **CPO1** à cause de la variation des absorbances des solutions à 600 nm ainsi que du nombre d'images moyennées.

• **CPO1-C et CPO2-C**

La forte concentration de ces solutions nous a permis d'améliorer grandement les ratios signal/bruit par rapport aux solutions précédentes. En effet, l'absorbance à 660 nm de ces solutions est respectivement de 670 pour **CPO1-C** et de 1100 pour **CPO2-C**. Le signal à 808 nm est resté peu intense, possiblement à cause d'un problème d'alignement du laser à 808 nm ce jour. Ainsi, toutes les images ont été acquises par excitation à 660 nm.

La Figure IV-36 montre quelques-unes des images moyennées obtenues avec **CPO1-C** à 80 % de puissance laser à 660 nm sur des canaux de différentes largeurs.

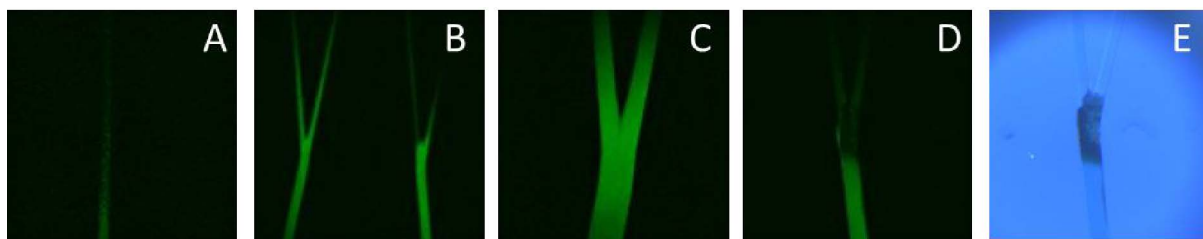


Figure IV-36. Imagerie PA d'un circuit de microfluidique contenant **CPO1-C**.

A : image PA moyennée de 28 acquisitions d'un canal de 10 μm sous excitation à 660 nm (puissance : 80 %).
 B : image PA moyennée de 44 acquisitions d'une bifurcation 10 μm - 20 μm sous excitation à 660 nm (puissance : 80 %).
 C : image PA moyennée de 45 acquisitions d'une bifurcation 40 μm - 80 μm sous excitation à 660 nm (puissance : 80 %).
 D : image PA moyennée de 155 acquisitions d'une bifurcation 20 μm - 40 μm sous excitation à 660 nm (puissance : 80 %).
 E : image de la bifurcation 20 μm - 40 μm par la caméra optique.

Ces images moyennées permettent d'observer très clairement le circuit microfluidique. Elles nous permettent aussi de repérer des canaux bouchés, comme c'est le cas des canaux de 20 μm de l'image D. Cela est confirmé dans l'image de la même bifurcation prise avec la caméra optique (image E), dans laquelle un résidu opaque bouche la bifurcation. Il est possible que ce « caillot » soit formé par les nanoparticules de **CPO1** à cause de leur concentration trop élevée.

Afin de comparer le signal photoacoustique produit par les solutions **CPO1-C** et **CPO2-C**, nous avons tracé le profil PA au travers de canaux de 80 μm . Les images PA de la Figure IV-37 sont les moyennes de 45 acquisitions auxquelles nous avons appliqué l'algorithme de soustraction de bruit de fond du logiciel ImageJ (rolling ball radius : 20 pixels).

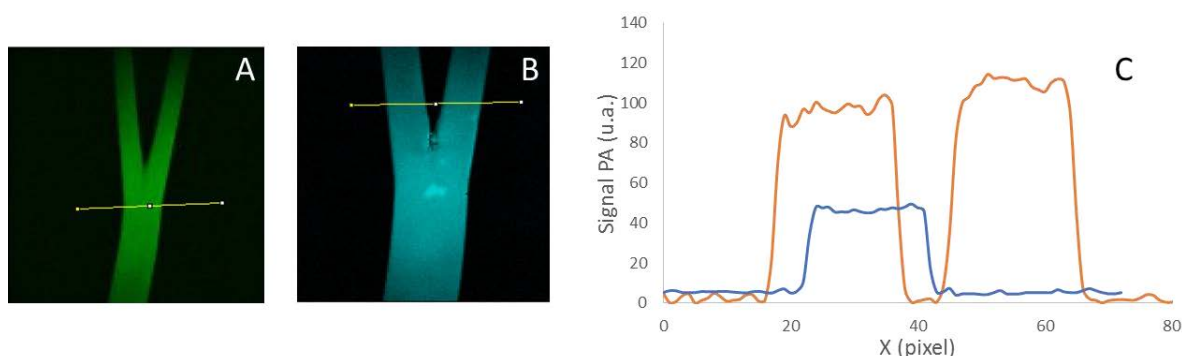


Figure IV-37. Imagerie PA de circuits de microfluidique contenant **CPO1-C** et **CPO2-C**.

A : image PA moyennée de 45 acquisitions d'une bifurcation 40 μm - 80 μm contenant **CPO1-C** sous excitation à 660 nm (puissance : 80 %).
 B : image PA moyennée de 45 acquisitions d'une bifurcation 80 μm - 160 μm contenant **CPO2-C** sous excitation à 660 nm (puissance : 80 %).
 C : profils selon les lignes jaunes des images A (courbe bleue) et B (orange).

Les profils le long des lignes jaunes sont donnés dans la Figure IV-37, C. Le signal obtenu avec **CPO2-C** est environ 2,2 fois plus intense que celui de **CPO1-C**, ce qui est proche du facteur 1,7 entre les absorbances des deux solutions à 660 nm.

Les images obtenues avec la solution **CPO2-C** présentent des points brillants qui semblent être des assemblages d'agrégats, voire des cristaux de **CPO2**. La Figure IV-38 présente les images photoacoustiques et les images avec la caméra optique de deux bifurcations (A et B : 40-80 μm , C et D : 80-160 μm) ainsi que le profil le long de la ligne jaune de l'image C.

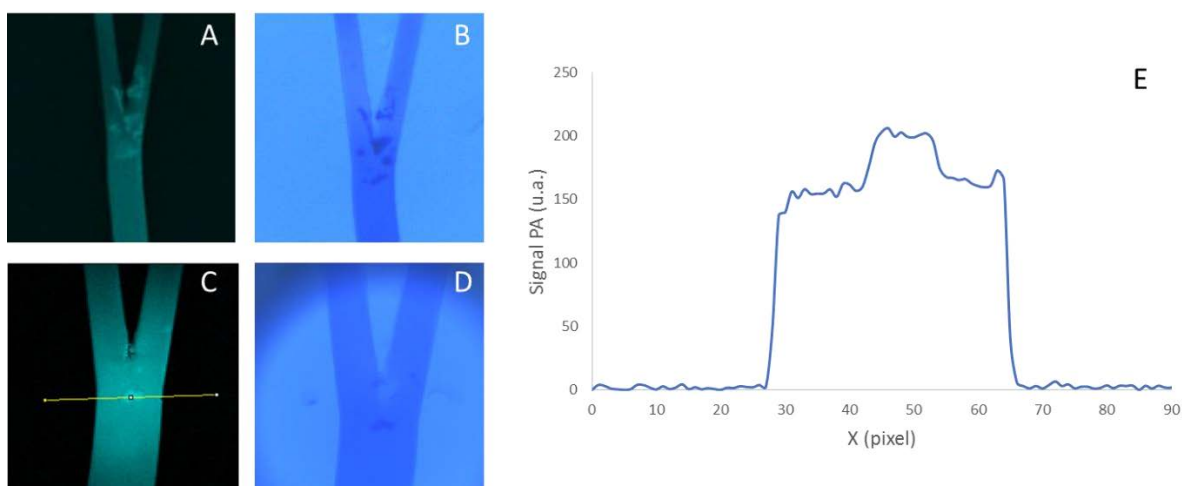


Figure IV-38. Imagerie PA d'un circuit de microfluidique contenant **CPO2-C**.

A : image PA moyennée de 116 acquisitions d'une bifurcation 20 μm - 40 μm sous excitation à 660 nm (puissance : 50 %).

B : image de la bifurcation 20 μm - 40 μm par la caméra optique.

C : image PA moyennée de 48 acquisitions d'une bifurcation 80 μm - 160 μm sous excitation à 660 nm (puissance : 80 %).

D : image de la bifurcation 80 μm - 160 μm par la caméra optique.

E : profil selon la ligne jaune de l'image C.

En comparant les images PA (A et C) aux images de la caméra optique (B et D), il est possible de voir que les zones brillantes en PA correspondent bien avec les taches sombres dans les images optiques. De plus, le profil PA de l'image C nous montre une augmentation de 33 % du signal dans la zone brillante par rapport au reste du canal.

Afin d'étudier la formation de ces agrégats volumineux, nous avons observé les nanoagrégats des solutions **CPO1-C** et **CPO2-C** par MEB. Cette observation a été faite 14 jours après l'imagerie PA sur les mêmes solutions, ainsi que sur une solution d'agrégats de **CPO2** sans concentration et préparée la veille. La Figure IV-39 présente une image par MEB des nanoagrégats de la solution **CPO1-C**, deux semaines après synthèse. Bien que les agrégats soient enveloppés dans une couche de pluronic qui diminue fortement le contraste, les agrégats semblent bien dispersés avec des diamètres d'environ 30 à 50 nm.

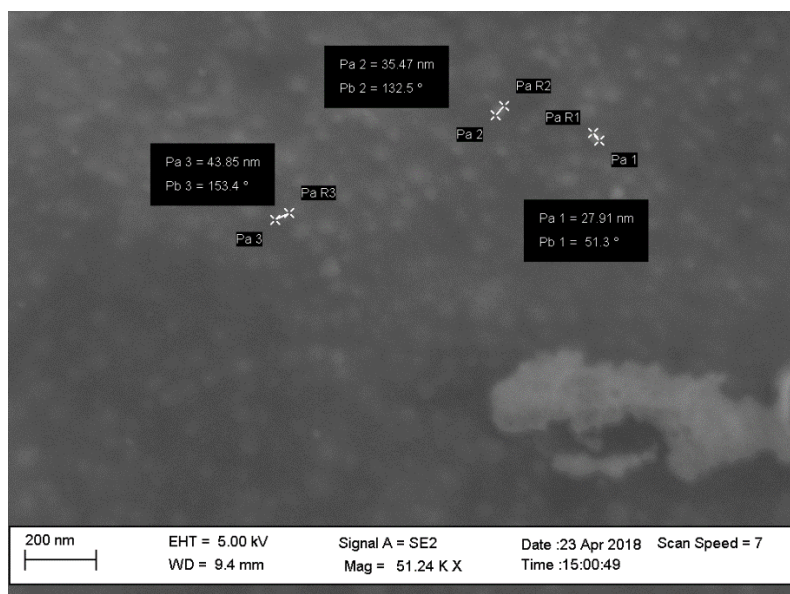


Figure IV-39. Imagerie MEB des nanoagrégats de la solution **CPO1-C** deux semaines après synthèse.

A l'inverse, la taille des agrégats de **CPO2** augmente au cours du temps. Ainsi, les agrégats fraîchement préparés mesurent entre 65 et 90 nm de diamètre (Figure IV-40, gauche), alors que pour les agrégats synthétisés deux semaines auparavant, il est possible d'observer des agrégats avec des diamètres pouvant atteindre 100 à 180 nm (Figure IV-40, droite).

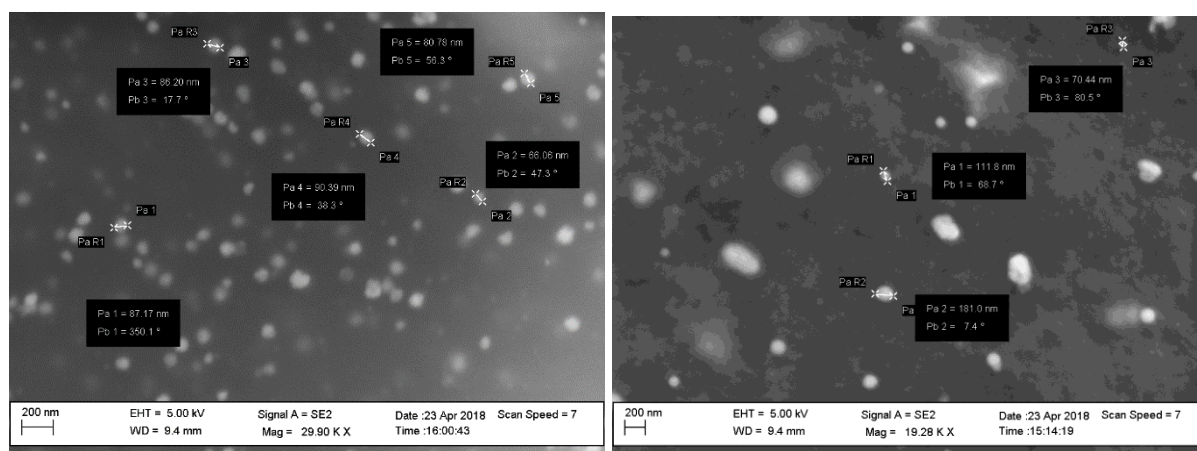


Figure IV-40. Imagerie MEB des nanoagrégats de la solution **CPO2-C** le lendemain de la synthèse (gauche) et deux semaines après synthèse (droite).

En résumé, l'augmentation de la concentration des agrégats nous a permis d'obtenir des images PA des circuits de microfluidique. Il a cependant fallu augmenter l'absorbance au-delà de 150 pour commencer à discerner les circuits. Puis, avec les solutions plus concentrées **CPO1-C** et **CPO2-C**, il a été possible d'accroître grandement ratio signal/bruit.

Il faut cependant noter que les concentrations des solutions **CPO1-C** et **CPO2-C** sont excessivement élevées, ce qui peut poser des problèmes pour l'application *in vivo*. En effet, en microfluidique, ces fortes concentrations conduisent à l'obturation des plus petits canaux ainsi qu'à la création d'agglomérats d'agrégats dans le cas de **CPO2**. L'imagerie microscopique des agrégats nous a permis de confirmer la taille plus importante des agrégats de **CPO2** par rapport à **CPO1**, notamment deux semaines après synthèse.

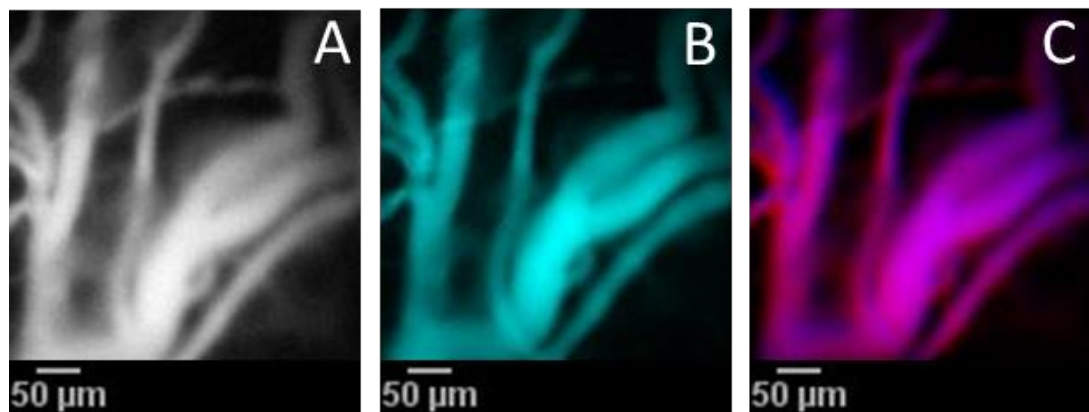
5. Imagerie PA *in vivo*

a) Des images de la vascularisation...

Les solutions **CPO1-D** et **CPO2-D** nous ont permis d'effectuer l'angiographie PA d'une oreille de souris. Pour ces deux solutions, nous avons dissous des cristaux de chlorure de sodium après évaporation afin d'obtenir des solutions à 0,9 % en NaCl. Ces solutions ont des absorbances respectives de 680 et 915 à 660 nm.

La Figure IV-41 présente les images moyennées obtenues par excitation de l'hémoglobine (image A) ainsi que par excitation de **CPO2** à 660 nm (image B). L'image C correspond à la fusion colorée des deux images A et B. Dans cette image, le signal de l'hémoglobine est coloré en rouge et celui de **CPO2** en bleu et la somme est de couleur magenta. La co-localisation de **CPO2** et de l'hémoglobine est excellente, preuve

que nos agrégats circulent bien dans les vaisseaux sanguins. Les quelques différences, notamment visibles sur le bord gauche de l'image C, proviennent d'un focus optique légèrement décalé entre le laser à 415 nm et celui à 660 nm.



*Figure IV-41. Imagerie PA de la vascularisation d'une oreille de souris après injection de 0,1 mL de **CPO2-D**.
A : imagerie PA par l'hémoglobine sous excitation à 415 nm (puissance : 30 %), moyenne de 100 acquisitions.
B : imagerie PA par **CPO2** sous excitation à 660 nm (puissance : 100 %), moyenne de 100 acquisitions.
C : image jointe de l'image A (rouge) et de l'image B (bleu).
Taille des images : 400 µm x 400 µm.*

Le colorant **CPO2** a pu être observé pendant toute la durée de l'expérience, soit plus de 40 minutes.

Dans ces images, le contraste du signal photoacoustique est meilleur avec notre colorant qu'avec l'hémoglobine. Il faut cependant noter que la puissance laser à 660 nm (7 mW) est trois fois plus importante que celle à 415 nm (2,3 mW). Dans les deux images, le contraste est diminué par une oscillation du diamètre des vaisseaux sanguins avec un cycle de dilatation/rétraction. Cette oscillation peut être observée dans le signal PA moyen qui est tracé en fonction du temps dans la Figure IV-42 pour les deux canaux d'acquisition. En première hypothèse, cette oscillation de signal pourrait correspondre aux battements cardiaques ou aux mouvements de la souris pendant sa respiration. Cependant, le temps d'acquisition d'une image est de 2,7 secondes, beaucoup trop lent pour observer la fréquence de battement cardiaque ou de respiration d'une souris même endormie. De plus, l'oscillation est homogène sur toute l'image avec un maximum toutes les 12 secondes. Il est plus probable que cette oscillation provienne d'une résonance entre la fréquence d'acquisition de l'image et celle de battement cardiaque ou de respiration de la souris.

Curieusement, une augmentation du signal moyen au cours du temps est observée pour l'hémoglobine ainsi bien que pour **CPO2**. Une possible explication est l'élévation de la température qui accroît la réponse PA des tissus.

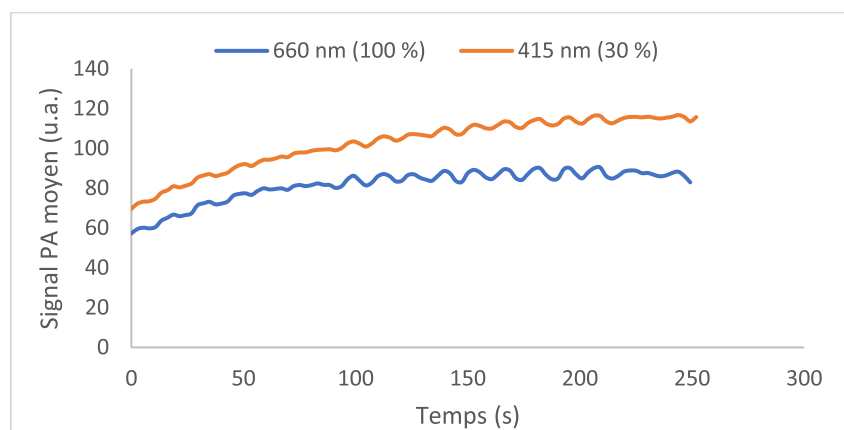


Figure IV-42. Variation du signal PA moyen des images obtenues par excitation à 415 nm (courbe orange), et à 660 nm (bleue) avec la solution **CPO2-D**.

Par la suite, nous avons étudié la réponse PA en fonction de la puissance du laser à 660 nm. La Figure IV-43 présente les images moyennées pour 100 % (image A, 7 mW), 50 % (image B, 4,2 mW) et 30 % (image C, 2,7 mW) de puissance laser, ainsi que l'image moyennée pour 30 % de puissance laser avec une sensibilité du détecteur synchrone augmentée (image D). Nous avons aussi tracé le profil le long des lignes jaunes pour chaque image.

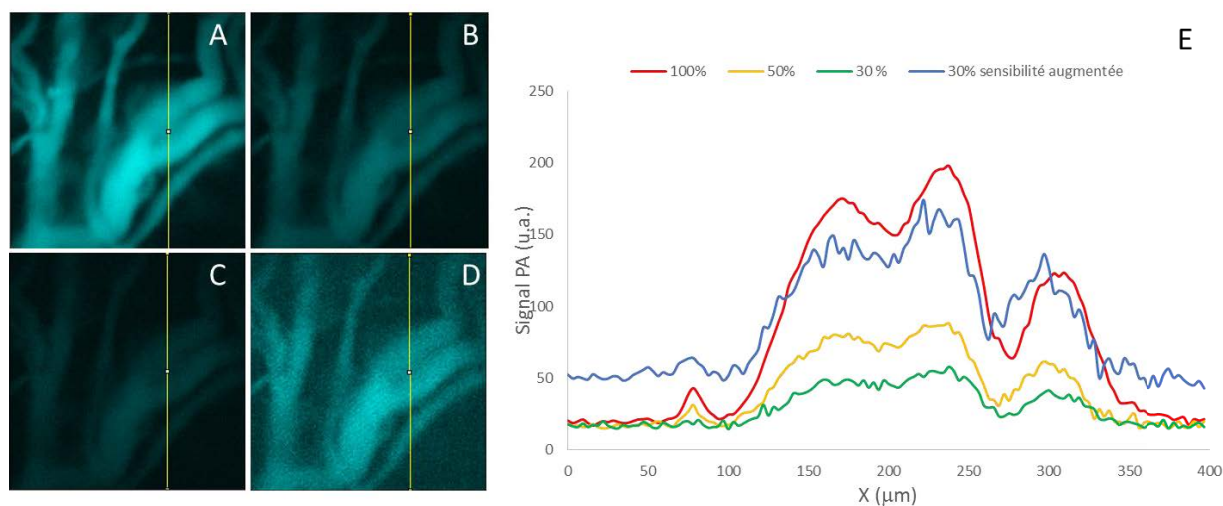


Figure IV-43. Imagerie PA en fonction de la puissance laser.

A : imagerie PA par **CPO2** sous excitation à 660 nm (puissance : 100 %), moyenne de 16 acquisitions.

B : imagerie PA par **CPO2** sous excitation à 660 nm (puissance : 50 %), moyenne de 16 acquisitions.

C : imagerie PA par **CPO2** sous excitation à 660 nm (puissance : 30 %), moyenne de 16 acquisitions.

D : imagerie PA par **CPO2** sous excitation à 660 nm (puissance : 30 %, sensibilité du détecteur augmentée), moyenne de 16 acquisitions. Pas de correction de bruit de fond.

E : profils selon les lignes jaunes des images A, B, C et D.

Les vaisseaux sanguins principaux peuvent être distingués même à 30 % de puissance laser. Cependant, les vaisseaux secondaires ($X = 75 \mu\text{m}$ sur le profil) disparaissent entre 50 % et 30 % de puissance laser. L'augmentation de la sensibilité du détecteur permet de distinguer de nouveau les vaisseaux secondaires, au prix d'une augmentation du bruit de l'image. Sur l'image D, aucune correction de bruit de fond n'a été appliquée, ce qui explique le signal PA élevé en dehors des vaisseaux sanguins.

Similairement, nous avons effectué l'imagerie PA de la vascularisation d'une oreille de souris avec le composé **CPO1**. Pour ce chromophore, nous avons dilué la solution **CPO1-D** aux 2/3 (absorbance 450 à

660 nm) et nous en avons injecté 0,2 mL. Cela correspond à la quantité de nanoagrégats pour obtenir une absorbance de 900 (comme **CPO2-D** ci-dessus), mais en deux fois plus dilués.

Le chromophore a d'abord été excité à 660 nm. Les images additionnées de 517 acquisitions sont représentées dans la Figure IV-44, ainsi que les profils le long des lignes jaunes.

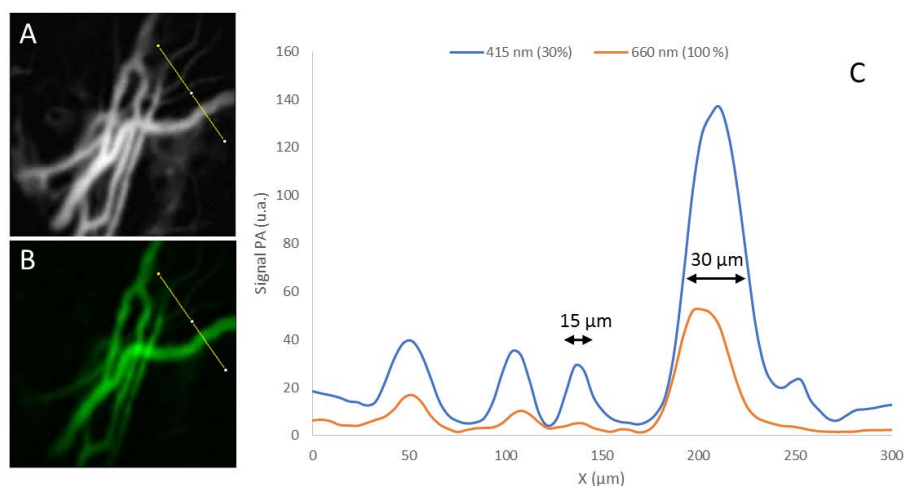


Figure IV-44. Imagerie PA de la vascularisation d'une oreille de souris après injection de 0,2 mL de **CPO1-D** 2/3.

A : imagerie PA par l'hémoglobine sous excitation à 415 nm (puissance : 30 %), somme de 517 acquisitions.

B : imagerie PA par **CPO1** sous excitation à 660 nm (puissance : 100 %), somme de 517 acquisitions.

C : profils selon les lignes jaunes des images A et B.

Taille des images : 600 μm x 600 μm .

Encore une fois, le chromophore possède une bonne colocalisation avec l'hémoglobine. Un léger décalage de quelques micromètres provient de la légère différence d'alignement entre les deux lasers. Le signal obtenu avec **CPO1** semble plus faible que celui avec **CPO2** si on considère l'hémoglobine comme référence. Néanmoins, **CPO1** permet de visualiser le vaisseau de 30 μm de diamètre au premier plan avec un bon ratio signal/bruit. Les petits vaisseaux en arrière-plan sont plus difficiles à visualiser à 660 nm.

Nous avons aussi essayé d'utiliser la diode laser à 808 nm. La Figure IV-45 présente les images additionnées du signal de l'hémoglobine à 415 nm ainsi que du signal de **CPO1** à 808 nm. Cette image est beaucoup plus bruitée, malgré l'absorption quasiment identique des nanoagrégats de **CPO1** à 660 nm et à 808 nm. Cela s'explique en partie par la puissance plus faible du laser 808 nm en sortie d'objectif (3 mW à 100 % de puissance) ainsi que par un focus optique très décalé par rapport au laser 415 nm.

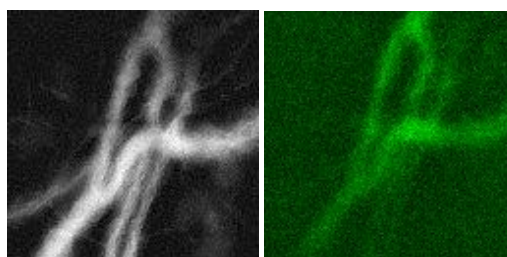


Figure IV-45. Imagerie PA de la vascularisation d'une oreille de souris après injection de 0,2 mL de **CPO1-D** 2/3.

A : imagerie PA par l'hémoglobine sous excitation à 415 nm (puissance : 30 %), somme de 85 acquisitions.

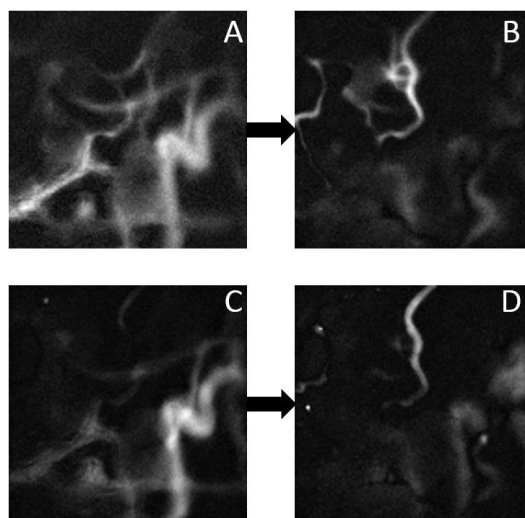
B : imagerie PA par **CPO1** sous excitation à 808 nm (puissance : 100 %), somme de 85 acquisitions.

Taille des images : 400 μm x 400 μm .

En conclusion, nous avons réussi à obtenir des images PA de la vascularisation d'une oreille de souris par excitation à 660 nm des chromophores **CPO1** et **CPO2**. Les agrégats des deux colorants ont permis la visualisation des vaisseaux sanguins pendant plus de 40 minutes. Cependant, dans certaines régions, nous avons observé que la forte concentration en agrégats entraîne une redistribution des globules rouges comme nous allons le présenter par la suite.

b) Au prix d'un impact sur la vascularisation

Bien que les souris aient survécu pendant la durée de l'expérience, nous avons observé un impact des agrégats sur la vascularisation avec notamment la disparition du signal de certains vaisseaux sanguins simultanément à l'apparition de signal dans d'autres vaisseaux. Ainsi, la Figure IV-46 présente l'évolution du signal photoacoustique au cours du temps après l'injection de la solution **CPO2-D**. L'évolution du signal de l'hémoglobine (images A et B) montre un changement radical du flux sanguin. En effet, en l'espace de 2 minutes après injection, l'apparition d'un vaisseau est observée dans la région centre-haut des images A et B, puis en l'espace des deux prochaines minutes l'intensité PA dans les vaisseaux initiaux diminue progressivement. Le signal de **CPO2** (images C et D) évolue de manière similaire pendant les six minutes d'acquisition. Ainsi, les agrégats circulent avec les globules rouges, mais provoquent lentement une obstruction de certains vaisseaux et une redistribution de la circulation sanguine locale vers des vaisseaux peu utilisés.



*Figure IV-46. Imagerie PA de la vascularisation d'une oreille de souris après injection de 0,1 mL de **CPO2-D**.
A et B : imagerie PA par l'hémoglobine sous excitation à 415 nm (puissance : 30 %), somme de 50 acquisitions avant l'injection de **CPO2** (A) et commençant 405 secondes après l'injection de **CPO2** (B).
C et D : imagerie PA par **CPO2** sous excitation à 660 nm (puissance : 100 %), somme de 50 acquisitions juste après l'injection de **CPO2** (C) et commençant 405 secondes après l'injection de **CPO2** (D).
Taille des images : 400 μ m x 400 μ m.*

Ce résultat est confirmé avec **CPO1** comme le montre la Figure IV-47. La comparaison entre le signal PA de l'hémoglobine juste avant (A) et juste après (B) l'injection de **CPO1** montre la disparition d'un vaisseau (en rouge sur l'image fusionnée C) et l'augmentation du signal dans d'autres vaisseaux (en vert sur C). Le diamètre du vaisseau en rouge (ne contenant plus d'hémoglobine) mesure approximativement 10 μ m. La présence d'agrégats de **CPO1** dans ce vaisseau est confirmée dans les images photoacoustiques

D (somme entre 80 et 188 secondes après injection) et E (somme entre 210 et 318 secondes après injection). De plus, l'image fusionnée F montre l'apparition de trois endroits où les agrégats de **CPO1** se concentrent au cours du temps (mis en évidence par des cercles rouges).

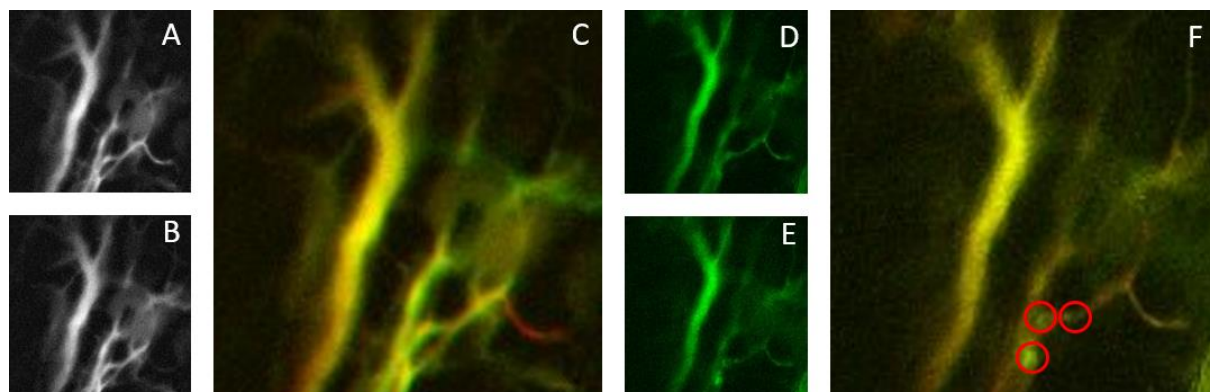


Figure IV-47. Imagerie PA de la vascularisation d'une oreille de souris après injection de 0,2 mL de **CPO1-D 2/3**.
A et B : imagerie PA par l'hémoglobine sous excitation à 415 nm (puissance : 30 %), somme de 40 acquisitions avant l'injection de **CPO1** (A) et juste après l'injection de **CPO1** (B).
C : fusion colorée des images A (rouge) et B (vert).
D et E : imagerie PA par **CPO1** sous excitation à 660 nm (puissance : 100 %), somme de 40 acquisitions commençant 80 secondes après l'injection de **CPO1** (D) et commençant 210 secondes après l'injection de **CPO1** (E).
F : fusion colorée des images D (rouge) et E (vert). Les cercles rouges mettent en évidence la formation de bouchons.
Taille des images : 400 μm x 400 μm .

De plus, nous avons observé une forte coloration de la queue des souris après l'injection ainsi qu'une légère coloration des zones irradiées de l'oreille pendant l'imagerie. Enfin, pour le composé le plus concentré **CPO2**, une coloration des pattes et du museau indique une sortie du système vasculaire. Nous n'avons pas effectué d'étude ex-vivo, afin de déterminer dans quels organes s'accumulent les nanoparticules.

6. Bilan

Dans cette partie, nous avons commencé par synthétiser de nouveaux colorants dipolaires basés sur un pont π conjugué, composé d'un ou de deux thiophènes, pour l'imagerie photoacoustique. Les propriétés optiques de ces colorants ont été étudiées et nous avons choisi les deux chromophores, **PTT-TCF** et **PTT-DCI**, qui nous semblaient les plus adéquats pour la photoacoustique au vu de leur absorption intense autour de 700 nm ainsi que leur faible fluorescence. Par ailleurs, nous avons aussi sélectionné quelques chromophores du laboratoire qui possédaient des propriétés optiques intéressantes pour la photoacoustique, **CPO1** et **CPO2**.

La génération de signal photoacoustique par ces chromophores en solution dans le chloroforme a ensuite pu être mesurée. Malheureusement, les chromophores basés sur un pont bithiophène ont montré une photodégradation extrêmement rapide sous irradiation laser. Nous pensons que cette dégradation passe par l'oxydation en dioxyde-thiophène d'un des thiophènes du pont. Les autres chromophores ont montré la génération de signal PA mais surtout la nécessité d'une absorbance élevée et donc d'une augmentation de la concentration.

En vue de l'imagerie *in vivo*, les chromophores ont été formulés en nanoagrégats, puis concentrés par évaporation de la majorité de l'eau à l'aide d'un évaporateur rotatif. Les nanoagrégats ont été caractérisés par DLS et par MEB et ont montré des tailles appropriées pour l'imagerie *in vivo* avec une faible augmentation lors de la concentration. De plus, cette concentration n'a aucun impact sur la forme des spectres d'absorption. La génération de signal photoacoustique a été étudiée dans des circuits de microfluidique avec plusieurs solutions d'agrégats de **CPO1** et de **CPO2** de concentrations croissantes. Avec ce microscope PA et ces colorants, des solutions d'absorbances supérieures à 200 sont nécessaires pour distinguer les canaux des circuits de microfluidique et l'augmentation des absorbances au-delà de 500 permet l'obtention d'images avec d'excellents ratios signal/bruit.

Enfin, l'imagerie PA de la vascularisation de l'oreille de souris a pu être effectuée à l'aide des nanoagrégats concentrés de **CPO1** et de **CPO2**. Ces agrégats ont montré une excellente réponse photoacoustique à 660 nm. Les agrégats circulent dans les vaisseaux sanguins pendant plus de 40 minutes. Cependant, la forte concentration des agrégats crée une redistribution du flux sanguin dans la vascularisation et notamment l'arrêt de la circulation sanguine dans certains capillaires. Il devrait être possible de diminuer la concentration, puisque le signal PA est supérieur *in vivo* à dans les circuits de microfluidique. Enfin, il semblerait que **CPO2** permet d'obtenir un signal PA plus élevé, mais que **CPO1** donne des agrégats plus stables au cours du temps.

Cette étude préliminaire souffre cependant d'un inconvénient majeur : la forte concentration en colorant. Cela entraîne des difficultés pour la synthèse des agrégats, mais surtout un impact des agrégats sur la vascularisation *in vivo*, notamment une redistribution du flux sanguin, ainsi qu'une coloration de l'animal. Même si, dans la littérature, les concentrations utilisées sont relativement élevées, généralement de quelques milligrammes de colorant par millilitre, les concentrations de nos solutions **C** et **D** sont de l'ordre de 10-20 mg/mL., soit sensiblement plus importantes. Pour l'instant, il n'est pas clair si cette faible sensibilité provient de nos chromophores ou du PAM. En tout cas, la formulation des colorants en agrégats semble loin d'être idéale et notre prochain effort sera consacré à trouver un nouveau type de nanoparticules pour formuler nos colorants.

Chapitre V. Conclusions et perspectives

Au cours de cette thèse, nous avons conçu, synthétisé et étudié des chromophores dipolaires pour l'imagerie biologique.

Dans une première partie, nous nous sommes intéressés à l'imagerie de fluorescence par excitation biphotonique. Pour cette application en milieu aqueux, nous avons choisi une approche nanoparticulaire, par formulation des fluorophores en nanoagrégats, qui nécessite une forte fluorescence à l'état solide. Nous avons donc synthétisé plusieurs séries de chromophores émissifs à l'état solide dans la fenêtre biologique (> 650 nm). A partir de la structure dipolaire D- π -A, nous avons modifié le groupement donneur, le groupement accepteur et le pont π conjugué en introduisant des groupements encombrants et hors du plan du chromophore afin de limiter les interactions intermoléculaires à l'état solide. Cette stratégie, et en particulier la synthèse de nouveaux groupements encombrés fortement électroaccepteurs, nous a permis d'obtenir des chromophores fortement émissifs à l'état solide entre 635 nm et 830 nm. En outre, la fluorescence en solution organique de plusieurs chromophores s'est aussi révélée remarquable. En particulier, les fluorophores basés sur un pont fluorényle ou dithiényrrole possèdent de forts solvatochromismes, des rendements quantiques dans le chloroforme entre 30 % et 80 %, au-delà de 700 nm. De plus, leur absorption dans la gamme 500-680 nm les rend prometteurs pour une excitation biphotonique dans la deuxième fenêtre biologique, NIR-II.

Par la suite, ces chromophores ont été formulés en nanoagrégats et en nanoparticules pluronic/silice. Après l'étude de leurs propriétés optiques dans des mélanges eau/acétone 90:10, nous avons sélectionné quatre fluorophores pour de l'imagerie de cellules HeLa. Cependant, les agrégats de ces chromophores, stabilisés à l'aide de pluronic F127, ont montré une faible internalisation dans les cellules vivantes. Seuls deux colorants, **Ph3NSPh** et **CbzOMeSPh**, ont bien été internalisés et ont permis l'imagerie cellulaire avec excitation biphotonique et monophotonique. Ces chromophores ont permis un marquage efficace du cytosquelette, ainsi que d'un organite, probablement des gouttelettes lipidiques. Avec les deux autres colorants, seules quelques cellules mortes ont pu être visualisées.

Nous avons aussi utilisé les nanoagrégats comme plateforme pour restaurer la fluorescence de chromophores peu émissifs à l'état solide par transfert d'énergie depuis un donneur émissif. Le FRET au sein des co-agrégats formés s'est montré extrêmement efficace, avec une extinction complète de la fluorescence du donneur dès quelques pourcents molaires d'accepteur. Les co-agrégats possèdent une fluorescence intense dans la fenêtre biologique ainsi que des pseudo-déplacements de stokes exceptionnels. Enfin, nous avons aussi encapsulé les chromophores dans des nanoparticules pluronic/silice. Ces nanoparticules sont particulièrement intéressantes pour des chromophores émissifs en solution organique peu polaire. Elles ont déjà montré un excellent comportement *in vivo* pour l'angiographie, avec un long temps de circulation sans diffusion dans le système extravasculaire.^[10] Cette méthode d'encapsulation est particulièrement prometteuse pour nos chromophores basés sur un pont fluorényle ou dithiényrrole. Cependant, au cours de la synthèse de ces nanoparticules, nous avons constaté une

cristallisation incontrôlée de certains chromophores, menant à la formation d'objets de taille conséquente. Cette synthèse devra donc être optimisée avant toute application *in vivo*.

La deuxième partie de ce manuscrit est consacrée à l'imagerie photoacoustique. Nous avons synthétisé deux familles de chromophores basés sur des ponts conjugués thiophène et bithiophène. La faible aromaticité du thiophène nous a permis de décaler progressivement l'absorption vers le proche infrarouge. Nous avons pu sélectionner deux chromophores possédant un maximum d'absorption suffisamment décalé pour notre application. Néanmoins, ces colorants se sont rapidement photodégradés sous irradiation laser. Parallèlement, nous avons utilisé d'anciens chromophores du laboratoire **CPO1** et **CPO2** qui présentent de fortes absorptions à 800 nm et 660 nm. A forte concentration, des nanoagrégats de chromophores nous ont permis l'acquisition d'images PA de circuits de microfluidique, puis *in vivo*, de la vascularisation d'une oreille de souris. En particulier, ces agrégats ont montré un temps de circulation élevé dans le sang et un excellent contraste. Cependant, nous avons observé une forte influence des agrégats sur la circulation sanguine, à cause des fortes concentrations employées, ce qui a causé la formation de bouchons menant à l'arrêt de la circulation sanguine dans certains capillaires.

Outre les résultats résumés ci-dessus, ce travail ouvre plusieurs interrogations et perspectives. Tout d'abord, pour les chromophores **SPh** et **SO2Ph**, plusieurs questions restent en attente : photostabilité de la liaison S-C, toxicité des chromophores, ADP, extinction de la fluorescence à l'état solide des sulfoxydes... Les résultats de la mesure d'ADP en solution dans le chloroforme de certains chromophores ainsi que la future disponibilité du microscope biphotonique devraient nous donner plus d'indications sur le potentiel de ces chromophores pour l'imagerie de fluorescence biphotonique. De plus, en collaboration avec J. Bernard à l'INSA de Lyon, nous avons récemment développé une procédure afin d'obtenir des nanocristaux de taille contrôlée (Figure V-1).^[266] L'application de cette méthode devrait nous permettre d'obtention des nano-objets aux propriétés optiques proches de celles de la poudre. Enfin, la voie de synthèse développée pour ces dérivés du cycle 2,5-dihydrofurane devrait permettre la création de nouveaux groupements plus encombrés, plus électroaccepteurs ou encore avec un site de fonctionnalisation.

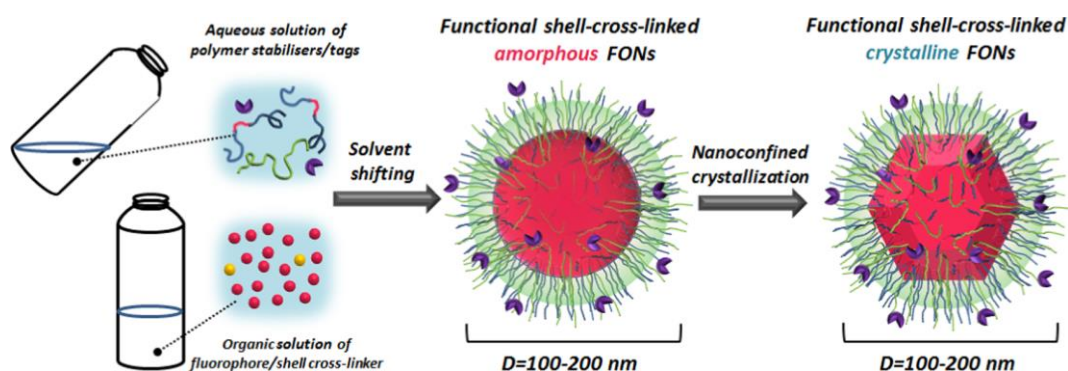


Figure V-1. Méthodologie de cristallisation nanoconfinée d'agrégats (tiré de ^[266]).

Par ailleurs, nous avons montré l'intérêt de la modification du pont π conjugué pour la fluorescence, notamment en solution. Si, dans ce projet exploratoire, nous avons été confrontés à des problèmes de solubilité, cette dernière devrait pouvoir être améliorée par la substitution de la diphenylamine par une di(4-butoxyphényl)amine ou alors par la modification du substituant du pyrrole central. Si leur absorption à deux photons est élevée, ces chromophores devraient être idéaux pour une imagerie avec excitation dans NIR-II et émission dans NIR-I. Bien que, pour l'instant, ces chromophores ne

soient pas fluorescents à l'état solide, nous avons montré qu'il était possible de restaurer cette fluorescence par transfert d'énergie depuis un donneur. Cette stratégie semble particulièrement avantageuse pour compenser la baisse des rendements quantiques des chromophores aux émissions les plus décalées vers le rouge.

Enfin, en photoacoustique, bien que nous ayons réussi à obtenir des premières images, les conditions utilisées ne sont pas optimales. Une formulation permettant des absorbances élevées avec des concentrations moindres devra être trouvée. De plus, il serait intéressant de comparer, dans les mêmes conditions, **CPO1** et **CPO2** avec certains des chromophores présentés dans l'introduction de ce manuscrit ou avec **TCPBn** que nous n'avons pas encore totalement exploité, par manque de temps.

Chapitre VI. Partie expérimentale

A. Synthesis

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 (254 nm or 365 nm). Anhydrous THF was distilled over sodium and benzophenone. For other anhydrous solvents: DMF, DCM and acetonitrile were bought from Acros under AcroSeal™, toluene was dried over Al₂O₃ column and methanol was dried overnight with preactivated 3 Å molecular sieves.

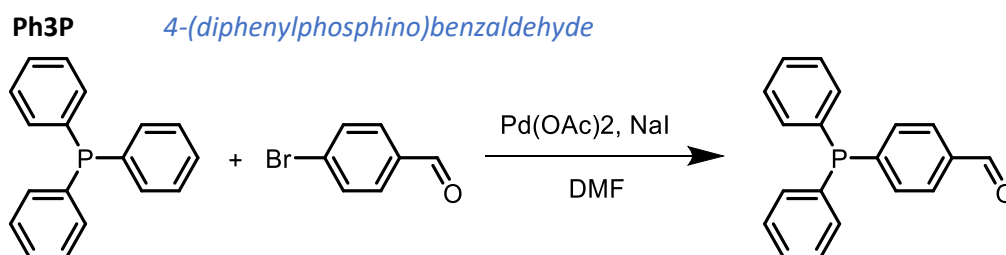
Several precursors were previously synthesized in our team: **Ph3N**, **TCF**, **MCF**, **A4**, **CbzOMe**, **CPO1**, **CPO2**, **CPO5** and **IV-7**.^[24,103–105]

Microwave synthesis were conducted in 10 or 20 mL sealed tube on a Biotage Initiator 2.5 single-mode reactor using external IR temperature control. Column chromatography was performed on Merck silica gel Si-60 (40-63 µm). NMR spectra were recorded at ambient temperature on a standard spectrometer operating at 500 MHz, 400 MHz or 300 MHz for ¹H NMR, 125 MHz or 100 MHz for ¹³C NMR and 202 or 162 MHz for ³¹P NMR. Chemical shifts are given in parts per million (ppm,) and are reported relative to tetramethylsilane (¹H, ¹³C) 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 (multiplet). Low resolution mass spectra were measured at 297 K by direct injection of dilute sample into the mass analyzer of an Agilent Technologies 1260 Infinity LC-MS instrument. High-resolution mass spectrometry (HRMS) measurements were performed by ESI-QTOF (Bruker Daltonics MicroTOF-Q II) at the *Centre Commun de Spectrométrie de Masse* (UCBL, Villeurbanne, France).

2. General procedure A for Knoevenagel condensations

In a 10 mL microwave tube, the acceptor and the aldehyde were suspended in absolute ethanol. One drop of piperidine was added before sealing of the microwave tube. The reaction was heated to 100 °C by microwave irradiation during 30 minutes to one hour and then was let cool down to RT overnight. The precipitated dye was filtered on a frit and washed with cold ethanol. If needed, the powder was recrystallized in absolute ethanol to give the pure product.

3. Synthesis and characterisation

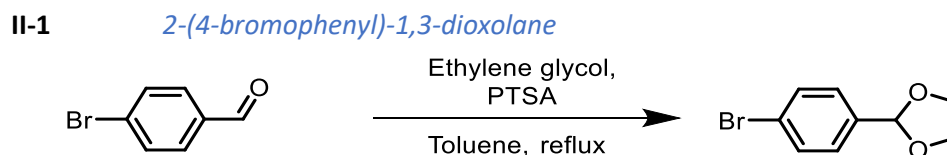


In a Schlenk, under argon, triphenylphosphine (0.655 g, 2.5 mmol), bromobenzaldehyde (187 mg, 1 mmol), palladium acetate (25 mg, 0.2 mmol) and sodium iodide (0.75 mg, 5 mmol) were added in DMF (4 mL) and the mixture was stirred at 135 °C for 6 days. After cooling down to RT, DMF was evaporated and the obtained solid was purified by chromatography on silica gel with a PE/EtOAc mixture (0 to 6 % of EtOAc) as eluent to give the product as a white solid (70 mg, 25 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 10.0 (s, 1H), 7.85–7.77 (m, 2H), 7.46–7.29 (m, 12H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 192.1, 146.6 (d, *J*_{p-c} = 15.6 Hz), 136.1, 135.9 (d, *J*_{p-c} = 10.5 Hz), 134.2 (d, *J*_{p-c} = 20.2 Hz), 133.7 (d, *J*_{p-c} = 18.5 Hz), 129.5, 128.9 (d, *J*_{p-c} = 7.4 Hz)

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃): δ -4.3



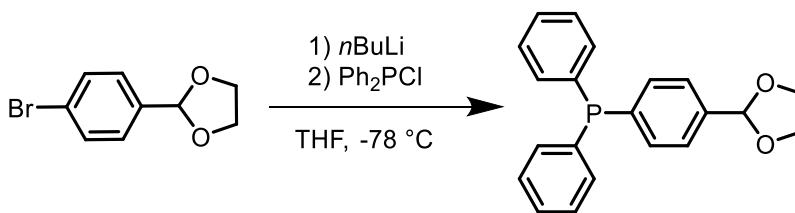
4-Bromobenzaldehyde (2 g, 10.8 mmol) and p-Toluenesulfonic acid (0.2 g, 1 mmol) were dissolved in toluene (50 mL) then an excess of ethylene glycol (2 mL, 35 mmol) was added. The mixture was then heated to reflux overnight under magnetic stirring using a Dean-Stark apparatus. After cooling, the solution was washed three times with saturated Na₂CO₃. After drying with Na₂SO₄, filtration and concentration under vacuum, 2.7 g of a yellow oil was obtained. The oil was purified over silica gel chromatography with DCM/PE 1:1 as eluent to obtain 2.3 g of a white solid (93 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.51 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.35 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 5.77 (s, 1H), 4.15–3.98 (m, 4H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 137.2, 131.7 (2C), 128.3 (2C), 123.4, 103.2, 65.5 (2C)

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M-H]⁺. Calcd for C₉H₈BrO₂: 226.9702, found: 226.9703

II-2

(4-(1,3-dioxolan-2-yl)phenyl)diphenylphosphine

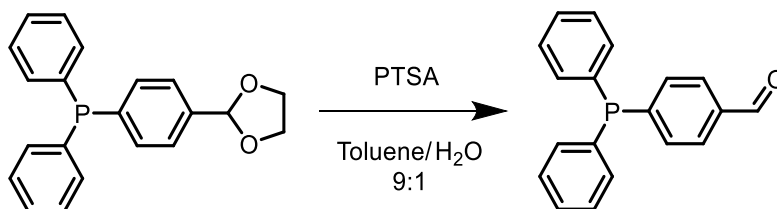
II-1 (2.2 g, 9.6 mmol) was dissolved in anhydrous THF under argon and cooled to -78 °C. *n*BuLi (2.5 M in hexanes, 4.25 mL, 10.6 mmol) was added dropwise and the mixture was stirred for 1 hour at -78 °C. Chlorodiphenylphosphine (2.2 g, 10 mmol) in anhydrous THF (5 mL) was then added dropwise. The temperature was let heat up to RT and the solution was stirred overnight. The reaction was quenched with saturated NH₄Cl (4 mL) and the layers were separated. The organic layer was washed with water and brine, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated under vacuum to give 3.5 g of a yellow oil. An attempt to recrystallize the product in EtOH only led to partial oxidation of the phosphine. The product was purified over silica gel chromatography with DCM as eluent to obtain 1.5 g of a white solid (47 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.48–7.41 (m, 2H), 7.39–7.26 (m, 12H), 5.80 (s, 1H), 4.15–4.00 (m, 4H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 138.7 (d, *J*_{p-c} = 11.5 Hz), 138.5, 137.1 (d, *J*_{p-c} = 10.7 Hz), 133.9 (d, *J*_{p-c} = 19.5 Hz), 128.9, 128.7 (d, *J*_{p-c} = 7.0 Hz), 126.7 (d, *J*_{p-c} = 7.0 Hz), 103.6, 65.5

³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃): δ -5.6

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M+H]⁺ Calcd for C₂₁H₂₀O₂P: 335.1195, found: 335.1201

Ph₃P*4-(diphenylphosphino)benzaldehyde*

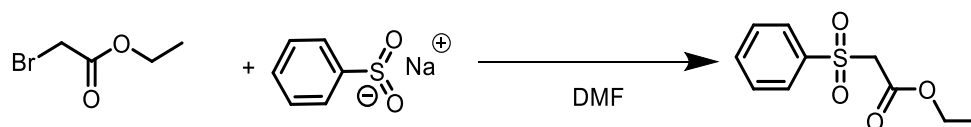
II-2 (1.5 g, 4.5 mmol) was dissolved in a toluene (10 mL) and water (1 mL) mixture before addition of *p*-toluenesulfonic acid (20 mg, 0.1 mmol). The mixture was refluxed for 6 hours (followed by TLC). Then, the mixture was let cool down to RT and more water (5 mL) was added. The mixture was extracted 3 times with ethyl acetate. The combined organic phases were washed 3 times with saturated Na₂CO₃, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated to give a yellow oil. This oil was purified over silica gel chromatography with DCM as eluent to obtain 1.05 g of a white solid (81 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 10.0 (s, 1H), 7.85–7.77 (m, 2H), 7.46–7.29 (m, 12H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 192.1, 146.6 (d, *J*_{p-c} = 15.6 Hz), 136.1, 135.9 (d, *J*_{p-c} = 10.5 Hz), 134.2 (d, *J*_{p-c} = 20.2 Hz), 133.7 (d, *J*_{p-c} = 18.5 Hz), 129.5, 128.9 (d, *J*_{p-c} = 7.4 Hz)

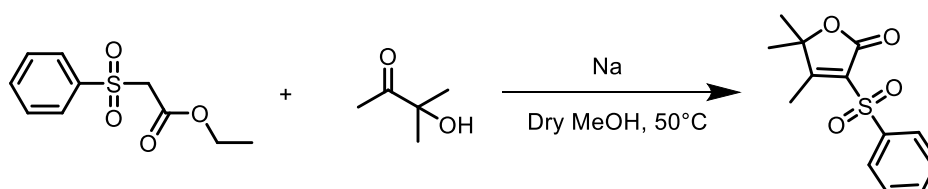
³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃): δ -4.3

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M+H]⁺ Calcd for C₁₉H₁₆OP: 291.0933, found: 291.0926

II-3 *ethyl 2-(phenylsulfonyl)acetate*Adapted from ^[102].

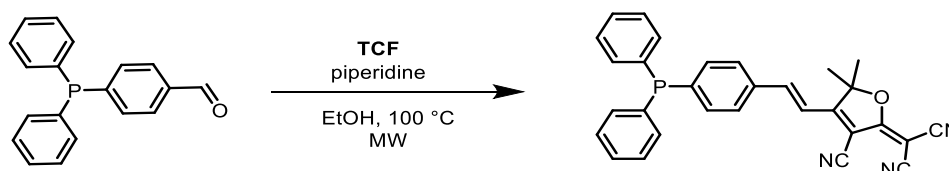
Benzenesulfonic acid sodium salt (11.7 g, 72 mmol) and ethyl bromoacetate (10 g, 60 mmol) were dissolved in DMF (120 mL) and were stirred at RT for one day. The mixture was poured in 200 mL of water. The product was extracted with EtOAc (5 x 100 mL), the combined organic phase was washed with brine, dried over sodium sulfate, filtered and concentrated to give 12.8 g of a colorless oil (94 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.02–7.90 (m, 2H), 7.75–7.65 (m, 1H), 7.63–7.53 (m, 2H), 4.14 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 4.11 (s, 2H), 1.19 (t, J = 7.1 Hz, 3H)

A2 *4,5,5-trimethyl-3-(phenylsulfonyl)furan-2(5H)-one*Adapted from ^[102].

In a two-necked flask, under argon atmosphere, sodium (430 mg, 18.7 mmol) was added to dry methanol (25 mL) at 0 °C. After 1 hour, **II-3** (12.7 g, 55.6 mmol) and 3-hydroxy-3-methyl-2-butanone (5.68 g, 55.6 mmol) were added and the solution was stirred at 50 °C for 2 days. The solution was let cool down to RT and the precipitate was filtered and washed with ether. The precipitate was redissolved into DCM and washed 3 times with water, dried over sodium sulfate and evaporated to give a pinkish solid. 4.5 g of the white product was obtained after a recrystallization in EtOAc (30 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.08 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.66 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 7.56 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.51 (s, 3H), 1.47 (s, 6H)

P1 *(E)-2-(3-cyano-4-(4-(diphenylphosphino)styryl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene)malononitrile*

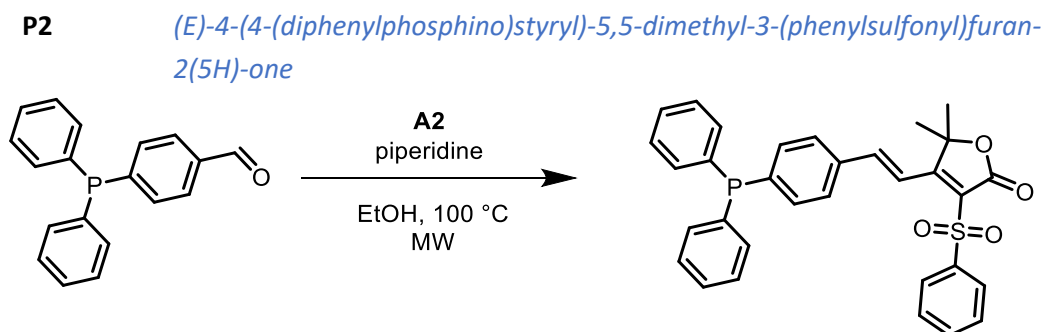
General procedure A: **Ph3P** (0.69 mmol) and **TCF** (0.65 mmol) were heated 30 minutes at 100 °C in the microwave oven and gave after filtration 210 mg of a red powder. This powder was purified over silica gel chromatography with DCM as eluent to obtain 200 mg of a red solid (65 %).

¹H NMR (500 MHz, CD₂Cl₂): δ 7.66–7.59 (m, 3H), 7.42–7.32 (m, 11H), 7.08 (d, *J* = 16.5 Hz, 2H), 1.78 (s, 6H)

¹³C NMR (125 MHz, CD₂Cl₂): δ 175.8, 174.3, 147.0, 145.0 (d, *J*_{p-c} = 15.4 Hz), 136.5 (d, *J*_{p-c} = 11.1 Hz, 2C), 134.4 (d, *J*_{p-c} = 20.2 Hz, 4C), 134.3 (d, *J*_{p-c} = 18.3 Hz, 2C), 129.7 (2C), 129.2 (d, *J*_{p-c} = 7.3 Hz, 4C), 129.0 (d, *J*_{p-c} = 6.2 Hz, 2C), 115.9, 112.1, 111.5, 110.6, 100.8, 98.4, 58.1, 30.1, 26.6 (2C)

³¹P NMR (202 MHz, CD₂Cl₂): δ -4.12

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M+H]⁺ Calcd for C₃₀H₂₃N₃OP: 472.1573, found: 472.1558



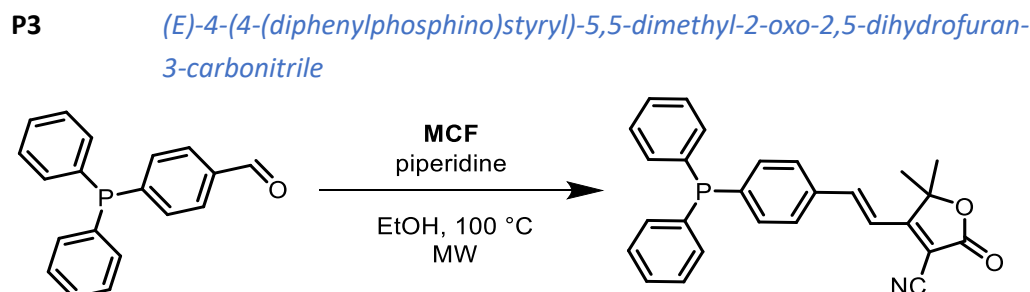
General procedure A: **Ph3P** (0.69 mmol) and **A2** (0.65 mmol) were heated 30 minutes at 100 °C in the microwave oven and gave after filtration 300 mg of a yellow powder. This powder was purified over silica gel chromatography with a gradient from DCM/PE 1:1 to DCM as eluent to obtain 250 mg of a yellow solid (71 %).

¹H NMR (500 MHz, CD₂Cl₂): δ 8.32 (d, *J* = 16.9 Hz, 1H), 8.08–8.03 (m, 2H), 7.70–7.62 (m, 3H), 7.59–7.54 (m, 2H), 7.41–7.33 (m, 12H), 7.26 (d, *J* = 16.9 Hz, 1H), 1.70 (s, 6H)

¹³C NMR (125 MHz, CD₂Cl₂): δ 171.1, 165.0, 144.4, 142.9 (d, *J*_{p-c} = 14.3 Hz), 140.2, 136.9 (d, *J*_{p-c} = 11.3 Hz, 2C), 135.5, 134.6, 134.4 (d, *J*_{p-c} = 18.7 Hz, 2C), 134.3 (d, *J*_{p-c} = 20.1 Hz, 4C), 129.6 (2C), 129.5 (2C), 129.1 (d, *J*_{p-c} = 7.2 Hz, 4C), 128.9 (2C), 128.7 (d, *J*_{p-c} = 6.4 Hz, 2C), 124.4, 116.8, 85.7, 27.4 (2C)

³¹P NMR (202 MHz, CD₂Cl₂): δ -4.86

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M+H]⁺ Calcd for C₃₂H₂₈O₄PS: 539.1440, found: 539.1425



General procedure A: **Ph3P** (0.69 mmol) and **MCF** (0.65 mmol) were heated 30 minutes at 100 °C in the microwave oven. As the product didn't precipitate, the crude was concentrated and purified over silica gel chromatography with DCM as eluent to obtain 140 mg of a yellow solid (51 %).

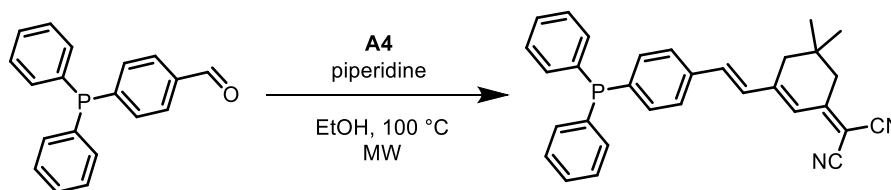
¹H NMR (500 MHz, CD₂Cl₂): δ 7.68 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 7.62–7.57 (m, 2H), 7.42–7.30 (m, 12H), 6.95 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 1.67 (s, 6H)

¹³C NMR (125 MHz, CD₂Cl₂): δ 176.4, 166.3, 145.3, 143.4 (d, *J*_{p-c} = 14.9 Hz), 136.7 (d, *J*_{p-c} = 11.1 Hz, 2C), 134.7, 134.3 (d, *J*_{p-c} = 20.2 Hz, 4C), 134.3 (d, *J*_{p-c} = 18.8 Hz, 2C), 129.6 (2C), 129.1 (d, *J*_{p-c} = 7.2 Hz, 4C), 128.6 (d, *J*_{p-c} = 6.2 Hz, 2C), 116.0, 112.5, 99.6, 87.4, 26.1 (2C)

³¹P NMR (202 MHz, CD₂Cl₂): δ -4.67

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M+H]⁺ Calcd for C₂₇H₂₃NO₂P: 424.1461, found: 424.1448

P4 *(E)-2-(3-(4-(diphenylphosphino)styryl)-5,5-dimethylcyclohex-2-en-1-ylidene)malononitrile*



General procedure A: **Ph3P** (0.69 mmol) and **A4** (0.65 mmol) were heated 30 minutes at 100 °C in the microwave oven and gave after filtration 90 mg of a yellow powder. This powder was purified over silica gel chromatography with DCM as eluent to obtain 70 mg of a yellow solid (23 %).

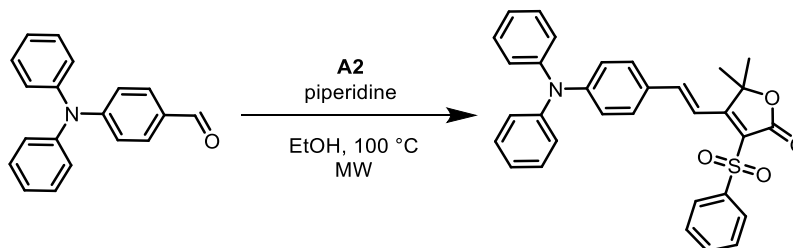
¹H NMR (500 MHz, CD₂Cl₂): δ 7.51–7.47 (m, 2H), 7.40–7.28 (m, 12H), 7.07 (s, 2H), 6.85 (s, 1H), 2.61 (s, 2H), 1.48 (s, 2H), 1.07 (s, 6H)

¹³C NMR (125 MHz, CD₂Cl₂): δ 169.7, 154.2, 140.2 (d, *J*_{p-c} = 13.3 Hz), 137.2 (d, *J*_{p-c} = 11.3 Hz, 2C), 136.6, 136.5, 134.32 (d, *J*_{p-c} = 18.4 Hz, 2C), 134.2 (d, *J*_{p-c} = 19.8 Hz, 4C), 130.2, 129.4 (2C), 129.0 (d, *J*_{p-c} = 7.1 Hz, 4C), 127.8 (d, *J*_{p-c} = 6.6 Hz, 2C), 124.3, 113.9, 113.2, 79.3, 43.3, 39.5, 32.3, 28.1 (2C)

³¹P NMR (202 MHz, CD₂Cl₂): δ -5.29

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M+H]⁺ Calcd for C₃₁H₂₈N₂P: 459.1985, found: 459.1975

N2 *(E)-4-(4-(diphenylamino)styryl)-5,5-dimethyl-3-(phenylsulfonyl)furan-2(5H)-one*



General procedure A: **Ph3N** (0.35 mmol) and **A2** (0.37 mmol) were heated 20 minutes at 100 °C in the microwave oven and gave after filtration a red powder. This powder was recrystallized in ethanol to give 115 mg of red crystals (0.22 mmol, 63 %).

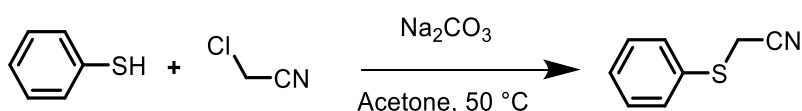
¹H NMR (400 MHz, DMSO): δ 8.01–7.93 (m, 3H), 7.78–7.60 (m, 7H), 7.40 (m, 4H), 7.27–7.11 (m, 5H), 6.95 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 1.68 (s, 6H)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO): δ 172.1, 164.4, 150.5, 145.9 (2C), 139.8, 134.6, 134.3, 130.6, 130.0 (4C), 129.5 (2C), 127.9, 127.7 (2C), 127.6, 125.7 (4C), 124.9 (2C), 120.2, 119.8, 111.8, 85.4, 26.7 (2C)

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M+H]⁺ Calcd for C₃₂H₂₇NO₄S: 522.1734, found: 522.1718

II-4 *thiophenoxyacetonitrile*

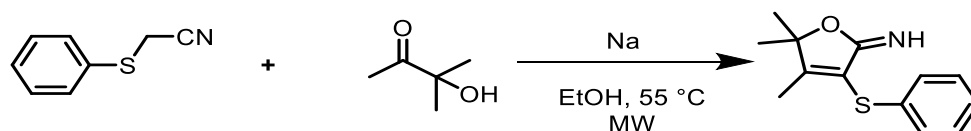
Adapted from [339].



Thiophenol (4 mL, 39 mmol) and chloroacetonitrile (3 mL, 47 mmol) were dissolved in 20 mL of acetone. Sodium carbonate (6.5 g, 61 mmol) was added and the mixture was heated at 50 °C under magnetic stirring overnight. After cooling back to room temperature, the reaction mixture was filtered and concentrated. The remaining oil was dissolved in diethyl ether, washed with water, 0.5 M sodium hydroxide and water again, dried over Na₂SO₄ and concentrated to give 5.64 g of a yellow oil (97%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.60–7.50 (m, 2H), 7.48–7.34 (m, 3H), 3.56 (s, 2H)

II-5 *4,5,5-trimethyl-3-(phenylthio)furan-2(5H)-imine*

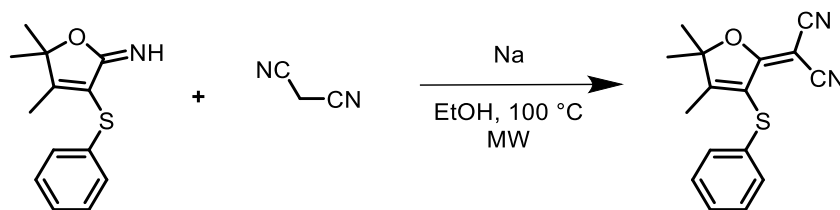


In a 20 mL microwave tube equipped with a magnetic stirrer, sodium (100 mg, 4.3 mmol) was added to 5 mL of ethanol. Once all the sodium was consumed, thiophenoxyacetonitrile (3.2 g, 21.4 mmol) and 3-hydroxy-3-methyl-2-butanone (2.2 g, 21.5 mmol) were added. Then, the mixture was heated to 55 °C during 30 minutes in a microwave oven. After cooling back to RT, DCM was added and the residual sodium salts were filtered and washed with DCM. The filtrate was concentrated under vacuum and purified over a short silica gel chromatography with DCM to DCM/EtOH 96:04 as eluent to obtain 4.45 g of a yellow oil (95 %). Attempts to further purify the product over silica gel only led to a degradation of the product.

¹H NMR (300 MHz, CD₂Cl₂): δ 7.31–7.25 (m, 2H), 7.22–7.16 (m, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.48 (s, 6H)

¹³C NMR (100 MHz, CD₂Cl₂): δ 169.2, 134.3, 129.6 (2C), 128.0 (2C), 126.7, 119.7, 88.8, 25.3 (2C), 12.7

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M+H]⁺ Calcd for C₁₃H₁₆NOS: 234.0947, found: 234.0947

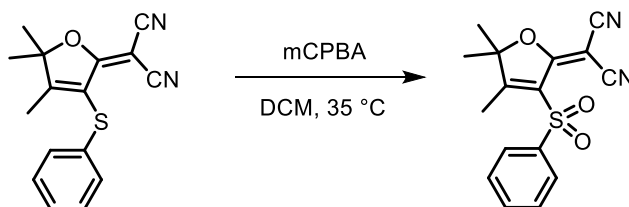
SPh *2-(4,5,5-trimethyl-3-(phenylthio)furan-2(5H)-ylidene)malononitrile*

In a 20 mL microwave tube equipped with a magnetic stirrer, sodium (100 mg, 4.3 mmol) was added to 5 mL of ethanol. Once all the sodium was consumed, **II-5** (0.95 g, 4.1 mmol) and malononitrile (540 mg, 8.2 mmol) were added and the mixture was heated in a microwave tube to 100 °C. After one hour, the reaction was followed by ¹H-NMR and one more equivalent of malononitrile (270 mg, 4.1 mmol) was added. The mixture was heated one supplementary hour in order to completely consume the imine. After cooling down, the mixture was concentrated. The residue was dissolved in DCM and water and the layers were separated. The organic layer was washed two more times with water, dried over Na₂SO₄ and concentrated to give 1.18 g of a brown solid. The crude was purified over silica gel chromatography with DCM as eluent to give 0.97 g (84 %) of an off-white solid.

¹H NMR (300 MHz, CD₂Cl₂): δ 7.37–7.30 (m, 2H), 7.29–7.23 (m, 1H), 7.19–7.13 (m, 2H), 2.21 (s, 3H), 1.61 (s, 6H)

¹³C NMR (100 MHz, CD₂Cl₂): δ 181.8, 178.4, 133.9, 129.9 (2C), 127.9 (2C), 127.4, 120.9, 113.4, 112.4, 98.2, 56.8, 24.9 (2C), 13.5

HR-MS (ESI-QTOF) m/z: [M-H]⁻ Calcd for C₁₆H₁₃N₂OS: 281.0754, found: 281.0744

SO2Ph *2-(4,5,5-trimethyl-3-(phenylsulfonyl)furan-2(5H)-ylidene)malononitrile*

SPh (500 mg, 1.77 mmol) was dissolved in 20 mL of DCM. mCPBA (1.5 g, 4.8 mmol, 2.7 eq) was added. The reaction was heated at 35 °C during 60 h until the complete formation of the sulfone, followed by ¹H NMR. The solvent was evaporated to give 1.5 g of white solid. This solid was dissolved into a minimum of EtOAc and the product was precipitated by addition of pentane. The precipitate was washed with cold ethanol to afford 500 mg of a white powder (90 %).

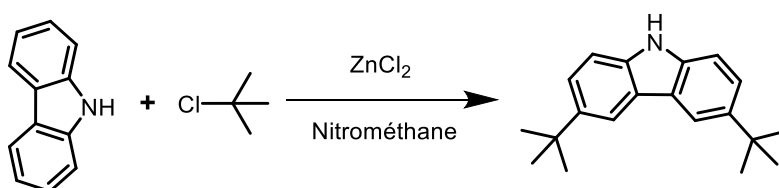
¹H NMR (300 MHz, CD₂Cl₂): δ 8.00–7.95 (m, 2H), 7.77–7.71 (m, 1H), 6.67–6.60 (m, 2H), 2.58 (s, 3H), 1.59 (s, 6H)

¹³C NMR (100 MHz, CD₂Cl₂): δ 180.9, 174.9, 139.8, 135.1, 130.1 (2C), 129.3, 128.0 (2C), 113.1, 112.5, 97.7, 59.7, 24.6 (2C), 14.4

HR-MS (ESI-QTOF) m/z: [M+Na]⁺ Calcd for C₁₆H₁₄N₂NaO₃S: 337.0617, found: 337.0614

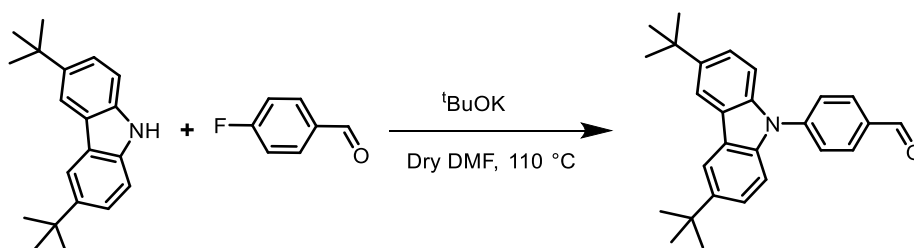
II-6 *3,6-di-tert-butyl-9H-carbazole*

Adapted from [340].



To a solution of ZnCl_2 (24 g, 180 mmol) and carbazole (10 g, 60 mmol) in nitromethane (150 mL), *tert*-butyl chloride (19 mL, 180 mmol) was added dropwise and the mixture was stirred during 2 days at RT. Water was then added and the product was extracted three times with DCM. The organic layers were gathered, dried over Na_2SO_4 and concentrated under vacuum to give 17 g of a gray powder.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 8.10 (s, 2H), 7.82 (s, broad, 1 H), 7.48 (dd, $J_1 = 1.6$ Hz, $J_2 = 8.5$ Hz, 2H), 7.32 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 1.48 (s, 18H)

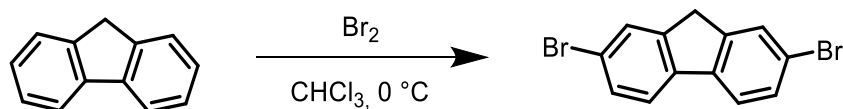
tBuCbz *4-(3,6-di-tert-butyl-9H-carbazol-9-yl)benzaldehyde*

Under argon, **II-6** (2 g, 7.2 mmol) and $^t\text{BuOK}$ (705 mg, 7.2 mmol) were added to anhydrous DMF (50 mL) and the mixture was heated at 110 °C for 3 days. After cooling down, part of the impure product was precipitated by addition of water (200 mL) and was filtered to obtain 1 g of impure product. The filtrate was extracted 3 times with DCM. The combined organic layers were dried over Na_2SO_4 and concentrated under vacuum to give another 1.2 g of impure product. Finally, purification by chromatography on silica gel eluting with PE to PE/DCM 70:30 as eluent gradient gave 1 g of white solid (36 %).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 10.10 (s, 1H), 8.17–8.08 (m, 4H), 7.79 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.54–7.42 (m, 4H), 1.47 (s, 18H)

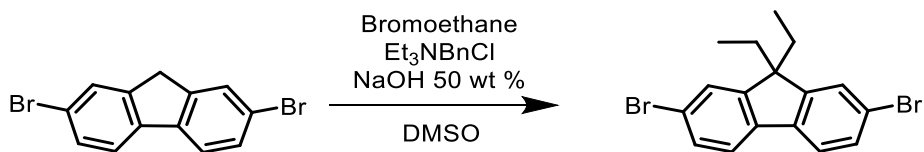
$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 191.2, 144.1, 144.0 (2C), 138.5, 134.3, 131.5 (2C), 126.4 (2C), 124.2, 124.1 (2C), 116.6 (2C), 109.4 (2C), 34.9 (2C), 32.1 (6C)

HR-MS (ESI-QTOF) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{NO}$: 384.2320, found: 384.2322

II-7 *2,7-dibromo-9H-fluorene*Adapted from ^[341].

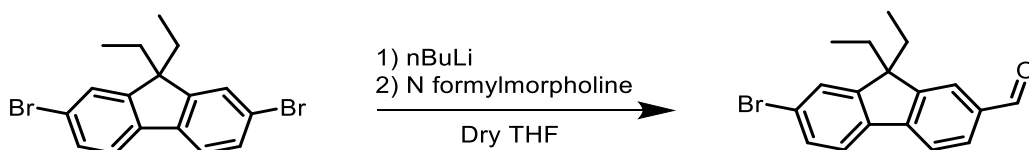
In a three-neck flask equipped with a dropping funnel, a thermometer and a bubbler, fluorene (15 g, 88.4 mmol) was dissolved in chloroform (80 mL) under argon. The mixture was cooled down to $0\text{ }^\circ\text{C}$ with an ice bath. Cold bromine (15 mL, 293 mmol) and chloroform (20 mL) were added in the dropping funnel. This solution was added dropwise into the flask. After the addition of bromine, the mixture was allowed to return to RT and stirred overnight. The mixture was then washed with $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ and water, dried over Na_2SO_4 , concentrated under vacuum and recrystallized in chloroform to give 21.5 g of an off-white solid (75 %).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.67 (s, 2H), 7.60 (d, $J = 8.1\text{ Hz}$, 2H), 7.50 (d, $J = 8.1\text{ Hz}$, 2H), 3.87 (s, 2H)

II-8 *2,7-dibromo-9,9-diethyl-fluorene*Adapted from ^[105].

Under argon, **II-7** (15 g, 46.3 mmol) and benzyltriethylammonium chloride (600 mg, 2.6 mmol) were dissolved in DMSO (68 mL). NaOH (10 mL, 50 wt %) was added to this mixture dropwise. The red solution was cooled to $0\text{ }^\circ\text{C}$ with an ice bath and bromoethane (20.8 mL, 277 mmol) was added dropwise. The mixture was stirred at room temperature for 2 hours then heated to $60\text{ }^\circ\text{C}$ for 3 hours. After cooling down, EtOAc (50 mL) was added and the solution was filtered. The filtrate was washed by HCl (1 M), water and brine. The organic layer was dried over Na_2SO_4 and was concentrated to afford 17.2 g of **II-8** as a yellow solid (97 %)

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.52 (d, $J = 8.0\text{ Hz}$, 2H), 7.48–7.42 (m, 4 H), 1.99 (q, $J = 7.4\text{ Hz}$, 4H), 0.31 (t, $J = 7.4\text{ Hz}$, 6H)

II-9 *7-bromo-9,9-diethyl-fluorene-2-carbaldehyde*Adapted from ^[105].

II-8 (5 g, 13.1 mmol) was solubilized in anhydrous THF (50 mL) under argon. The mixture was cooled to $-78\text{ }^\circ\text{C}$ (with dry ice in an acetone bath) for 30 minutes then $n\text{BuLi}$ (2.5 M in hexane, 5 mL, 12.5 mmol)

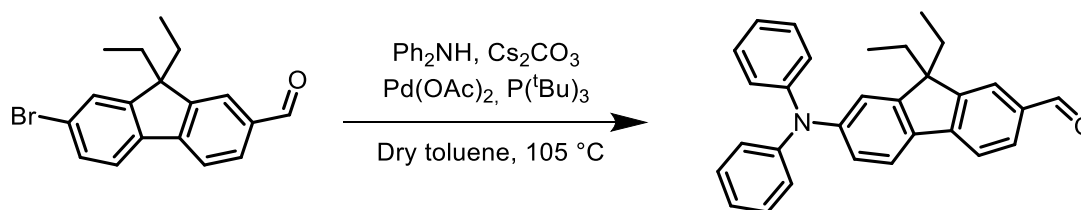
was added dropwise. After 30 minutes, *N*-formylmorpholine was added and the mixture was stirred for another 30 minutes. After letting the flask warm back to RT, HCl 1 M (20 ml) and DCM (20 mL) were added. The phases were separated and the organic phase was washed with water then brine, dried over sodium sulfate, filtered and concentrated. After purification by chromatography on silica gel with pentane/EtOAc (0% to 2 %) as eluent, 2.2 g of the pure product was obtained as an off-white solid (51 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 10.06 (s, 1H), 7.90–7.77 (m, 3H), 7.68–7.61 (m, 1H), 7.55–7.48 (m, 2H), 2.18–1.95 (m, 4H), 0.31 (t, *J* = 3.7 Hz, 6H)

Ph2NF

7-(diphenylamino)-9,9-diethyl-fluorene-2-carbaldehyde

Adapted from ^[105].



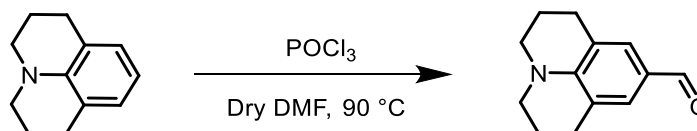
II-9 (2 g, 6.1 mmol), diphenylamine (1.54 g, 9.1 mmol) and Cs₂CO₃ (2.96 g, 9.1 mmol) were added in dry toluene (20 mL) in a schlenk under argon atmosphere. Pd(OAc)₂ (0.06 g, 0.27 mmol) and P(^tBu)₃ (1 M solution in toluene, 90 μL) were added in the schlenk. The mixture was heated at 105 °C overnight. After cooling back to RT, DCM was added and the mixture was filtered then washed with water, 1 M HCl and water again. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated to give 3.5 g of a brown oil. The crude was purified by chromatography on silica gel with EtOAc/PE/DCM 1:100:10 to 1:100:30 as eluent gradient to obtain 1.96 g of **Ph2NF** as yellow solid (77 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 10.02 (s, 1H), 7.86–7.79 (m, 2 H), 7.72 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.62 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.31–7.21 (m, 4H), 7.16–7.00 (m, 8H), 2.11–1.82 (m, 4H), 0.34 (t, *J* = 7.3 Hz, 6H)

Jul

1,2,3,5,6,7-hexahydropyrido[3,2,1-ij]quinoline-9-carbaldehyde

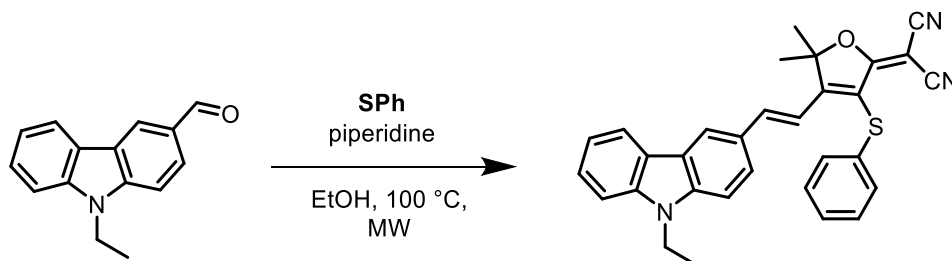
Adapted from ^[342].



Under argon atmosphere, POCl₃ (690 μL, 7.2 mmol) was added dropwise to anhydrous DMF (5 mL) at 0 °C and the mixture was stirred for 30 minutes. Julolidine (1.25 g, 7.2 mmol), dissolved in anhydrous DMF (5 mL), was added. The solution was heated at 90 °C for 3 hours. After cooling down, the solution was poured in water (30 mL). The product was extracted with DCM. The organic layer was washed with NaHCO₃ then with water, dried over Na₂SO₄ and concentrated to give 1.5 g of a brown oil. The crude was purified by chromatography on silica gel eluting with DCM to give 1.23 g of an off-white solid (84 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9.60 (s, 1H), 7.29 (s, 2H), 3.29 (t, *J* = 5.7 Hz, 4H), 2.77 (t, *J* = 6.3 Hz, 4H), 1.96 (quint, *J* = 6.1 Hz, 4H)

EtCbzSPh *(E)-2-(4-(2-(9-ethyl-9H-carbazol-3-yl)vinyl)-5,5-dimethyl-3-(phenylthio)furan-2(5H)-ylidene)malononitrile*



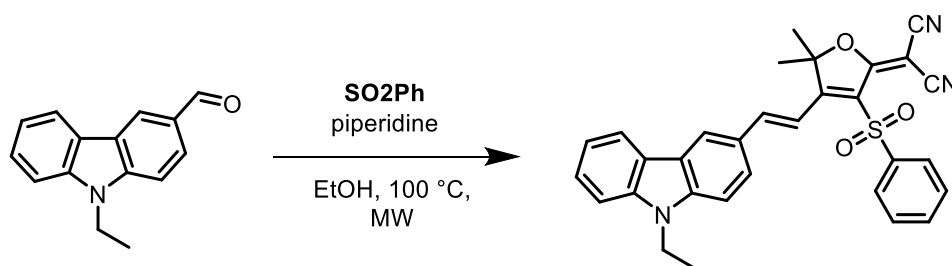
General procedure A: **EtCbz** (0.39 mmol) and **SPh** (0.35 mmol) were heated 30 minutes at 100 °C in the microwave oven and gave after filtration 130 mg of orange needles. This powder was recrystallized in absolute ethanol to give 115 mg of pure compound (67 %).

¹H NMR (300 MHz, CD₂Cl₂): δ 8.32 (d, *J* = 1 Hz, 1H), 8.13 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.75 (dd, *J*₁ = 8.6 Hz, *J*₂ = 1.4 Hz, 1H), 7.62–7.41 (m, 5H), 7.40–7.21 (m, 6H), 4.39 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.90 (s, 6H), 1.44 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)

¹³C NMR (100 MHz, CD₂Cl₂): δ 181.2, 172.2, 145.1, 142.3, 141.1, 135.0, 129.9 (2C), 127.8 (2C), 127.2, 127.0, 126.6, 126.4, 124.0, 123.1, 121.9, 121.0, 120.4, 117.8, 114.3, 114.2, 113.3, 109.8, 109.6, 96.4, 55.6, 38.4, 27.3 (2C), 14.0

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M-H][−] Calcd for C₃₁H₂₄N₃OS: 486.1646, found: 486.1667

EtCbzSO₂Ph *(E)-2-(4-(2-(9-ethyl-9H-carbazol-3-yl)vinyl)-5,5-dimethyl-3-(phenylsulfonyl)furan-2(5H)-ylidene)malononitrile*



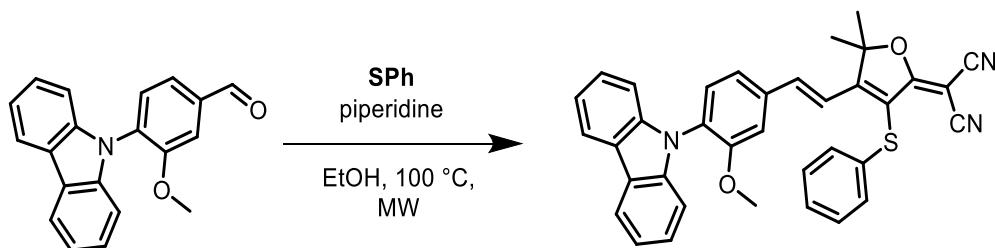
General procedure A: **EtCbz** (0.35 mmol) and **SO₂Ph** (0.32 mmol) were heated 40 minutes at 100 °C in the microwave oven and gave after filtration 75 mg of dark red needles. This powder was recrystallized in absolute ethanol to give 55 mg of pure compound (33 %).

¹H NMR (300 MHz, CD₂Cl₂): δ 8.50–8.38 (m, 3H), 8.18 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 8.06 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.91 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.75–7.47 (m, 7H), 7.335 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 4.43 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.90 (s, 6H), 1.48 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H)

^{13}C NMR (100 MHz, CD_2Cl_2): δ 174.7, 172.3, 150.4, 143.2, 141.1, 140.8, 134.6, 130.0 (2C), 127.6 (2C), 127.3, 127.1, 126.3, 124.2, 123.9, 123.1, 122.9, 121.1, 120.8, 114.2, 113.4, 122.7, 110.2, 109.9, 95.1, 57.7, 38.5, 28.1 (2C), 14.0

HR-MS (ESI-QTOF) m/z : $[\text{M}+\text{Na}]^+$ Calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{NaO}_3\text{S}$: 542.1509, found: 542.1498

CbzOMeSPh *(E)-2-(4-(4-(9H-carbazol-9-yl)-3-methoxystyryl)-5,5-dimethyl-3-(phenylthio)furan-2(5H)-ylidene)malononitrile*



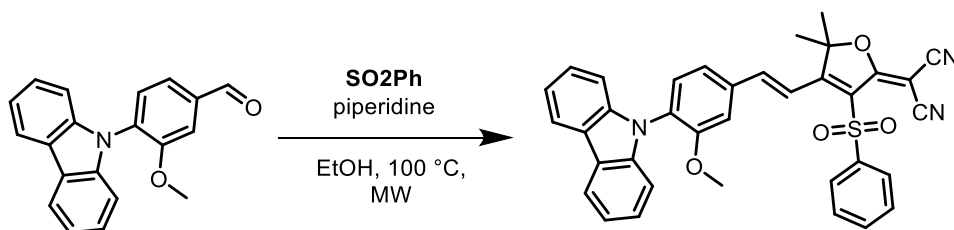
General procedure A: **CbzOMe** (0.39 mmol) and **SPh** (0.35 mmol) were heated 30 minutes at 100 °C in the microwave oven and gave after filtration 200 mg of an orange powder. This powder was recrystallized in absolute ethanol to give 170 mg of pure compound (86 %).

^1H NMR (300 MHz, CD_2Cl_2): δ 8.13 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.53 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.49 (d, J = 16.8 Hz, 1H), 7.44–7.22 (m, 12H), 7.13 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 1.91 (s, 6H)

^{13}C NMR (100 MHz, CD_2Cl_2): δ 180.8, 170.5, 156.5, 142.0, 141.2, 136.7, 134.3, 130.5, 130.0 (2C), 128.6, 128.1 (2C), 127.6, 126.3 (2C), 123.7, 121.6, 121.4, 120.6 (2C), 120.3 (2C), 118.6, 113.7, 112.8, 112.2, 110.5 (2C), 96.7, 57.3, 56.3, 27.1 (2C)

HR-MS (ESI-QTOF) m/z : $[\text{M}-\text{H}]^-$ Calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$: 564.1751, found: 564.1746

CbzOMeSO2Ph *(E)-2-(4-(4-(9H-carbazol-9-yl)-3-methoxystyryl)-5,5-dimethyl-3-(phenylsulfonyl)furan-2(5H)-ylidene)malononitrile*



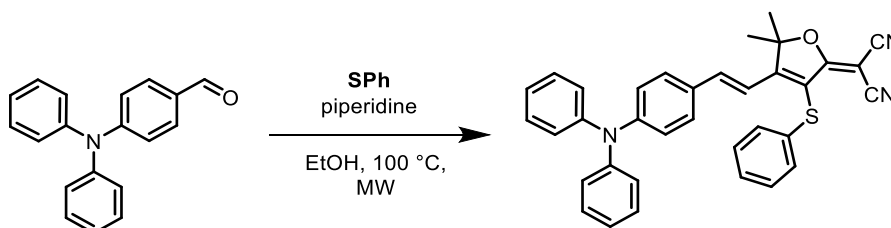
Modified general procedure A: **CbzOMe** (0.21 mmol) and **SO2Ph** (0.19 mmol) were heated 40 minutes at 100 °C in the microwave oven. As no precipitation occurred after cooling down, one equivalent of acceptor (0.19 mmol) and of aldehyde (0.21 mmol) were added and the tube was heated for 40 minutes at 100 °C in the microwave oven. After cooling down, filtration gave 60 mg of red powder which was purified by recrystallization in absolute ethanol to give 50 mg of pure compound (22 %).

^1H NMR (300 MHz, CD_2Cl_2): δ 8.51 (d, J = 16.8 Hz, 1H), 8.15 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 8.07–8.01 (m, 2H), 7.78–7.70 (m, 1H), 7.69–7.59 (m, 3H), 7.57–7.47 (m, 2H), 7.46–7.37 (m, 3H), 7.29 (t, J = 7 Hz, 2H), 7.17 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 1.92 (s, 6H)

^{13}C NMR (100 MHz, CD_2Cl_2): δ 174.2, 171.1, 156.5, 146.6, 141.1, 140.2, 136.2, 135.0, 130.7, 130.1 (2C), 129.9, 127.8 (2C), 126.7, 126.3 (2C), 123.9, 122.4, 120.6 (2C), 120.5 (2C), 117.2, 113.6, 113.1, 112.9, 110.6 (2C), 95.5, 59.8, 56.3, 27.9 (2C)

HR-MS (ESI-QTOF) m/z : $[\text{M}-\text{H}]^-$ Calcd for $\text{C}_{36}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$: 596.1650, found: 596.1649

Ph3NSPh *(E)-2-(4-(4-(diphenylamino)styryl)-5,5-dimethyl-3-(phenylthio)furan-2(5H)-ylidene)malononitrile*



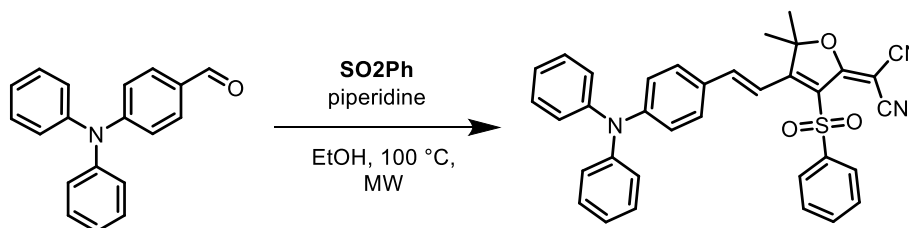
General procedure A: **Ph3N** (0.58 mmol) and **SPh** (0.53 mmol) were heated one hour at 100 °C in the microwave oven and gave after filtration 200 mg of a red powder. This powder was recrystallized in absolute ethanol to give 190 mg of pure compound (66 %).

^1H NMR (300 MHz, CD_2Cl_2): δ 7.41 (d, J =8.8 Hz, 2H), 7.36–7.27 (m, 6H), 7.26–7.09 (m, 11H), 6.97 (d, J =8.8 Hz, 2H), 1.82 (s, 6H)

^{13}C NMR (100 MHz, CD_2Cl_2): δ 181.1, 171.9, 151.2, 146.8 (2C), 143.1, 134.9, 130.0 (4C), 130.0 (2C), 129.9 (2C), 128.0, 127.7 (2C), 127.2, 126.3 (4C), 125.1 (2C), 121.0 (2C), 118.0, 114.5, 114.2, 113.2, 96.3, 55.7, 27.2 (2C)

HR-MS (ESI-QTOF) m/z : $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ Calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{27}\text{ClN}_3\text{OS}$: 572.1569, found: 572.1553

Ph3NSO2Ph *(E)-2-(4-(4-(diphenylamino)styryl)-5,5-dimethyl-3-(phenylsulfonyl)furan-2(5H)-ylidene)malononitrile*

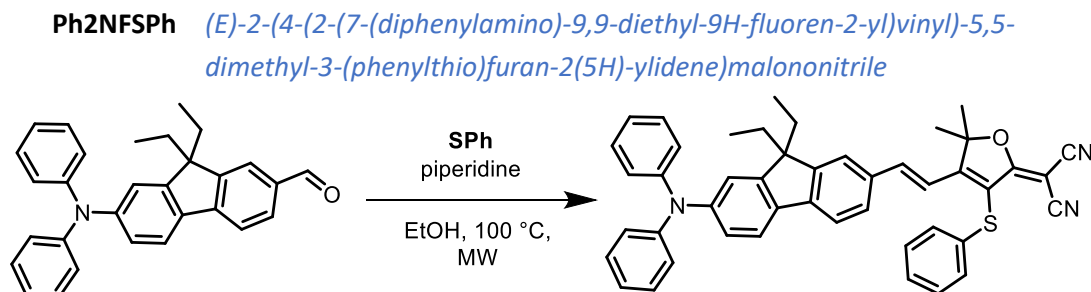


General procedure A: **Ph3N** (0.35 mmol) and **SO2Ph** (0.32 mmol) were heated 40 minutes at 100 °C in the microwave oven and gave after filtration 135 mg of a green powder (75 %).

^1H NMR (300 MHz, CD_2Cl_2): δ 8.19 (d, J =16.5Hz, 1H), 8.02–7.97 (m, 2H), 7.72–7.69 (m, 1H), 7.63–7.56 (m, 2H), 7.56–7.50 (m, 2H), 7.41–7.32 (m, 5H), 7.24–7.15 (m, 6H), 7.02–6.97 (m, 2H), 1.82 (s, 6H)

¹³C NMR (100 MHz, CD₂Cl₂): δ 174.6, 172.0, 152.6, 148.2, 146.2, 140.9, 134.6, 131.4 (2C), 130.2 (4C), 130.0 (2C), 127.6 (2C), 127.2, 126.8 (4C), 125.9 (2C), 122.8, 120.2 (2C), 114.3, 113.5, 112.6, 94.9, 57.6, 28.0 (2C)

HR-MS (ESI-QTOF) m/z: [M+H]⁺ Calcd for C₃₅H₂₈N₃O₃S: 570.1846, found: 570.1840

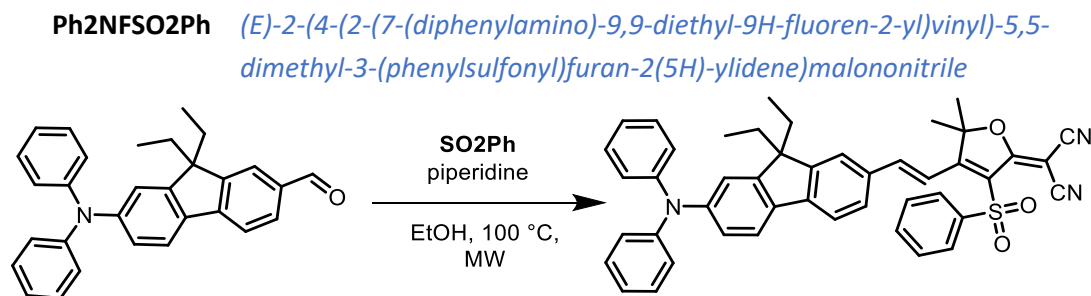


General procedure A: **Ph2NFSPh** (0.31 mmol) and **SPh** (0.28 mmol) were heated 40 minutes at 100 °C in the microwave oven and gave after filtration 180 mg of a dark red powder. This powder was recrystallized in absolute ethanol to give 120 mg of pure compound (63 %).

¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ 7.68–7.53 (m, 3H), 7.48–7.21 (m, 12H), 7.15–6.97 (m, 8H), 2.04–1.87 (m, 4H), 1.87 (s, 6H), 0.32 (t, *J* = 7.3 Hz, 6H)

¹³C NMR (100 MHz, CD₂Cl₂): δ 181.0, 171.4, 152.6, 151.2, 148.9, 148.1 (2C), 145.5, 144.0, 135.3, 134.7, 133.4, 129.9 (2C), 129.6 (4C), 128.6, 127.9 (2C), 127.3, 124.7 (4C), 123.4 (2C), 123.3, 122.6, 121.5, 119.9, 119.2, 118.7, 116.0, 114.0, 113.1, 96.5, 56.6, 56.2, 32.8 (2C), 27.2 (2C), 8.6 (2C)

HR-MS (ESI-QTOF) m/z: [M-H]⁻ Calcd for C₄₆H₃₈N₃OS: 680.2741, found: 680.2722



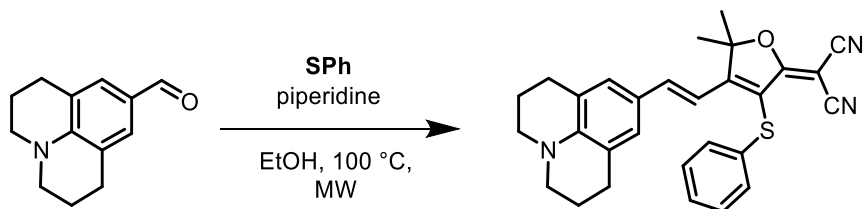
General procedure A: **Ph2NFSPh** (0.35 mmol) and **SO2Ph** (0.32 mmol) were heated 40 minutes at 100 °C in the microwave oven and gave after filtration 150 mg of a black powder. This powder was recrystallized in absolute ethanol to give 125 mg of pure compound (55 %).

¹H NMR (300 MHz, CD₂Cl₂): δ 8.39 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 8.07–7.99 (m, 2H), 7.75–7.53 (m, 7H), 7.51 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 7.34–7.24 (m, 4H), 7.17–7.00 (m, 8H), 2.08–1.89 (m, 4H), 1.88 (s, 6H), 0.37 (t, *J* = 7.3 Hz, 6H)

¹³C NMR (100 MHz, CD₂Cl₂): δ 174.5, 171.8, 153.1, 151.4, 149.5, 149.1, 148.0 (2C), 147.1, 140.6, 134.8, 134.7, 133.1, 130.0 (2C), 129.7 (4C), 129.4, 127.7 (2C), 125.0 (4C), 124.4, 124.2, 123.7 (2C), 123.1, 121.9, 120.2, 118.3, 114.5, 114.0, 113.2, 95.2, 58.5, 56.6, 32.8 (2C), 28.0 (2C), 8.7 (2C)

HR-MS (ESI-QTOF) m/z : $[M+H]^+$ Calcd for $C_{46}H_{40}N_3O_3S$: 714.2785, found 714.2773

JulSPh *(E)-2-(4-(2-(1,2,3,5,6,7-hexahydropyrido[3,2,1-ij]quinolin-9-yl)vinyl)-5,5-dimethyl-3-(phenylthio)furan-2(5H)-ylidene)malononitrile*



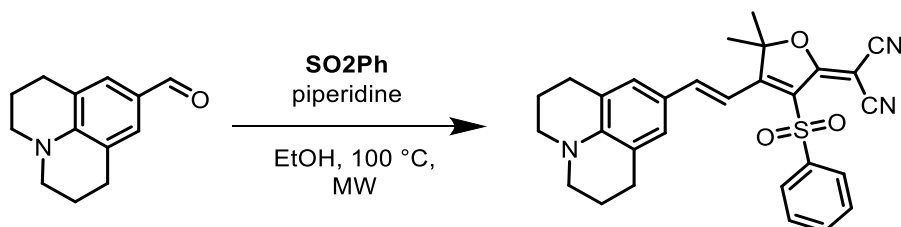
General procedure A: **Jul** (0.39 mmol) and **SPh** (0.35 mmol) were heated 30 minutes at 100 °C in the microwave oven and gave after filtration 70 mg of a green powder. This powder was recrystallized in a 9:1 absolute ethanol/DCM mixture to give 60 mg of pure compound (37 %).

1H NMR (300 MHz, CD_2Cl_2): δ 7.35–7.28 (m, 3H), 7.25–7.15 (m, 4H), 7.08–7.00 (m, 3H), 3.28 (t, J = 5.8 Hz, 4H), 2.71 (t, J = 6.2 Hz, 4H), 1.93 (quin, J = 6.0 Hz, 4H), 1.80 (s, 6H)

^{13}C NMR (100 MHz, CD_2Cl_2): δ 181.4, 173.0, 146.8, 145.2, 135.7, 129.8 (2C), 128.7, 127.4 (2C), 126.8, 122.0, 121.8, 114.9, 113.9, 113.5, 110.1, 95.8, 50.4 (2C), 28.0 (2C), 27.3 (2C), 21.7 (2C)

HR-MS (ESI-QTOF) m/z : $[M+Cl]^-$ Calcd for $C_{29}H_{27}ClN_3OS$: 500.1569, found: 500.1559

JulSO2Ph *(E)-2-(4-(2-(1,2,3,5,6,7-hexahydropyrido[3,2,1-ij]quinolin-9-yl)vinyl)-5,5-dimethyl-3-(phenylsulfonyl)furan-2(5H)-ylidene)malononitrile*



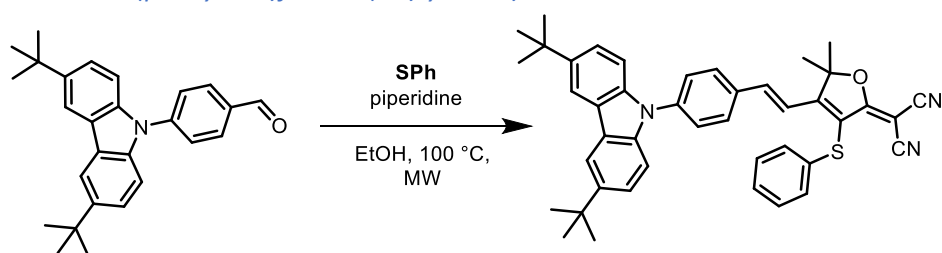
General procedure A: **Jul** (0.35 mmol) and **SO2Ph** (0.32 mmol) were heated 30 minutes at 100 °C in the microwave oven and gave after filtration 65 mg of green/gold needles. This powder was recrystallized in DCM to give 48 mg of pure compound (30 %).

1H NMR (300 MHz, CD_2Cl_2): δ 8.03–7.97 (m, 2H), 7.95 (d, J = 16.0 HZ, 1H), 7.70–7.62 (m, 1H), 7.61–7.55 (m, 2H), 7.29 (d, J = 16.0 HZ, 1H), 7.17 (s, 2H), 3.37 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 2.76 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 1.97 (quin, J = 6.0 Hz, 2H), 1.78 (s, 6H)

^{13}C NMR (100 MHz, CD_2Cl_2): δ 174.9, 171.9, 150.2, 148.9, 141.9, 134.0, 130.7, 129.7 (2C), 127.3 (2C), 122.5, 122.3, 117.4, 115.3, 114.4, 108.2, 94.1, 50.8 (2C), 28.2 (2C), 28.0 (2C), 21.5 (2C)

HR-MS (ESI-QTOF) m/z : $[M+H]^+$ Calcd for $C_{29}H_{28}N_3O_3S$: 498.1846, found: 498.1826

tBuCbzSPh *(E)-2-(4-(4-(3,6-di-tert-butyl-9H-carbazol-9-yl)styryl)-5,5-dimethyl-3-(phenylthio)furan-2(5H)-ylidene)malononitrile*



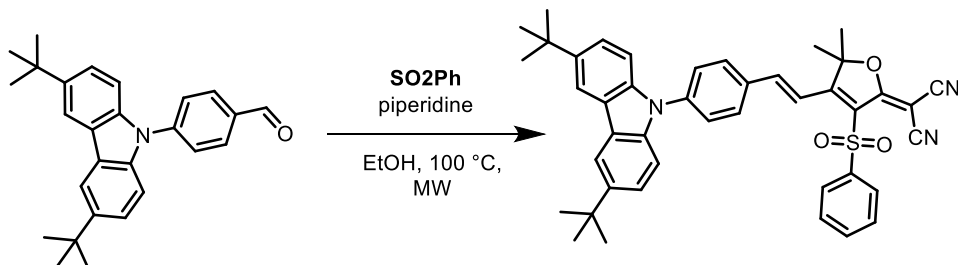
General procedure A: **tBuCbz** (0.39 mmol) and **SPh** (0.35 mmol) were heated 30 minutes at 100 °C in the microwave oven and gave after filtration 215 mg of a red powder. This powder was recrystallized in absolute ethanol to give 175 mg of pure compound (77 %).

¹H NMR (300 MHz, CD₂Cl₂): δ 8.15 (d, *J* = 1.5 Hz, 2H), 7.82 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.67 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.53–7.33 (m, 8H), 7.32–7.22 (m, 3H), 1.89 (s, 6H), 1.45 (s, 18H)

¹³C NMR (100 MHz, CD₂Cl₂): δ 180.9, 170.9, 144.1 (2C), 142.0, 141.0, 138.9 (2C), 134.4, 133.6, 130.0 (2C), 130.0 (2C), 128.0 (2C), 127.5, 126.9 (2C), 124.2 (2C), 124.1 (2C), 120.8, 117.7, 116.8 (2C), 113.8, 112.8, 109.6 (2C), 96.6, 57.0, 35.0 (2C), 32.1 (6C), 27.1 (2C)

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M-H][−] Calcd for C₄₃H₄₀N₃OS: 646.2898, found: 646.2881

tBuCbzSO2Ph *(E)-2-(4-(4-(3,6-di-tert-butyl-9H-carbazol-9-yl)styryl)-5,5-dimethyl-3-(phenylsulfonyl)furan-2(5H)-ylidene)malononitrile*



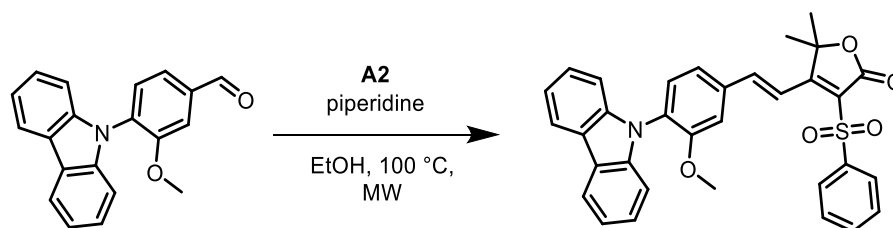
General procedure A: **tBuCbz** (0.35 mmol) and **SO2Ph** (0.32 mmol) were heated 40 minutes at 100 °C in the microwave oven and gave after filtration 135 mg of a dark red powder (62 %).

¹H NMR (300 MHz, CD₂Cl₂): δ 8.48 (d, *J* = 16.7 Hz, 1H), 8.19–8.14 (m, 2H), 8.07–8.03 (m, 2H), 7.96–7.92 (m, 2H), 7.80–7.70 (m, 3H), 7.68–7.62 (m, 2H), 7.55–7.46 (m, 5H), 1.90 (s, 6H), 1.46 (s, 18H)

¹³C NMR (100 MHz, CD₂Cl₂): δ 174.3, 171.3, 146.8, 144.4 (2C), 142.3, 140.3, 138.8 (2C), 134.9, 133.0, 131.0 (2C), 130.1 (2C), 127.8 (2C), 126.9 (2C), 126.1, 124.4 (2C), 124.4 (2C), 116.9 (2C), 116.2, 113.7, 113.0, 109.8 (2C), 95.4, 59.4, 35.1 (2C), 32.1 (6C), 27.9 (2C)

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M-H][−] Calcd for C₄₃H₄₀N₃O₃S: 678.2796, found 678.2770

CbzOMeA2 *(E)-4-(4-(9H-carbazol-9-yl)-3-methoxystyryl)-5,5-dimethyl-3-(phenylsulfonyl)furan-2(5H)-one*



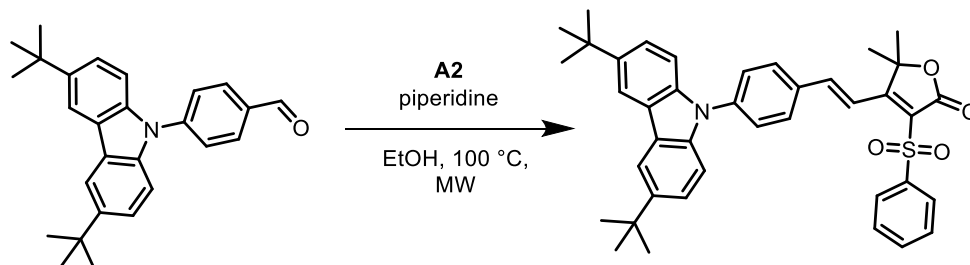
General procedure A: **CbzOMe** (0.41 mmol) and **A2** (0.38 mmol) were heated 40 minutes at 100 °C in the microwave oven and gave after filtration 200 mg of a yellow powder. This powder was recrystallized in ethanol to give 190 mg of pure compound (91 %).

¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ 8.41 (d, *J* = 16.9 Hz, 1H), 8.18–8.06 (m, 4H), 7.73–7.65 (m, 1H), 7.63–7.50 (m, 4H), 7.48–7.35 (m, 4H), 7.33–7.25 (m, 2H), 7.17 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 3.83 (s, 3 H), 1.78 (s, 6H)

¹³C NMR (100 MHz, CD₂Cl₂): δ 170.9, 165.0, 156.5, 144.0, 141.2, 140.0, 136.6, 134.7, 130.6, 129.5 (2C), 129.2, 129.0 (2C), 128.9, 126.6, 126.3 (2C), 124.8, 123.7, 121.8, 120.6 (2C), 120.4 (2C), 117.3, 112.7, 110.6 (2C), 85.7, 58.6, 27.4 (2C)

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M-H]⁻ Calcd for C₃₃H₂₆NO₅S: 548.1537, found: 548.1529

tBuCbzA2 *(E)-4-(4-(3,6-di-tert-butyl-9H-carbazol-9-yl)styryl)-5,5-dimethyl-3-(phenylsulfonyl)furan-2(5H)-one*



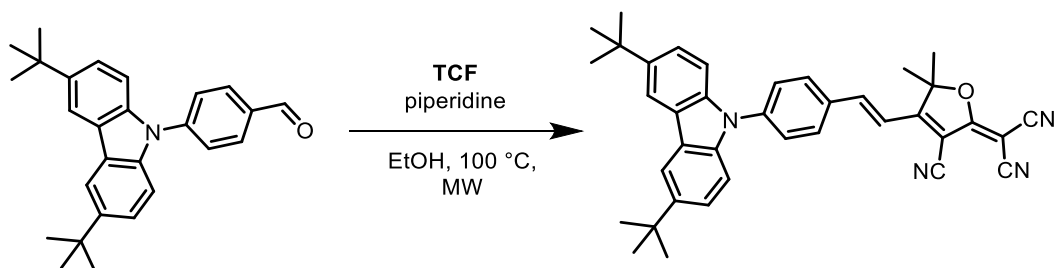
General procedure A: **tBuCbz** (0.20 mmol) and **A2** (0.19 mmol) were heated 40 minutes at 100 °C in the microwave oven and gave after filtration 90 mg of a yellow powder (75 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.41 (d, *J* = 16.9 Hz, 1H), 8.20–8.12 (m, 4H), 7.89 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.72 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.70–7.64 (m, 1H), 7.62–7.54 (m, 2H), 7.53–7.41 (m, 4H), 7.33(d, *J* = 16.9 Hz, 1H), 1.78 (s, 6H), 1.48 (s, 18H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 170.5, 164.8, 143.9 (2C), 143.6, 141.3, 139.7, 138.7, 134.4, 133.0, 130.2 (2C), 129.3 (2C), 128.9 (2C), 126.8 (2C), 124.2, 124.1 (2C), 124.0 (2C), 116.6, 116.2, 109.4, 85.3, 34.9 (2C), 32.1 (6C), 27.5 (2C)

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M+H]⁺ Calcd for C₄₀H₄₂NO₄S: 632.2829, found: 632.2802

tBuCbzTCF *(E)-2-(3-cyano-4-(4-(3,6-di-tert-butyl-9H-carbazol-9-yl)styryl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene)malononitrile*



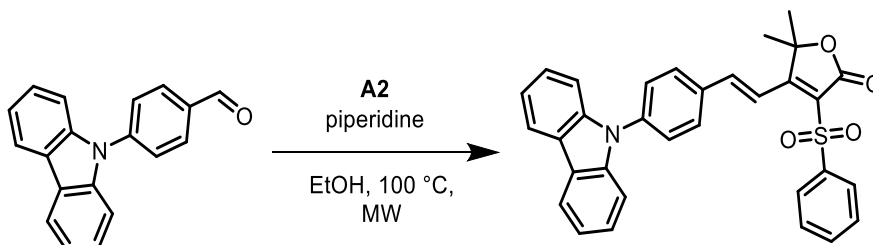
Modified general procedure A: **tBuCbz** (0.27 mmol) and **TCF** (0.25 mmol) were heated 30 minutes at 100 °C in a microwave oven. As no precipitation occurred, the ethanol was evaporated and the crude was first filtrated through a short silica gel chromatography with DCM as eluent. The red fraction was then recrystallized in absolute ethanol to give 55 mg of pure compound (39 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.14 (s, 2H), 7.90–7.83 (m, 2H), 7.79–7.70 (m, 3H), 7.53–7.40 (m, 4H), 7.09 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 1.85 (s, 6H), 1.47 (s, 18H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 175.3, 173.6, 146.3, 144.3 (2C), 142.7, 138.4, 131.6, 130.8 (2C), 126.7 (2C), 124.3 (2C), 124.1 (2C), 116.7 (2C), 114.9, 111.7, 111.0, 110.4, 109.5 (2C), 100.2, 97.8, 58.2, 35.0 (2C), 32.1 (6C), 26.7 (2C)

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M+H]⁺ Calcd for C₃₈H₃₇N₄O: 565.2962, found: 565.2947

CbzA2 *(E)-4-(4-(9H-carbazol-9-yl)styryl)-5,5-dimethyl-3-(phenylsulfonyl)furan-2(5H)-one*



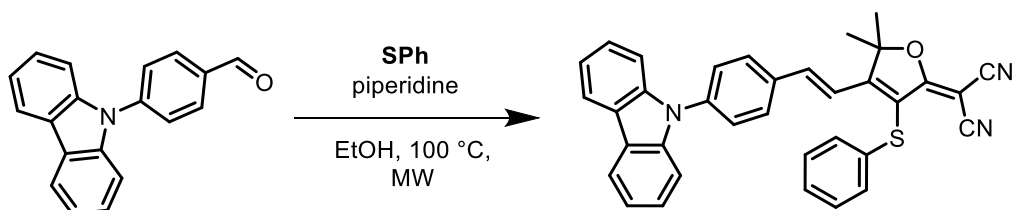
General procedure A: **Cbz** (0.41 mmol) and **A2** (0.38 mmol) were heated 30 minutes at 100 °C in the microwave oven gave and after filtration 160 mg of a yellow powder. This powder was recrystallized in ethanol to give 155 mg of pure compound (78 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.44 (d, *J* = 16.9 Hz, 1H), 8.20–8.13 (m, 4H), 7.92 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.73 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.70–7.64 (m, 1H), 7.62–7.54 (m, 2H), 7.53–7.41 (m, 4H), 7.38–7.30 (m, 3H), 1.78 (s, 6H)

¹³C NMR (100 MHz, CD₂Cl₂): δ 170.3, 164.8, 143.4, 140.7, 140.4, 139.7, 134.4, 133.6, 130.2 (2C), 129.3 (2C), 128.9 (2C), 127.4 (2C), 126.4 (2C), 124.5, 124.0, 120.8 (2C), 120.7 (2C), 116.6, 109.9 (2C), 85.3, 27.5 (2C)

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M-H]⁻ Calcd for C₃₂H₂₄NO₄S: 518.1432, found: 518.1422

CbzSPh *(E)-2-(4-(4-(9H-carbazol-9-yl)styryl)-5,5-dimethyl-3-(phenylthio)furan-2(5H)-ylidene)malononitrile*



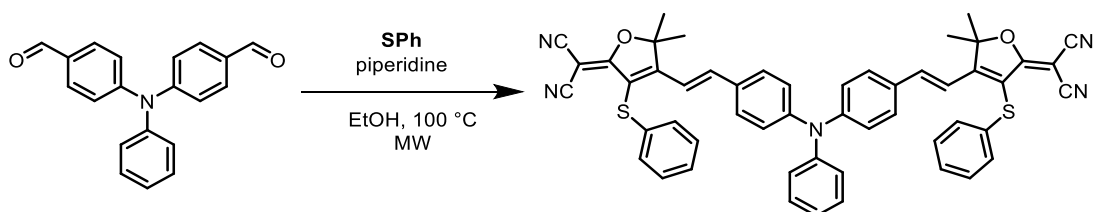
General procedure A: **Cbz** (0.19 mmol) and **SPh** (0.18 mmol) were heated 40 minutes at 100 °C in the microwave oven and gave after filtration 75 mg of an orange powder (79 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.15 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.80 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.68 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.54–7.21 (m, 13H), 1.89 (s, 6H)

¹³C NMR (100 MHz, CD₂Cl₂): δ 180.4, 169.9, 141.3, 140.4, 140.4, 133.8, 133.7, 129.9 (2C), 129.7 (2C), 128.0 (2C), 127.5, 127.4 (2C), 126.3 (2C), 124.0, 121.4, 120.8 (2C), 120.7 (2C), 117.9, 113.4, 112.4, 109.8 (2C), 96.0, 57.5, 27.2 (2C)

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M+H]⁺ Calcd for C₃₅H₂₆N₃OS: 536.1791, found: 536.1780

PhNSPh2 *2,2'-(4,4'-((1E,1'E)-((phenylazanediy)bis(4,1-phenylene))bis(ethene-2,1-diyl))bis(5,5-dimethyl-3-(phenylthio)furan-4(5H)-yl-2(5H)-ylidene))dimalononitrile*



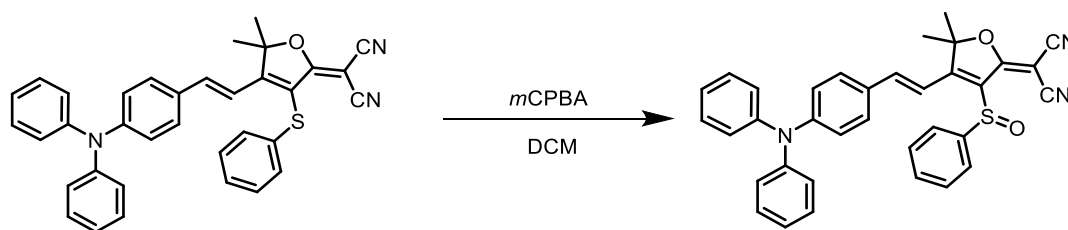
General procedure A: 4,4'-(phenylazanediy)dibenzaldehyde (0.11 mmol) and **SPh** (0.35 mmol, 3 eq) were heated 1 hour at 100 °C in the microwave oven and gave after filtration a red powder. This powder was recrystallized in ethanol to give 155 mg of pure compound (81 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.63–6.90 (m, 27H), 1.83 (s, 12H)

¹³C NMR (100 MHz, CD₂Cl₂): δ 180.5, 170.5, 149.4, 145.8, 141.7, 134.1, 130.2, 130.1, 129.8, 129.7, 127.8, 127.3, 126.6, 126.0, 123.5, 119.7, 115.7, 113.6, 112.6, 95.7, 56.7, 27.2

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M+H]⁺ Calcd for C₅₂H₄₀N₅O₂S₂: 830.2618, found: 830.2616

Ph3NSOPh *(E)-2-(4-(4-(diphenylamino)styryl)-5,5-dimethyl-3-(phenylsulfinyl)furan-2(5H)-ylidene)malononitrile*



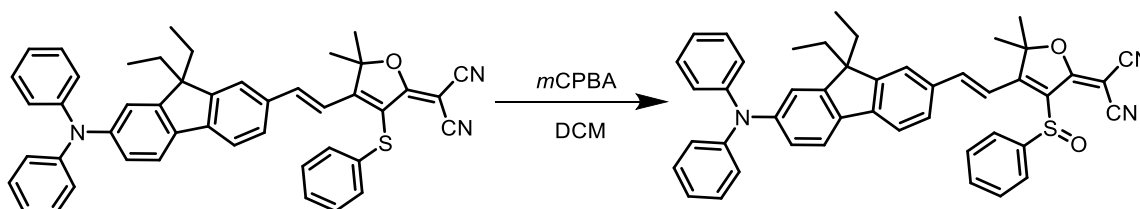
Ph3NSPh (40 mg, 0.088 mmol) was dissolved in DCM (10 mL) before addition of *m*CPBA (50-55 %, 30 mg, $\approx$ 0.09 mmol). The reaction was stirred for 1 hour at TA. After complete consumption of **Ph3NSPh**, followed by TLC (DCM/EtOAc 99:1), the solution was concentrated under vacuum. The crude was first filtrated through a short silica gel chromatography with DCM to DCM/EtOAc 99:1 as eluent gradient and the purple fraction was then recrystallized in absolute ethanol to give 36 mg of pure compound (74 %).

^1H NMR (400 MHz, CD_2Cl_2): δ 7.84 (d, J = 16.6 Hz, 1H), 7.79–7.73 (m, 2H), 7.59–7.48 (m, 3H), 7.40–7.31 (m, 6H), 7.21–7.13 (m, 6H), 7.10 (d, J = 16.6 Hz, 1H), 6.96 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 1.80 (s, 3H), 1.69 (s, 3H)

^{13}C NMR (100 MHz, CD_2Cl_2): δ 177.6, 170.0, 151.9, 146.5 (2C), 145.3, 143.9, 131.7, 130.7, 130.2, 130.1 (4C), 127.6, 127.2, 126.8, 126.6 (4C), 125.5 (2C), 125.2 (2C), 120.6 (2C), 114.0, 113.6, 112.8, 96.1, 55.3, 27.4, 27.3

HR-MS (ESI-QTOF) m/z : $[\text{M}-\text{H}]^-$ Calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$: 552.1751, found: 552.1745

Ph2NFSOPh *(E)-2-(4-(2-(7-(diphenylamino)-9,9-diethyl-9H-fluoren-2-yl)vinyl)-5,5-dimethyl-3-(phenylsulfinyl)furan-2(5H)-ylidene)malononitrile*

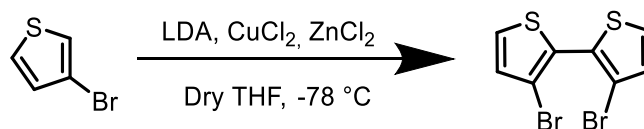


Ph2NFSPh (50 mg, 0.07 mmol) was dissolved in DCM (10 mL) before addition of *m*CPBA (50-55 %, 35 mg, $\approx$ 0.11 mmol). The reaction was stirred for 1 hour at TA. After complete consumption of **Ph2NFSPh**, followed by TLC (DCM/EtOAc 99:1), the solution was concentrated. The crude was first filtrated through a short silica gel chromatography with DCM to DCM/EtOAc 99:1 as eluent gradient and the purple fraction was then recrystallized in absolute ethanol to give 37 mg of pure compound (72 %).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8.04 (d, J = 16.7 Hz, 1H), 7.85–7.78 (m, 2H), 7.70–7.50 (m, 6H), 7.44 (s, 1H), 7.34–7.20 (m, 5H), 7.16–7.00 (m, 8H), 2.10–1.86 (m, 4H), 1.86 (s, 3H), 1.75 (s, 3H), 0.42–0.30 (m, 6H)

^{13}C NMR (100 MHz, CD_2Cl_2): δ 177.4, 169.8, 152.9, 151.3, 149.3, 148.1 (2C), 146.2, 146.1, 143.8, 135.1, 133.3, 131.8, 130.1 (2C), 129.7 (4C), 129.1, 128.8, 125.2 (2C), 124.9 (4C), 123.6 (2C), 123.2, 123.2, 121.7, 120.0, 118.5, 114.5, 113.8, 113.3, 96.3, 56.5, 32.9 (2C), 27.3 (2C), 8.7 (2C)

HR-MS (ESI-QTOF) m/z : $[\text{M}-\text{H}]^-$ Calcd for $\text{C}_{46}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$: 696.2690, found: 696.2679

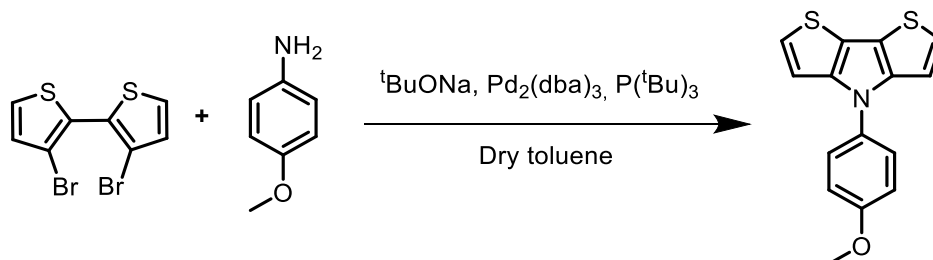
II-10 *3-3'-dibromo-2-2'-bithiophene*

3-bromothiophene (6 mL, 61 mmol) was dissolved into dry THF (100 mL) under argon. A lithium diisopropylamine solution, freshly prepared from diisopropylamine (8.6 mL, 61 mmol), 2.5 M *n*BuLi (24 mL, 61 mmol) in anhydrous THF (50 mL), was added dropwise to the solution at -78 °C. After stirring for 1 hour, ZnCl₂ (8.3 g, 61 mmol) and CuCl₂ (8 g, 61 mmol) were added to the mixture. The solution was let warm up to RT and was then stirred for 6 hours. The mixture was then quenched with a 1 M HCl solution (50 mL). DCM was added and the organic phase was separated, washed with water, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated. The crude was purified by column chromatography over silica gel with pentane as eluent to give 7.2 g of a pale yellow solid (73 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.41 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H), 7.08 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 131.0 (2C), 129.0 (2C), 127.6 (2C), 112.8 (2C)

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M+]⁺ Calcd for C₈H₄Br₂S₂: 321.8116, found: 321.8102

II-11 *4-(4-methoxyphenyl)-4H-dithieno[3,2-b:2',3'-d]pyrrole*

In a 250 mL Schlenk, **II-10** (1 g, 3.1 mmol) and *p*-anisidine (0.53 g, 4.3 mmol) were dissolved in dry toluene (50 mL) under argon. ^{*t*}BuONa (1.04 g, 9.24 mmol), Pd(dba)₃ (70 mg, 0.31 mmol) and P(^{*t*}Bu)₃ (1M in toluene, 0.31 mL, 0.31 mmol) were added and the mixture was heated to reflux overnight. After cooling down, the solution was concentrated and purified by column chromatography over silica gel with a 3:1 PE/DCM mixture as eluent to give 0.5 g of a white solid (57 %).

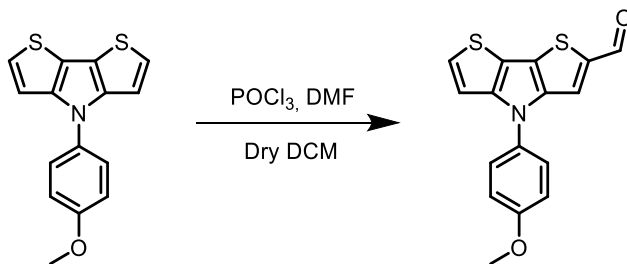
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.49 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.16 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 7.09 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 7.05 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 3.88 (s, 3H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 158.0, 144.5 (2C), 133.1, 124.5 (2C), 123.4 (2C), 116.4 (2C), 115.0 (2C), 112.1 (2C), 55.7

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M+H]⁺ Calcd for C₁₅H₁₂NOS₂: 286.0355, found: 286.0356

II-12

4-(4-methoxyphenyl)-4H-dithieno[3,2-b:2',3'-d]pyrrole-2-carbaldehyde



II-11 (0.5 g, 1.75 mmol) was dissolved into anhydrous DCM (20 mL) under argon. Anhydrous DMF (280 μ L, 3.6 mmol) was added and the mixture was cooled to 0 °C. After dropwise addition of POCl₃ (500 μ L, 5.1 mmol), the mixture was stirred at 0 °C for 1 hour then at 35 °C overnight. The reaction was quenched with NaOH 1 M and the organic phase was separated, washed with water and brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated. The crude was purified by column chromatography over silica gel with DCM as eluent to give 360 mg of yellowish solid (66 %)

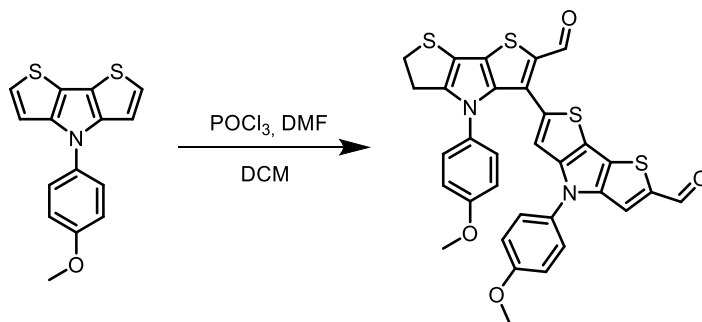
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9.83 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.48 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.40 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 7.12–7.05 (m, 3H), 3.90 (s, 3H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 183.1, 158.7, 148.7, 144.1, 140.7, 131.9, 128.8, 124.8 (2C), 124.5, 120.7, 116.4, 115.3 (2C), 112.0, 55.7

HR-MS (ESI-QTOF) m/z : [M+H]⁺ Calcd for C₁₆H₁₂NO₂S₂: 314.0304, found: 314.0290

II-13

4,4'-bis(4-methoxyphenyl)-5',6'-dihydro-4H,4'H-[2,3'-bidithieno[3,2-b:2',3'-d]pyrrole]-2',6'-dicarbaldehyde



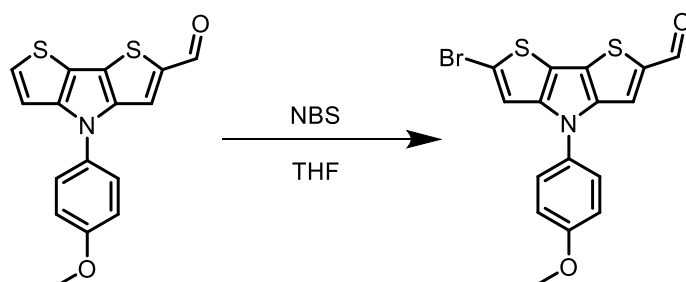
Secondary product formed during the synthesis of **II-12**. Bown solid (160 mg, 29 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9.90 (s, 1H), 9.86 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.23 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.03 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.95 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 6.57–6.48 (m, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.76 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 3.49 (s, 3H), 3.06 (t, J = 7.8 Hz, 2H),

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 183.3, 183.1, 159.1, 158.8, 147.3, 146.9, 143.7, 141.4, 141.3, 137.5, 133.1, 131.3, 130.3, 128.0, 126.8 (2C), 124.7 (2C), 124.6, 123.7, 120.3, 117.5, 115.2 (2C), 114.9, 113.8 (2C), 113.1, 55.8, 55.5, 37.5, 28.6

II-14

6-bromo-4-(4-methoxyphenyl)-4H-dithieno[3,2-b:2',3'-d]pyrrole-2-carbaldehyde



II-12 (170 mg, 0.54 mmol) was dissolved into THF (10 mL). The mixture was cooled to 0 °C and NBS (103 mg, 0.58 mmol) was added. The reaction was let warm up to RT and was stirred for 3 hours. DCM and water were added and the phases were separated. The organic phase was washed with a saturated solution of Na₂CO₃ then two times with water, dried over Na₂SO₄ and concentrated to give 200 mg of an off-white solid (94 %).

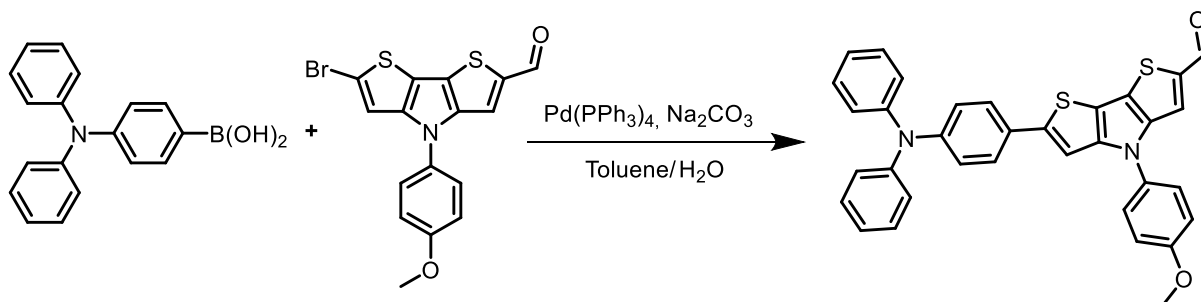
¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9.85 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.44 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.13 (s, 1H), 7.08 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 3.90 (s, 3H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 183.2, 159.0, 146.3, 143.2, 141.0, 131.4, 125.0 (2C), 124.1, 120.5, 116.4, 116.0, 115.4 (2C), 115.4, 55.8

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M+H]⁺ Calcd for C₁₆H₁₁BrNO₂S₂: 391.9409, found: 391.9393

BTN

6-(4-(diphenylamino)phenyl)-4-(4-methoxyphenyl)-4H-dithieno[3,2-b:2',3'-d]pyrrole-2-carbaldehyde



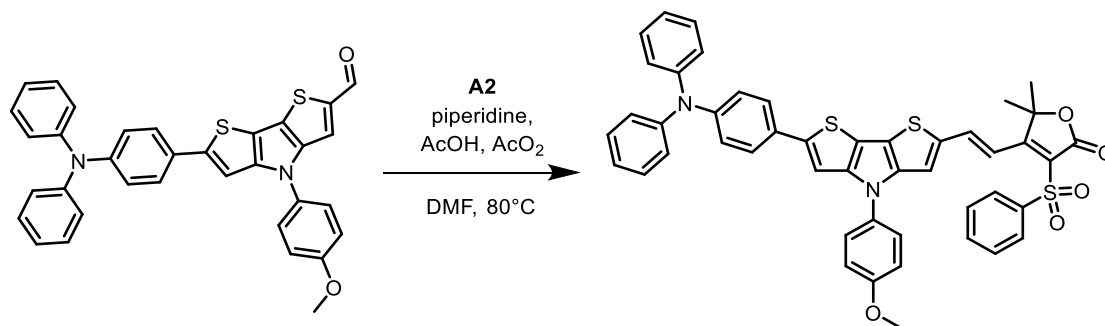
Under argon atmosphere, 4-(diphenylamino)phenylboronic acid (81 mg, 0.28 mmol) and **II-14** (100 mg, 0.25 mmol) are dissolved in toluene (3 mL). Argon was bubbled in the solution for 20 minutes. Pd(PPh₃)₄ (20 mg, 0.018 mmol) and a 1 M sodium carbonate solution (3 mL) were added to the solution. The mixture was refluxed overnight. After cooling, DCM was added and the solution filtered. The phases were separated and the organic phase was washed three times with water, dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated to give an orange solid. Purification by column chromatography over silica gel with DCM/EtOAc 199:1 as eluent gave 140 mg of a yellow solid (98 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9.84 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.53–7.45 (m, 4H), 7.33–7.26 (m, 4H), 7.20 (s, 1H), 7.16–7.02 (m, 10H), 3.91 (s, 3H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 182.9, 158.8, 149.2, 148.2, 148.0, 147.4 (2C), 143.6, 140.3, 131.8, 129.5 (4C), 128.4, 126.7 (2C), 125.0, 124.9 (4C), 123.6 (2C), 123.3 (2C), 120.4, 115.4 (2C), 114.9, 106.6, 55.8

HR-MS (ESI-QTOF) m/z: [M+H]⁺ Calcd for C₃₄H₂₅N₂O₂S₂: 557.1352, found: 557.1335

BTNA2 *(E)-4-(2-(6-(4-(diphenylamino)phenyl)-4-(4-methoxyphenyl)-4H-dithieno[3,2-b:2',3'-d]pyrrol-2-yl)vinyl)-5,5-dimethyl-3-(phenylsulfonyl)furan-2(5H)-one*



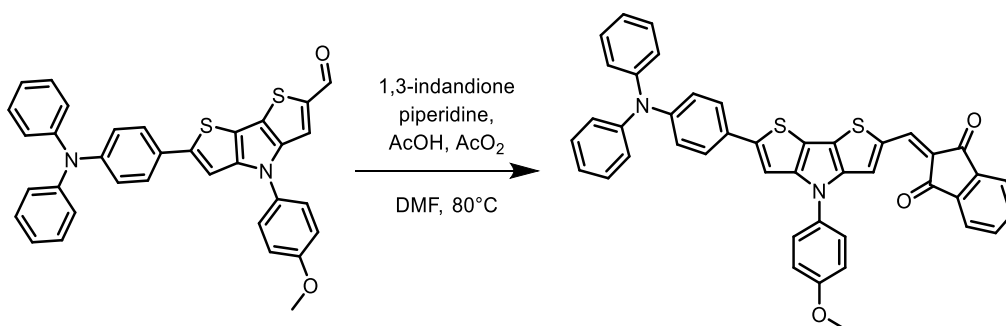
BTN (50 mg, 0.09 mmol) and **A2** (36 mg, 0.14 mmol) were dissolved in DMF (4 mL). Piperidine, acetic acid, acetic anhydride were added (one drop each) and the reaction was heated to 80 °C overnight. The reaction was followed by TLC until the complete disappearing of the aldehyde which needed addition of another 10 mg of acceptor (0.04 mmol). After cooling back to RT, the mixture was poured into water and filtered. The solid was washed with water and cold ethanol then was redissolved in a minimum of DCM and crystallized in ethanol to give 60 mg of a black powder (83 %).

¹H NMR (300 MHz, CD₂Cl₂): δ 8.10–8.04 (m, 2H), 7.97 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 7.70–7.62 (m, 1H), 7.61–7.48 (m, 6H), 7.43 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.34–7.23 (m, 5H), 7.17–7.02 (m, 10H), 3.89 (s, 3H), 1.68 (s, 6H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 170.8, 164.4, 159.1, 148.9, 148.5, 147.6 (2C), 147.5, 145.0, 140.8, 139.2, 138.8, 134.2, 132.0, 129.8 (4C), 129.4 (2C), 128.7, 128.6 (2C), 126.7 (2C), 125.2 (4C), 125.2 (2C), 123.9 (2C), 123.4 (2C), 122.4, 120.3, 117.5, 115.5 (2C), 112.1, 107.0, 85.1, 56.1, 27.5 (2C)

HR-MS (ESI-QTOF) m/z: [M+H]⁺ Calcd for C₄₇H₃₇N₂O₅S₃: 805.1859, found: 805.1842

BTNI *2-((6-(4-(diphenylamino)phenyl)-4-(4-methoxyphenyl)-4H-dithieno[3,2-b:2',3'-d]pyrrol-2-yl)methylene)-1H-indene-1,3(2H)-dione*



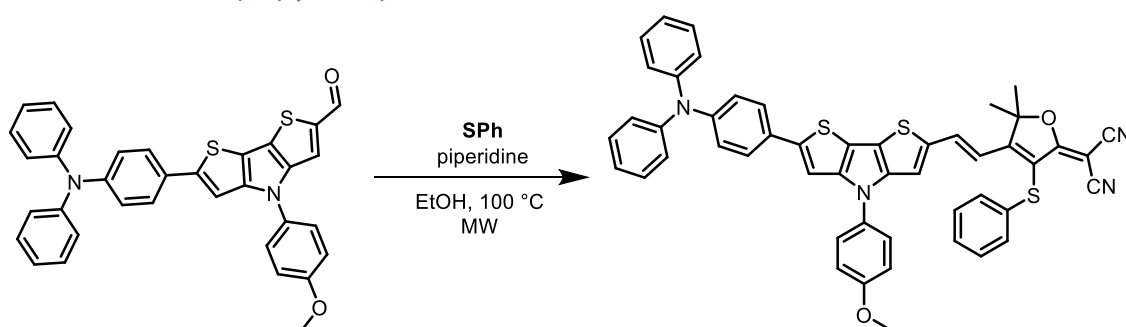
BTN (50 mg, 0.09 mmol) and 1,3-indandione (16 mg, 0.11 mmol) were dissolved in DMF (4 mL). Piperidine, acetic acid, acetic anhydride were added (one drop each) and the reaction was heated to 80 °C overnight. The reaction was followed by TLC until the complete disappearing of the aldehyde which needed addition of another 10 mg of acceptor (0.06 mmol). After cooling back to RT, the mixture was poured into water and filtered. The solid was washed with water and cold ethanol then was redissolved in a minimum of DCM and crystallized in ethanol to give 30 mg of a green powder (49 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.51–7.42 (m, 5H), 7.36–7.20 (m, 4H), 7.17–7.02 (m, 11H), 3.90 (s, 3H), 1.79 (s, 6H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 190.7, 189.9, 159.2, 151.0, 150.0, 148.8, 147.6 (2C), 145.6, 142.5, 140.7, 137.4, 136.1, 134.9, 134.7, 132.0, 129.8 (4C), 128.4, 126.9 (2C), 125.4 (4C), 125.2, 125.1 (2C), 124.0 (2C), 123.9, 123.4, 123.1 (2C), 122.7, 122.7, 122.5, 115.6 (2 C), 115.4, 106.9, 56.1

HR-MS (ESI-QTOF) m/z: [M+H]⁺ Calcd for C₄₃H₂₉N₂O₃S₂: 685.1614, found: 685.1583

BTNSPh *(E)-2-(4-(2-(6-(4-(diphenylamino)phenyl)-4-(4-methoxyphenyl)-4H-dithieno[3,2-b:2',3'-d]pyrrol-2-yl)vinyl)-5,5-dimethyl-3-(phenylthio)furan-2(5H)-ylidene)malononitrile*



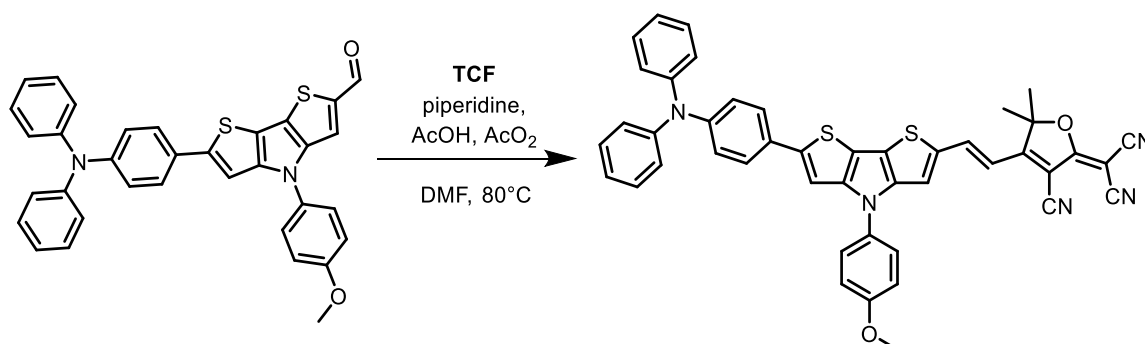
BTN (50 mg, 0.09 mmol) and **SPH** (25 mg, 0.09 mmol) in ethanol (3 mL) were refluxed for two days. After cooling down, 60 mg of a black powder was filtered. This powder was a mixture between the product and some leftover aldehyde. In a 20 mL microwave tube, the black powder and 10 mg of the acceptor **SPH** were put in suspension in ethanol (10 mL) and heated for one hour at 100 °C under microwave irradiation. The product was isolated by filtration after cooling down and washed with cold ethanol to give 50 mg of a black powder (68 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.51–7.42 (m, 5H), 7.36–7.20 (m, 4H), 7.17–7.02 (m, 11H), 3.90 (s, 3H), 1.79 (s, 6H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 180.6, 170.1, 148.5; 148.2, 147.4 (2C), 144.7, 138.7, 136.7, 134.5, 131.8, 129.7 (2C), 129.5 (4C), 128.4, 128.0 (2C), 127.2, 126.6 (2C), 125.0 (2C), 125.0 (4C), 123.7 (2C), 123.2 (2C), 121.9, 117.3, 116.4, 115.3 (2C), 114.2, 113.2, 113.1, 106.6, 95.2, 55.8, 27.2 (2C)

HR-MS (ESI-QTOF) m/z: [M+]⁺ Calcd for C₅₀H₃₆N₄O₂S₃: 820.1995, found: 820.1964

BTNTCF *(E)-2-(3-cyano-4-(2-(6-(4-(diphenylamino)phenyl)-4-(4-methoxyphenyl)-4H-dithieno[3,2-b:2',3'-d]pyrrol-2-yl)vinyl)-5,5-dimethylfuran-2(5H)-ylidene)malononitrile*



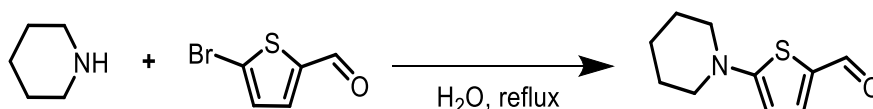
BTN (40 mg, 0.08 mmol) and **TCF** (16 mg, 0.09 mmol) were dissolved in DMF (4 mL). Piperidine, acetic acid and acetic anhydride were added (one drop each) and the reaction was heated to 80 °C overnight. The reaction was followed by TLC until the complete disappearing of the aldehyde. After cooling back to RT, the mixture was poured into water and filtered. The solid was redissolved in a minimum of DCM and crystallized in ethanol to give 12 mg of a black powder (20 %).

¹H NMR (300 MHz, CD₂Cl₂): δ 7.98 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 7.56–7.48 (m, 4H), 7.46 (s, 1H), 7.35–7.26 (m, 4H), 7.23 (s, 1H), 7.16–7.02 (m, 10H), 6.60 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 1.73 (s, 6H)

¹³C NMR (100 MHz, CD₂Cl₂): δ 176.8, 173.2, 159.4, 151.0, 148.9, 147.5 (2C), 146.0, 141.7, 138.1, 131.6, 129.8 (4C), 128.1, 126.9 (2C), 125.7, 125.5 (4C), 125.3 (2C), 124.2 (2C), 123.0 (2C), 119.7, 115.8, 115.6 (2C), 113.1, 112.5, 112.1, 110.3, 106.8, 97.4, 94.5, 56.1, 26.7 (2C)

HR-MS (EI-QTOF) m/z: [M+]⁺ Calcd for C₄₅H₃₁N₅O₂S₂: 737.1914, found: 737.1909

PT *5-(piperidin-1-yl)thiophene-2-carbaldehyde*



5-Bromothiophene-2-carboxaldehyde (1 g, 5.23 mmol) and piperidine (1.34 g, 15.7 mmol) were added to 40 mL of water and the mixture was refluxed overnight. After cooling down, the brown precipitate was filtered and washed 2 times with water. The obtained solid was purified by column

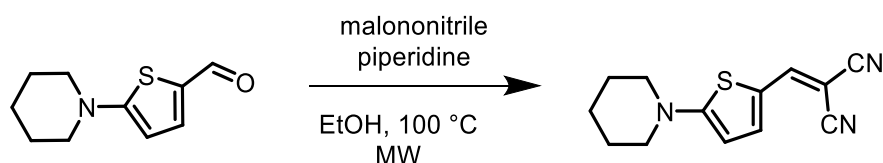
chromatography on silica gel with DCM/EtOAc 9:1 as eluent to obtain 870 mg of product as an off-white solid (85 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9.52 (s, 1H), 7.48 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 6.07 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 3.40–3.30 (m, 4H), 1.79–1.60 (m, 6H)

¹³C NMR (100 MHz, CD₂Cl₂): δ 180.5, 168.6, 140.4, 126.8, 104.1, 51.1 (2C), 25.1 (2C), 23.7

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M+H]⁺ Calcd for C₁₀H₁₄NOS: 196.0791, found: 196.0787

PT-CN *2-((5-(piperidin-1-yl)thiophen-2-yl)methylene)malononitrile*



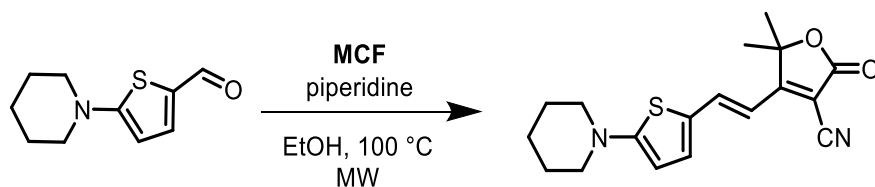
General procedure A: **PT** (200 mg, 1.02 mmol) and malononitrile (62 mg, 0.93 mmol) were heated to 100 °C during 40 minutes with microwave. The orange solid was filtered, washed with cold ethanol to give 150 mg of product (66 %).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.41 (s, 1H), 7.38–7.35 (m, 1H), 6.13 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 3.58–3.41 (m, 4H), 1.84–1.62 (m, 6H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 170.1, 148.6, 144.3, 119.7, 117.2, 116.4, 105.4, 51.6 (2C), 25.2 (2C), 23.5

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M+H]⁺ Calcd for C₁₃H₁₄N₃S: 244.0903, found: 244.0894

PT-MCF *(E)-5,5-dimethyl-2-oxo-4-(2-(5-(piperidin-1-yl)thiophen-2-yl)vinyl)-2,5-dihydrofuran-3-carbonitrile*



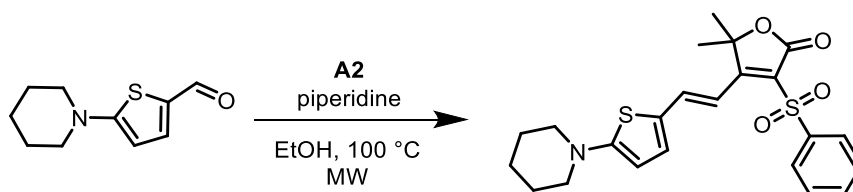
General procedure A: **PT** (200 mg, 1.02 mmol) and **MCF** (147 mg, 0.93 mmol) were heated to 100 °C during 40 minutes with microwave. The blue solid was filtered, washed with cold ethanol to give 250 mg of product (81 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.84 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H), 7.24 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 6.10 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 6.00 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H), 3.50–3.37 (m, 4H), 1.82–1.66 (m, 6H), 1.61 (s, 6H)

¹³C NMR (100 MHz, CD₂Cl₂): δ 176.0, 168.1, 166.7, 139.8, 139.6, 124.2, 114.5, 105.6, 105.5, 89.3, 86.2, 51.5 (2C), 26.5 (2C), 25.1 (2C), 23.7

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M+H]⁺ Calcd for C₁₈H₂₁N₂O₂S: 329.1318, found: 329.1310

PT-A2 *(E)-5,5-dimethyl-3-(phenylsulfonyl)-4-(2-(5-(piperidin-1-yl)thiophen-2-yl)vinyl)furan-2(5H)-one*



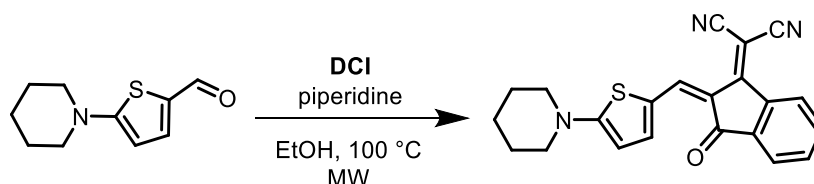
General procedure A: **PT** (300mg, 1.54 mmol) and **A2** (298mg, 1.1 mmol) were heated to 100 °C during 40 minutes with microwave. The red solid was filtered, washed with cold ethanol to give 200 mg of product (41 %).

¹H NMR (400 MHz, CD₂Cl₂): δ 8.04–7.99 (m, 2H), 7.65–7.58 (m, 1H), 7.56–7.50 (m, 2H), 7.40 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 7.29 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 7.21 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 6.09 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 3.47–3.38 (m, 4H), 1.78–1.64 (m, 6H), 1.63 (s, 6H)

¹³C NMR (100 MHz, CD₂Cl₂): δ 171.7, 166.9, 166.0, 141.7, 139.3, 133.7, 129.2 (2C), 128.1 (2C), 125.0, 114.9, 106.7, 105.5, 84.6, 51.7 (2C), 27.7 (2C), 25.4 (2C), 23.9

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M+H]⁺ Calcd for C₂₃H₂₆NO₄S₂: 444.1298, found: 444.1288

PT-DCI *(Z)-2-(3-oxo-2-((5-(piperidin-1-yl)thiophen-2-yl)methylene)-2,3-dihydro-1H-inden-1-ylidene)malononitrile*



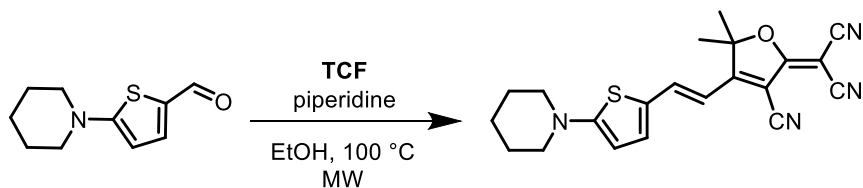
General procedure A: **PT** (100 mg, 0.51 mmol) and **DCI** (97 mg, 0.50 mmol) were heated to 100 °C during 40 minutes with microwave. The dark green solid was filtered, washed with cold ethanol to give 30 mg of product (16 %).

¹H NMR (300 MHz, CD₂Cl₂): δ 8.57 (s, 1H), 8.50(d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.74–7.50 (m, 4H), 6.44 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 3.72–3.60 (m, 4H), 1.87–1.65 (m, 6H)

¹³C NMR (100 MHz, CD₂Cl₂): δ 189.3, 175.5, 161.4, 152.1, 140.2, 137.0, 136.5, 133.7, 132.9, 124.5, 124.2, 122.3, 116.9, 116.7, 113.1, 109.6, 61.8, 51.9 (2C), 25.6 (2C), 23.7

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M+H]⁺ Calcd for C₂₂H₁₈N₃OS: 372.1165, found: 372.1160

PT-TCF *(E)-2-(3-cyano-5,5-dimethyl-4-(2-(5-(piperidin-1-yl)thiophen-2-yl)vinyl)furan-2(5H)-ylidene)malononitrile*



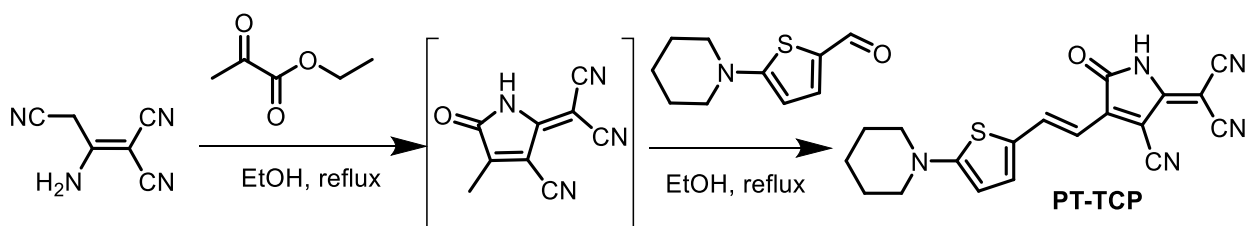
General procedure A: **PT** (200 mg, 1.02 mmol) and **TCF** (199 mg, 1 mmol) were heated to 100 °C during 40 minutes with microwave. The blue solid was filtered, washed with cold ethanol and acetone and recrystallized in ethanol to give 180 mg of product (48 %).

¹H NMR (300 MHz, CD₂Cl₂): δ 7.83 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 6.30 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 6.00 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 3.60–3.50 (m, 4H), 1.83–1.70 (m, 6H), 1.68 (s, 6H)

Solubility in CDCl₃, CD₂Cl₂ and DMSO too low for ¹³C NMR.

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M+H]⁺ Calcd for C₂₁H₂₁N₄OS: 377.1431, found: 377.1427

PT-TCP *(E)-2-(3-cyano-5-oxo-4-(2-(5-(piperidin-1-yl)thiophen-2-yl)vinyl)-1H-pyrrol-2(5H)-ylidene)malononitrile*

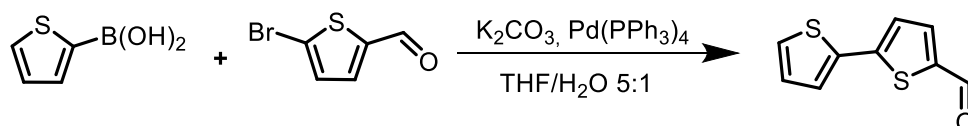


To a solution of malononitrile dimer (163 mg, 1.23 mmol) in ethanol (7 mL) under argon, ethyl pyruvate (238 mg, 2.04 mmol) was added and the solution was refluxed for 1 hour. The aldehyde (200 mg, 1.02 mmol) was added and the reaction medium was refluxed for another 3 hours. After letting the solution cool down overnight, the green precipitate was filtered, washed with water and ethanol and dried. The powder was partially recrystallized in DCM to give **PT-TCP** as a green powder.

¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 8.51 (broad, 1H), 8.04 (broad, 1H), 7.21 (broad, 1H), 6.13 (broad, 1H), 3.84 (broad, 4H), 1.70 (broad, 6H)

Solubility in CDCl₃, CD₂Cl₂ and DMSO too low for ¹³C NMR.

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M+H]⁺ Calcd C₁₉H₁₆N₅OS: 362.1070, found: 362.1055

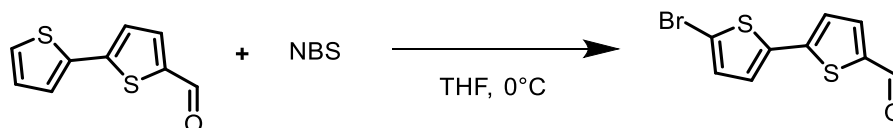
IV-1 *[2,2'-bithiophene]-5-carbaldehyde*

In a Schlenk, under argon atmosphere, 2-thiophene boronic acid (1.7 g, 13.3 mmol), K₂CO₃ (1.5 g, 10.8 mmol) and 5-bromothiophene-2-carbaldehyde (1.62 g, 8.5 mmol) were added to a THF/water mixture (20 mL and 4 mL). Argon was bubbled through the solution during 10 minutes before addition of the catalyst. The mixture was heated at 75 °C for one day. After cooling back to RT, DCM and water were added, the phases were separated and the organic phase was washed with water and brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated under vacuum. The product was purified by column chromatography over silica gel with PE/DCM 9:1 to 7:3 as eluent to give 500 mg of product (30%)

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9.86 (s, 1H), 7.67 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H), 7.25 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 7.10–7.05 (m, 1H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 182.7, 147.3, 141.9, 137.4, 136.2, 128.5, 127.2, 126.3, 124.4

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M+H]⁺ Calcd for C₉H₇OS₂: 194.9933, found: 194.9926

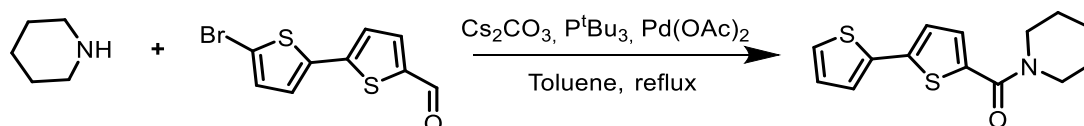
IV-2 *5'-bromo-[2,2'-bithiophene]-5-carbaldehyde*

IV-1 (300 mg, 1.55 mmol) was dissolved in THF (20 mL) and the solution was cooled at 0 °C. NBS (276 mg, 1.55 mmol) was then added portionwise. The reaction was followed by NMR. Once no starting material was left, water (30 mL) was added and the yellow precipitate was filtered, washed with water and dried to give 350 mg of product (83 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9.87 (s, 1H), 7.66 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 7.19 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 7.11 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 7.04 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 182.6, 146.0, 142.2, 137.6, 137.3, 131.3, 126.4, 124.5, 114.3

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M+H]⁺ Calcd for C₉H₆BrOS₂: 272.9038, found: 272.9043

IV-3 *[2,2'-bithiophen]-5-yl(piperidin-1-yl)methanone*

IV-2 (300 mg, 1.1 mmol), Cs₂CO₃ (540 mg, 1.65 mmol) and piperidine (160 μL, 1.65 mmol) were added in toluene (15 mL) in a Schlenk under argon. Pd(OAc)₂ (40 mg, 0.18 mmol) and P^tBu₃ (200 μL of a 1 M solution in toluene, 0.2 mmol) are added and the solution was heated at 110 °C for 24 hours. After

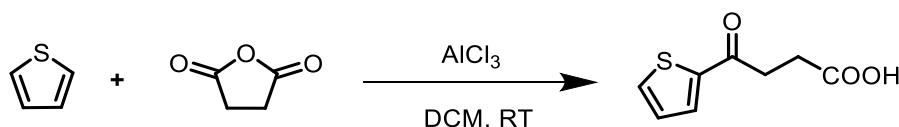
cooling down, DCM and water were added and the mixture was filtered. The solid was washed with DCM and the filtrate was separated, washed with water and brine and dried over Na₂SO₄. After concentration, the oil was purified by column chromatography over silica gel with DCM as eluent to give 200 mg of product (68 %).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.25 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 7.21 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 7.06 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 7.02 (dd, *J*₁ = 4.8 Hz, *J*₂ = 5 Hz, 1H), 3.70–3.65 (m, 4H), 1.74–1.59 (m, 6H)

¹³C NMR (100 MHz, CD₂Cl₂): δ 163.0, 140.3, 136.5, 136.2, 129.3, 128.1, 125.4, 124.8, 123.1, 46.9 (2C, broad), 26.2, 24.7 (2C)

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M+H]⁺ Calcd for C₁₄H₁₆NOS₂: 278.0668, found: 278.0655

IV-4 *4-oxo-4-(thiophen-2-yl)butanoic acid*



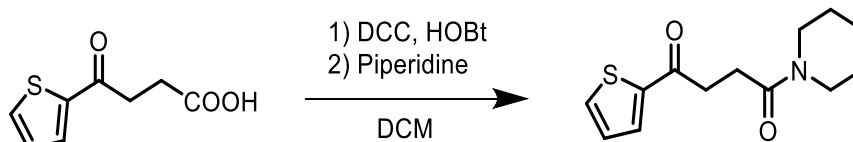
Under argon, a solution of thiophene (2 mL, 25 mmol) in DCM (12 mL) was added dropwise to a solution of succinic anhydride (2.1 g, 21 mmol) and AlCl₃ (6.15 g, 46 mmol) in DCM (20 mL). The mixture was stirred at room temperature for 5 h, then hydrolyzed by the successive addition of cold water (15 mL) and HCl (1 M solution, 20 mL). The mixture was extracted with DCM, the combined organic layers were extracted with a NaOH solution (1 M) then washed with DCM. After acidification with HCl, the product was extracted with DCM and the organic layer was dried over Na₂SO₄. Evaporation gave 3.3 g of a yellow solid (85 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.79 (dd, *J* = 3.8 Hz, 1H), 7.68 (dd, *J* = 4.9 Hz, 1H), 7.17 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H), 3.29 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.84 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 190.9, 178.5, 143.5, 134.0, 132.2, 128.3, 33.8, 28.1

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M + Na]⁺ calcd for C₈H₈NaO₃S: 207.0086, found: 207.0080

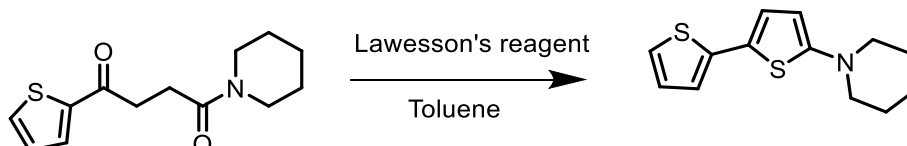
IV-5 *1-(piperidin-1-yl)-4-(thiophen-2-yl)butane-1,4-dione*



N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (1.3 g, 6.51 mmol) was added to a stirred solution of **IV-4** (1 g, 5.43 mmol) in DCM (40 mL). The solution was cooled down to 0 °C before addition of hydroxybenzotriazole (1 g, 6.51 mmol). After stirring at room temperature for 30 min, piperidine (0.5 g, 5.97 mmol) was added and the mixture was let react overnight. The solution was filtered and was washed with HCl (1 M) and a 5 % solution of NaHCO₃. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and evaporated under reduced pressure, the crude product was purified by column chromatography over silica gel with PE/EtOAc 1:1 as eluent to obtain 1.2 g of **IV-5** as a brown oil (88 %).

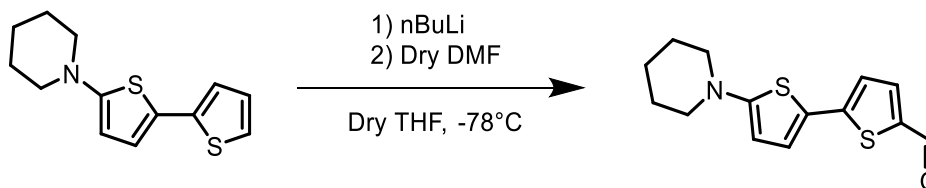
¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 192.5, 169.7, 144.2, 133.6, 132.2, 128.2, 46.6, 43.0, 34.5, 27.4, 26.5, 25.7, 24.7

IV-6 *1-([2,2'-bithiophen]-5-yl)piperidine*



¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.10 (dd, *J*₁ = 4.2 Hz, *J*₂ = 2.1 Hz, 1H), 7.00–6.93 (m, 2H), 6.86 (d, *J* = 3.9 Hz, 1H), 6.01 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 3.22–3.06 (m, 4H), 1.79–1.66 (m, 4H), 1.62–1.52 (m, 2H)

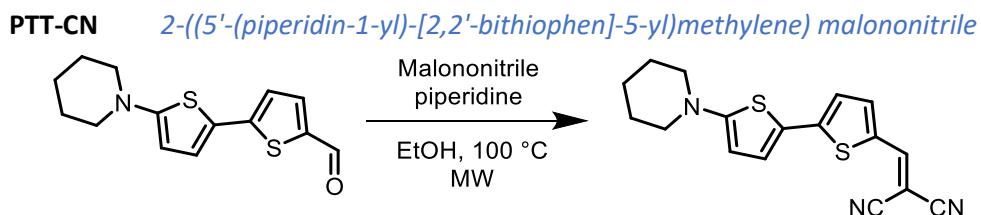
HR-MS (ESI-QTOF) m/z : $[M + H]^+$ calcd for $C_{13}H_{16}NS_2$: 250.0719, found: 250.0708



¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 9.76 (s, 1H), 7.58 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 7.11 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 6.96 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 5.98 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 3.25–3.15 (m, 4H), 1.78–1.65 (m, 4H), 1.65–1.55 (m, 2H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 182.1, 161.9, 149.6, 139.0, 138.2, 127.2, 121.0, 120.4, 104.6, 51.8 (2C), 25.1 (2C), 23.7

HR-MS (ESI-QTOF) m/z: [M + H]⁺ calcd for C₁₄H₁₆NOS₂: 278.0668, found: 278.0660

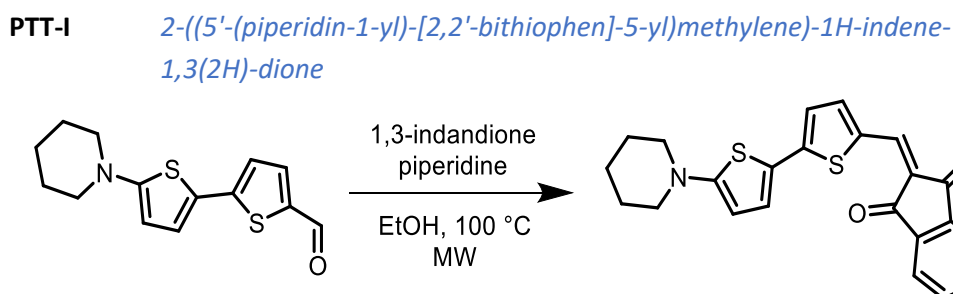


General procedure A: **PTT** (200 mg, 0.72 mmol) and malononitrile (0.66 mmol) were heated to 100 °C during 40 minutes by a microwave. The dark blue solid was filtered, washed with cold ethanol and purified by column chromatography over silica gel with DCM/PE 3:1 as eluent to give 150 mg of product (64 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.61 (s, 1H), 7.50 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 7.23 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 6.96 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 6.03 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 3.31–3.21 (m, 4H), 1.78–1.57 (m, 6H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 163.4, 152.5, 149.3, 141.3, 130.7, 129.7, 121.1, 119.0, 115.5, 114.6, 105.2, 71.5, 51.6 (2C), 25.1 (2C), 23.7

HR-MS (ESI-QTOF) m/z: [M + H]⁺ calcd for C₁₇H₁₆N₃S₂: 326.0780, found: 326.0770



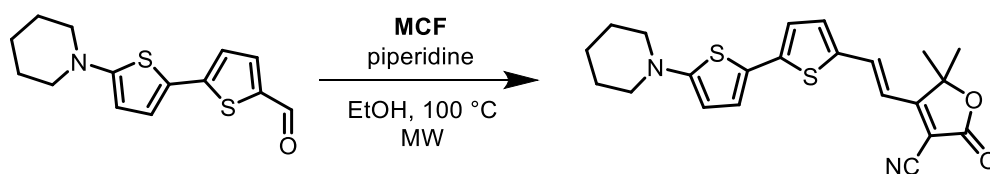
General procedure A: **PTT** (200 mg, 0.72 mmol) and 1,3-indandione (0.66 mmol) were heated to 100 °C during 40 minutes with a microwave. The green solid was filtered, washed with cold ethanol and purified by column chromatography over silica gel with DCM as eluent to give 183 mg of product (62 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.95–7.87 (m, 2H), 7.87 (s, 1H), 7.79 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 7.76–7.67 (m, 2H), 7.30 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 7.04 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 6.04 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 3.31–3.20 (m, 4H), 1.78–1.68 (m, 4H), 1.68–1.58 (m, 2H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 191.1, 190.2, 162.9, 154.0, 145.0, 142.0, 140.6, 136.0, 134.6, 134.4, 133.7, 128.7, 122.7, 122.5, 122.1, 121.2, 120.5, 105.1, 51.6 (2C), 25.1 (2C), 23.7

HR-MS (ESI-QTOF) m/z: [M + H]⁺ calcd for C₂₃H₂₀NO₂S₂: 406.0930, found: 406.0913

PTT-MCF *(E)-5,5-dimethyl-2-oxo-4-(2-(5'-(piperidin-1-yl)-[2,2'-bithiophen]-5-yl)vinyl)-2,5-dihydrofuran-3-carbonitrile*



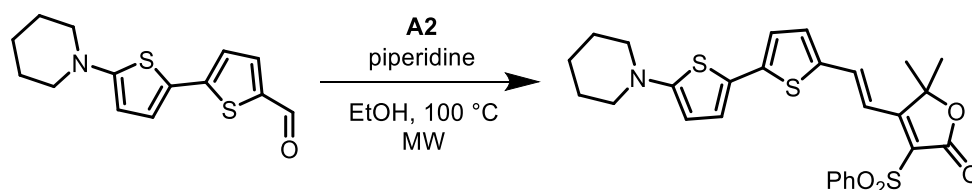
General procedure A: **PTT** (200 mg, 0.72 mmol) and **MCF** (0.66 mmol) were heated to 100 °C during 40 minutes with a microwave. The green solid was filtered, washed with cold ethanol and purified by column chromatography over silica gel with DCM as eluent to give 30 mg of product (10 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.82 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 7.25 (m, 1H), 7.08 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 6.36 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 6.00 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 3.27–3.18 (m, 4H), 1.78–1.65 (m, 4H), 1.66–1.58 (m, 2H), 1.63 (m, 8H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 175.8, 167.0, 161.9, 146.7, 318.3, 136.5, 135.7, 127.3, 121.9, 120.5, 113.2, 111.0, 104.8, 86.6, 51.8 (2C), 26.3 (2C), 25.1 (2C), 23.7

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M + Na]⁺ calcd for C₂₂H₂₂N₂NaO₂S₂: 411.1195, found: 411.1191

PTT-A2 *(E)-5,5-dimethyl-3-(phenylsulfonyl)-4-(2-(5'-(piperidin-1-yl)-[2,2'-bithiophen]-5-yl)vinyl)furan-2(5H)-one*



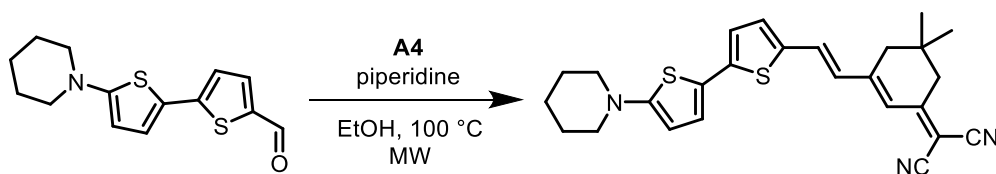
General procedure A: **PTT** (200 mg, 0.72 mmol) and **A2** (0.66 mmol) were heated to 100 °C during 40 minutes with a microwave. The dark green solid was filtered, washed with cold ethanol and purified by column chromatography over silica gel with DCM as eluent to give 270 mg of product (71 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.12 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.85 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 7.67–7.49 (m, 3H), 7.27 (d, *J* = 16 Hz, 1H), 7.22 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 7.11 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 6.01 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 3.27–3.18 (m, 4H), 1.79–1.57 (m, 6H), 1.68 (s, 6H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 170.6, 165.3, 161.7, 146.2, 140.3, 137.4, 136.8, 135.2, 134.0, 129.2 (2C), 128.6 (2C), 127.0, 121.8, 120.8, 120.4, 112.5, 104.8, 84.9, 51.8 (2C), 27.5 (2C), 25.2 (2C), 23.8

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M + Na]⁺ calcd for C₂₇H₂₇NNaO₄S₃: 548.0994, found: 548.0998

PTT-A4 *(E)-2-(5,5-dimethyl-3-(2-(5'-(piperidin-1-yl)-[2,2'-bithiophen]-5-yl)vinyl)cyclohex-2-en-1-ylidene)malononitrile*



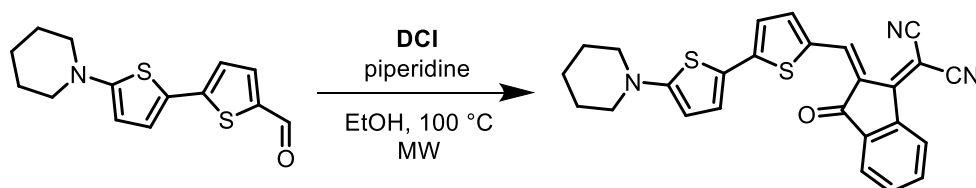
General procedure A: **PTT** (200 mg, 0.72 mmol) and **A4** (0.66 mmol) were heated to 100 °C during 40 minutes with a microwave. The black solid was filtered, washed with cold ethanol and purified by column chromatography over silica gel with DCM/PE 3:1 as eluent to give 180 mg of product (56 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.11 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.02 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 6.98 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.62 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 5.98 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 3.24–3.13 (m, 4H), 2.57 (s, 2H), 2.40 (s, 2H), 1.78–1.66 (m, 4H), 1.65–1.56 (m, 2H), 1.06 (s, 6H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 168.9, 160.7, 154.0, 142.5, 137.9, 131.9, 130.3, 126.9, 125.5, 122.5, 121.7, 121.6, 114.2, 113.3, 104.7, 52.0 (2C), 43.0, 39.2, 32.1, 28.2 (2C), 25.2 (2C), 23.7

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M + Na]⁺ calcd for C₂₆H₂₇N₃NaS₂: 468.1539; found: 468.1527

PTT-DCI *(Z)-2-(3-oxo-2-((5'-(piperidin-1-yl)-[2,2'-bithiophen]-5-yl)methylene)-2,3-dihydro-1H-inden-1-ylidene)malononitrile*



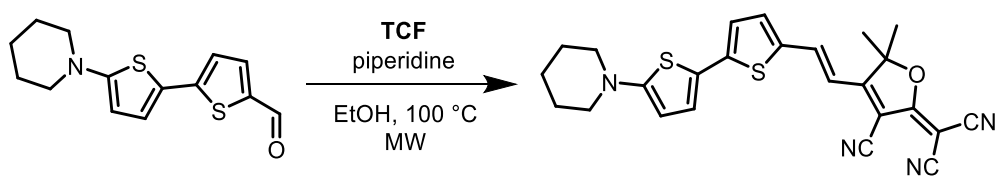
General procedure A: **PTT** (200 mg, 0.72 mmol) and **DCI** (0.66 mmol) were heated to 100 °C during 40 minutes with a microwave. The green solid was filtered, washed with cold ethanol and purified by column chromatography over silica gel with DCM as eluent to give 56 mg of product (17 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.74 (s, 1H), 8.62 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 7.85 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.74–7.62 (m, 3H), 7.40 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 7.06 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 6.08 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 3.37–3.27 (m, 4H), 1.80–1.60 (m, 6H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 188.8, 164.5, 160.9, 158.1, 148.0, 140.2, 137.0, 136.9, 134.6, 133.9, 133.7, 131.1, 125.0, 123.2, 122.4, 120.0, 118.8, 115.7, 115.6, 105.7, 66.3, 51.5 (2C), 25.1 (2C), 23.7

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M]⁺ calcd for C₂₆H₁₉N₃OS₂: 453.0964, found: 453.0966

PTT-TCF *(E)-2-(3-cyano-5,5-dimethyl-4-(2-(5'-(piperidin-1-yl)-[2,2'-bithiophen]-5-yl)vinyl)furan-2(5H)-ylidene)malononitrile*



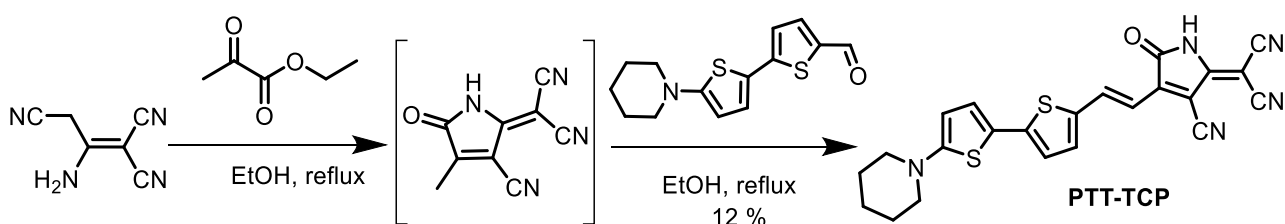
General procedure A: **PTT** (200 mg, 0.72 mmol) and **TCF** (0.66 mmol) were heated to 100 °C during 40 minutes with a microwave. The green solid was filtered, washed with cold ethanol and purified by column chromatography over silica gel with DCM as eluent to give 182 mg of product (55 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.76 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 7.19 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 6.96 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 6.40 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 6.04 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 3.33–3.24 (m, 4H), 1.79–1.60 (m, 6H), 1.72 (s, 6H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 176.2, 172.8, 163.2 150.0, 139.3, 138.8, 135.8, 129.3, 122.5, 119.9, 112.8, 112.0, 111.6, 110.3, 105.2, 96.8, 94.3, 51.6 (2C), 26.8 (2C), 25.1 (2C), 23.7

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M + Na]⁺ calcd for C₂₅H₂₂N₄NaOS₂: 481.1127; found: 481.1118

PTT-TCP *(E)-2-(3-cyano-5-oxo-4-(2-(5'-(piperidin-1-yl)-[2,2'-bithiophen]-5-yl)vinyl)-1H-pyrrol-2(5H)-ylidene)malononitrile*



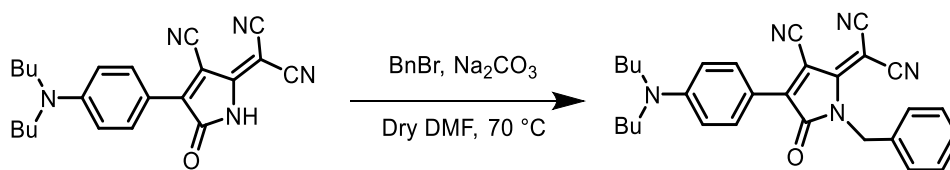
To a solution of malononitrile dimer (223 mg, 1.89 mmol) in ethanol (10 mL) under argon, ethyl pyruvate (438 mg, 3.77 mmol) was added and the solution was refluxed for 1 hour. The aldehyde (300 mg, 1.32 mmol) was added and the solution was refluxed for another 5 hours. The solvent was evaporated and the crude was purified by column chromatography over silica gel with DCM/EtOAc 3:1 as eluent to obtain **PTT-TCP** as a black solid (70 mg, 12 % yield).

¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 8.31 (broad, 1H), 7.89–7.69 (broad, 2H), 7.39 (m, 1H), 6.64 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H), 6.47–6.28 (broad, 1H), 3.56–3.45 (broad, 4H), 1.75–1.56 (broad, 6H)

Solubility in CDCl₃, CD₂Cl₂ and DMSO too low for ¹³C NMR.

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M + Na]⁺ calcd for C₂₃H₁₇N₅NaOS₂: 466.0767; found, 466.0760

TCPBn *2-(1-benzyl-3-cyano-4-(4-(dibutylamino)phenyl)-5-oxo-1H-pyrrol-2(5H)-ylidene)malononitrile*



The dye (100 mg, 0.27 mmol) was dissolved in anhydrous DMF (5 mL) under argon. Na₂CO₃ (14 mg, 0.13 mmol) was added and the mixture was heated to 70 °C for 1 hour. Then, benzyl bromide (40 µL, 0.33 mmol) was added and the mixture was stirred at 70 °C for another hour. After cooling down, water and DCM were added and the organic phase was separated and washed two more times with water. The solvent was evaporated and the crude was purified by column chromatography over silica gel with DCM as eluent to obtain **TCPBn** as a blue solid (50 mg, 40 % yield).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.56 (d, *J* = 9.4 Hz, 2H), 7.39–7.28 (m, 3H), 7.18 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 6.76 (d, *J* = 9.4 Hz, 2H), 5.36 (s, 2H), 3.46 (t, *J* = 7.8 Hz, 4H), 1.71–1.61 (m, 4H), 1.47–1.35 (m, 4H), 1.00 (t, *J* = 7.3 Hz, 6H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 167.8, 155.7, 153.5, 141.8, 134.5, 134.1 (2C), 129.2 (2C), 128.4, 126.8 (2C), 116.1, 114.1, 113.3, 113.1 (2C), 111.7, 94.7, 60.9, 51.5 (2C), 44.6, 29.8 (2C), 20.4 (2C), 14.0 (2C)

HR-MS (ESI-QTOF) *m/z*: [M + H]⁺ calcd for C₂₉H₃₀N₅O: 464.2445; found: 464.2445

B. Nanoparticles and nanoaggregates synthesis and characterization

The average particle size and size distribution of the nanoaggregates and nanoparticles were measured through Dynamic Light Scattering with a Zetasizer Nano ZS Particle Sizer. The morphologies of the nanoparticles were observed with a scanning electron microscope (Zeiss SUPRA 55VP, Germany) with the help of Frédéric Lerouge (LC ENS de Lyon).

1. Preparation of aggregates

a) *Optimized general procedure*

First, 1 mM stock solutions of compound in acetone were prepared. A solution containing the dye (250 µL of 1 mM in acetone, 2.5 · 10⁻⁴ mmol), pluronic F127 (50 µL of a 5 mg/mL solution in acetone, 0.25 mg) and acetone (250 µL) was made for a total volume of 0.55 mL. 5 mL of water were quickly injected followed by another addition of 5 mL of water. The acetone was removed with a rotating evaporator (30 °C,

100 mbar, 30 minutes). Finally, the aggregates were filtered through a 0.2 µm syringe filter (regenerated cellulose, Spartan, 0.2µm, 13mm).

b) Aggregates for cell imaging

The nanoaggregates suspensions were prepared according to the procedure above with PBS instead of water. Prior to imaging, sizes were measured by DLS and absorption and fluorescence were verified.

c) Preparation of co-aggregates

For co-loaded nanoaggregates, 1 mM stock solutions of each dye (donor and acceptor) in acetone was prepared. Then, water (5 mL) was injected to a 0.55 mL of acetone solution containing pluronic F127 (50 µL of a 5 mg/mL solution in acetone, 0.25 mg), donor (250 µL of 1 mM in acetone, $2.5 \cdot 10^{-4}$ mmol) and acceptor (0-4 molar percent of donor). This was followed by a second addition of water (5mL). Finally, the acetone was removed with a rotating evaporator (30 °C, 100 mbar, 30 minutes) and the solution was filtered through a 0.2 µm syringe filter (regenerated cellulose, Spartan, 0.2µm, 13m).

d) Scale up for photoacoustic imaging

In a typical experiment, in a 1 L round-bottom flask, the dye (10 mg) was dissolved in acetone (10 mL). The solution was sonicated for 2 minutes to ensure total dissolution of the dye. Pluronic F127 (2 mL of a 5 mg/mL solution in acetone) and acetone (8 mL) were added and the mixture was manually stirred during 10 seconds to ensure homogeneity. Two consecutives addition of water (200 mL each) gave the nanoaggregates. The acetone was evaporated (100 mbar) then the solution was concentrated to 5-10 mL. The solution was transferred in a 25 mL flask and was concentrated to less than 1 mL. For *in vivo* imaging, The correct quantity of sodium chloride was dissolved in the concentrated suspension to prepare saline solution (0.9 w% of NaCl). DLS measurement revealed no difference in size after adding sodium chloride. Absorption was measured after dilution by 50 of the solution with the use of 1 mm cuvettes.

	CPO1-A	CPO2-A	CPO1-B	CPO2-B	CPO1-C	CPO2-C	CPO1-D	CPO2-D
m _{dye} (mg)	0,51	0,55	3,2	3,5	7,7	8,4	10	10
m _{F127} (mg)	1	1	3,5	3,5	7,5	7,5	10	10
V _{acetone in total} (mL)	2	2	10,2	10,2	20	20	20	20
V _{water} (mL)	20	20	100	100	200	200	200	200
V _{water quenching} (mL)	20	20	100	100	200	200	200	200
V _{after evaporation} (mL)	0,96	1,1	1,1	1,6	0,58	0,4	0,43	0,7
C _{dye final} (mg/mL)	0,53	0,5	2,9	2,2	13,3	21	23,3	14,3

Tableau VI-1. Volume and mass used to prepare the different solution of nanoaggregates for photoacoustic imaging.

2. Preparation of pluronic/silica nanoparticles

F127-SiO₂ NPs were prepared by the following procedure. In a 5 mL round bottom flask, pluronic F127 (200 mg) and the dye (500 μ L from a 1 M solution in DCM, $5 \cdot 10^{-4}$ mmol) are dissolved in 1-2 mL of DCM. DCM was then evaporated by a gentle flow of argon. The obtained film was redissolved in a 0.85 M hydrochloric acid solution (3.1 mL) to give a optical transparent solution. TEOS (360 μ L) was added and the mixture was stirred for 105 minutes. DEDMS (30 μ L) was added to terminate the particle growth. The suspension was stirred at RT for 24 hours then was dialyzed for two days against distilled water to remove HCl as well as unreacted low-molecular weight molecules (cut-off 14,000 g/mol). Finally, the NPs solution was filtered through a 0.2 μ m filter (regenerated cellulose, Spartan, 0.2 μ m, 13mm).

C. Spectroscopy

Absorption spectra (UV-Vis) were recorded on a dual beam JASCO 670 spectrometer. Fluorescence spectra were performed on a Horiba Jobin-Yvon Fluorolog-3[®] spectrofluorimeter equipped with a red-sensitive Hamamatsu R928 or R2658 photomultiplier tubes. Spectra were reference corrected for both the excitation source light intensity variation (lamp and grating) and the emission spectral response (detector and grating).

1. Fluorescence quantum yields in solution

In solution, in nanoaggregates suspension or in nanoparticles, fluorescence quantum yields were measured by a comparative method involving the use of standard reference. The reference was selected based on similar absorption and emission range (if possible) as the sample to ensure both dyes can be excited at the same wavelength and that the detector response is similar for both emissions. A list of fluorescence reference can be found in the literature reported by Boens *et al.*^[275]

A diluted ($A < 0.12$) solution of reference in the appropriate solvent and a diluted solution of sample were prepared and absorbance at the excitation wavelength was measured for both the reference and the sample (A_{ref} and A_S). The fluorescence spectra were recorded using the same instrument configuration (excitation and emission slits, integration time). The integrated area under the fluorescence emission spectrum was determined (F_{ref} and F_S). This was repeated for at least five solutions with increasing or decreasing concentrations for reference and sample.

The slopes S_S and S_{ref} were obtained by plotting F vs A . The fluorescence quantum yield of sample relative to the reference is given by equation (VI-1):

$$\Phi = \Phi_{ref} \cdot \frac{S_s}{S_{ref}} \cdot \left(\frac{n_s}{n_{ref}} \right)^2 \quad (VI-1)$$

With Φ_{ref} the quantum yield of the reference and n_s and n_{ref} respectively the refractive indices of the solvents of the sample solution and reference solution.

Used references: Coumarine 153 in MeOH (45 %), Rubrene in MeOH (27 %), Cresyl violet in MeOH (54 %), Styryl 9M in CHCl_3 (54 %). The references were purchased from Aldrich and Acros Organic.

2. Fluorescence quantum yields in solid

The absolute fluorescence quantum yield of solids were determined using an integrating sphere collecting all the emission (2π steradians covered with spectralon®): Horiba Jobin Yvon, F-3018, according to Porrès *et al.*^[343] and de Mello *et al.*^[344] The sphere was corrected for both excitation and emission with standards. The principle is illustrated in the Figure VI-1 below.

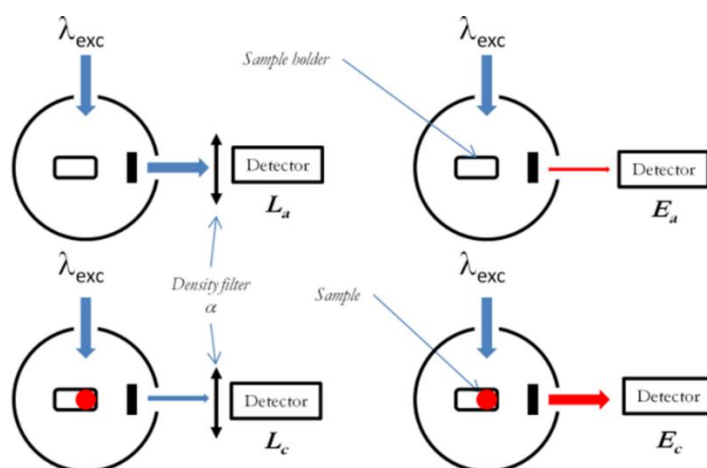


Figure VI-1. Method for absolute quantum yield measurements with an integrated sphere.^[105]

For each sample, 4 measurements were made giving four integrated intensities E_a , E_c , L_a and L_c . The fluorescence quantum yield is given by the equation (VI-2):

$$\Phi = \frac{E_c - E_a}{\alpha(L_a - L_c)} \quad (VI-2)$$

With

- E_a is the integrated fluorescence measured with the sphere empty without any sample (background).
- E_c is the integrated fluorescence of the sample.
- L_a is the integrated excitation profile of the empty sphere (detection between $\lambda_{exc}-10$ and $\lambda_{exc}+10$).
- L_c is the integrated excitation profile of the sample (detection between $\lambda_{exc}-10$ and $\lambda_{exc}+10$).
- α is the inverse of the density filter ($\approx 0.5\%$) used to reduce the amount of light sent to the detector (to avoid saturation) without changing the excitation profile.

All spectra were recorded using the same instrument configuration (excitation and emission slits opening and range of detection, integration time).

3. Solvatochromism

First, a 1 mM stock solution of the dye in chloroform was prepared. For each solvent, 10 μL of this solution was added to 2 mL of the solvent directly in the cuvette. The mixture was then shaken several times by hand to give the final solution with a concentration of 5 μM of dye.

Quantum yield were estimated by a comparative method (as described above) with the dye in chloroform as reference.

4. Fluorescence study in Acetone/water mixtures

First, a 1 mM stock solution of the dye in acetone was prepared. Suspensions were made directly in the quartz fluorescence cells. Water and acetone were mixed in the cell in the proportion of the given water fraction (f_w) to give a final volume of 2.5 mL, as shown in Table VI-1. 25 μL of stock solution in acetone was then quickly injected into the mixture solvent. The mixture was then shaken several times by hand to give the final suspension with a concentration of 10 μM of dye.

f_w	0	0.2	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
V_{water} (mL)	0	0.5	1	1.25	1.5	1.75	2	2.25
V_{acetone} (mL)	2.5	2	1.5	1.25	1	0.75	0.5	0.25
V_{stock} (μL)	25	25	25	25	25	25	25	25

Table VI-1. Volumes of water, acetone and solution of dye used for the preparation of the acetone/water mixtures.

D. Imaging

1. Cells imaging with aggregates

The aggregates for cells imaging were prepared according to the protocole described in B.1.b). Then, the solutions were diluted three times with Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM).

Hela cells (ATCC-CL-2) were maintained in DMEM supplemented with 10 % Fetal Bovine Serum (ThermoFisher Scientific) at 37 °C with a 5 % CO₂ atmosphere (and a relative humidity of 95%). Cells were seeded on Ibidi μ -Slide 4 Well treated with ibiTreat, 60000 per chamber, 16 hours before experiment. Before incubation, medium was removed and replaced by 2/3 of DMEM Fluorobrite without auto-

fluorescence (Gibco, ThermoFisher Scientific) and 1/3 of the diluted solution of dyes so that the final concentration in dye was 2.6 μ M.

For the first experiment (biphotonic excitation), cells were incubated with aggregates of **CbzOMeSPh**, **tBuCbzSPh**, **Ph3NSPh** or **Ph2NFSPH** during 2 hours at 37 °C with a 5 % CO₂ atmosphere then washed three times with PBS and kept in PBS with supplemented with 10 % Fetal Bovine Serum. Cells were imaged with a LSM 710 AxioObserver microscope (Zeiss) with a C-Anchroplan 32x objective under two photon excitation (880 nm for **CbzOMeSPh**, 940 nm for **tBuCBzSPh** and 1000 nm for **Ph3NSPh** and **Ph2NFSPH**). Fluorescence was collected between 500 nm and 715 nm in LAMBDA mode. Each fluorescence image was an average of four pictures and was recorded with the LSM5 software.

For the second experiment (confocal imaging), for aggregates of **CbzOMeSPh**, cells were incubated during 20 minutes at 37 °C with a 5 % CO₂ atmosphere before imaging. For aggregates of **tBuCbzSPh**, the incubation time was of 1 hour. Cells were imaged with a LSM 710 AxioObserver microscope (Zeiss) with a EC Plan-Neofluar 40x objective and a pinhole of 601 μ m (405 nm for **CbzOMeSPh** and 488 nm for **tBuCBzSPh**). Fluorescence was collected between 500 nm and 715 nm in LAMBDA mode. Each fluorescence image was an average of four pictures and was recorded with the LSM5 software.

2. Cell imaging with the F127-SiO₂ NPs

The aggregates for cells imaging were prepared according to the protocol described in B.2. Then, the solutions were diluted three times with Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM).

Hela cells (ATCC-CL-2) were maintained in DMEM supplemented with 10 % Fetal Bovine Serum (ThermoFisher Scientific) at 37 °C with a 5 % CO₂ atmosphere (and a relative humidity 95%). Cells were seeded on Ibidi μ -Slide 4 Well treated with ibiTreat, 60000 per chamber, 16 hours before experiment. Before incubation, medium was removed and replaced by 2/3 of DMEM Fluorobrite without auto-fluorescence (Gibco, ThermoFisher Scientific) and 1/3 of the diluted solution of dyes so that the final concentration in dye was 2.6 μ M.

For the confocal imaging, cells were incubated with F127-SiO₂ NPs of **Ph2NFSPH** during 70 minutes at 37 °C with a 5 % CO₂ atmosphere before imaging. Cells were imaged with a LSM 710 AxioObserver microscope (Zeiss) with a EC Plan-Neofluar 40x objective and a pinhole of 601 μ m (514 nm). Fluorescence was collected between 500 nm and 715 nm in LAMBDA mode. Each fluorescence image was an average of four pictures and was recorded with the LSM5 software.

3. Photoacoustic imaging

The experimental setup is shown on Figure IV-24. The beams of two CW laser diodes ($\lambda_1 = 415$ nm and $\lambda_2 = 660$ nm or 808 nm) are combined with a dichroic mirror. The laser diodes intensities are sinus modulated at $f_1 = 5$ MHz and $f_2 = 5.3$ MHz respectively. The beams are then expanded to fill the entrance

pupil of the microscope objective (Zeiss LD Epiplan 20X/0.4). At the output of the objective, the beam waists are about 1 μm and the mean optical powers are given in the Table VI-2. A two-axis galvanometric mirror scanner makes it possible to move the beams on the surface of the target to build an image, with a pixel dwell time of 150 μs . The position of the target is set by a motorized three-axis translation stage. The PA signal is collected through an ultrasound transmission gel by a focused piezoelectric transducer (NDT Systems, IBMF054). The electric signal of the transducer is finally amplified and demodulated by two lock-in amplifiers respectively running around f_1 and f_2 to recover both the amplitudes of the PA signals generated at λ_1 and λ_2 .

Diode\laser power	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%
415nm	0,7	1,5	2,3	3	3,7	4,2	4,7	5,2	5,7	6,1
660nm	0,8	1,7	2,7	3,6	4,2	5	6,2	7	7,8	7,2
808nm	0,3	0,7	1	1,2	1,45	1,7	2,2	2,4	2,7	3

Table VI-2. Mean optical powers in mW at the output of the objective for each wavelength and laser power.

Animal model. PA experiments were performed on the ears of white CD-1 IGS mice (Charles River, Écully, France). All efforts were made to minimize their number. They were housed in ventilated cages with food and water ad libitum in a 12 h light/dark cycle at $22 \pm 1^\circ\text{C}$. For the experience, mice were anesthetized using a gas mixture of 1% isoflurane in air/30% O_2 . Their body temperature was maintained at $36 - 37^\circ\text{C}$ using an electric heating pad with a feedback system. In experiments with dye infusion, mice were cannulated in a caudal vein (BD NeoflonTM, 16GA 0.6 x 19mm, Becton Dickinson, Helsingborg Sweden) and connected to a 1 ml syringe with a target volume of 0.1 mL (**CPO2-D**) or 0.2 mL (**CPO1-D**). Before positioning the ear on the lid of a petri dish ($\varnothing=10\text{mm}$) in the focal plane of the objective with ultrasound gel, ears were cleaned with a hear-removing cream (VEET, France) and rinsed with 70% ethanol.

In accordance with the policy of Clinatec (permit number: B38-185 10 003) and the French legislation, experiments were done in compliance with the European Parliament and the Council Directive of September 22, 2010 (2010/63/EU). The research involving animals was authorized by the Direction Départementale des Services Vétérinaires de l'Isère – Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, and the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, France permit number: 2015051914157522_v1 (PI: B. van der Sanden, permit number 38 09 40 for animal experiences).

Image processing was performed with the NIH ImageJ software. Acquisitions were averaged or summed to give the images (sums gave a better image brightness). Background was subtracted (rolling ball radius of 20 pixels). Finally, the signal of aggregates was colorized in green for **CPO1** and in cyan for **CPO2** and the signal of hemoglobin was left in gray.

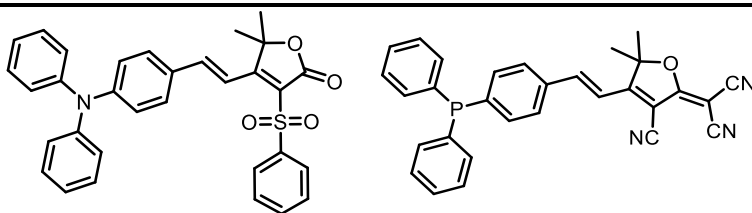
E. X-ray Crystallography

Single crystals of compounds **Ph3NA2**, **P1**, **SPh**, **Ph3NSPh**, **Ph3NSO2Ph**, **Ph2NFSPh**, **Ph2NFSO2Ph**, **CbzOMeA2**, **PT-TCF**, **PT-A2** and **PTT-TCF** were prepared by diffusion of a non-solvent (EtOH, diisopropylether -DIPE-, heptane -hept-) in a concentrated solution of dye (CHCl_3 or CH_2Cl_2) at room temperature, by recrystallization in EtOAc or by slow evaporation of a DCM/Ethanol mixture. The structure

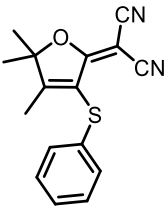
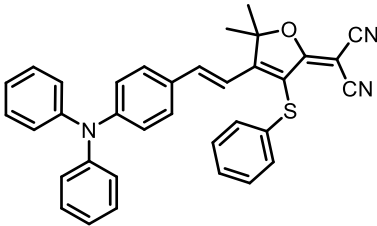
P1 was obtained with radiation of Cu K- α at 1.54184 Å. Other structures were obtained with Mo K- α at 0.71073 Å

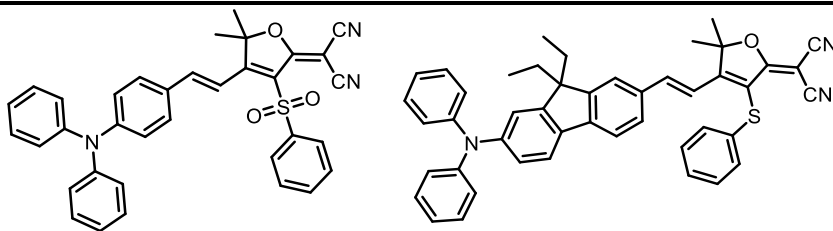
Data collection: Processing of the data was performed by the Kappa CCD analysis softwares. The lattice constants were refined by least-square refinement. No absorption correction was applied to the data sets.

Structure solution and refinement: Each system was attributed according to the observed systematic extinctions and the structures have been solved in the appropriate space group. The structure was solved by direct methods using the SIR97 program combined to Fourier difference syntheses and refined against F using reflections with $[I/\sigma(I) > 2]$ with the CRYSTALS program. All atomic 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 refinement details for all compounds.

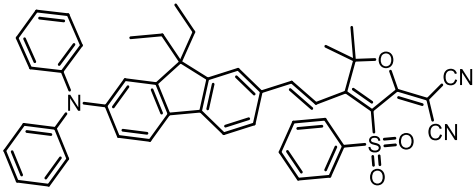
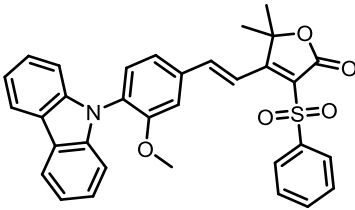


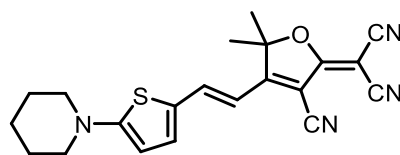
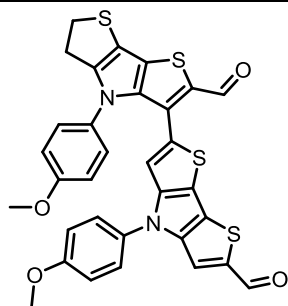
compound	Ph3NA2	Ph3PTCF
Cristal growth	CHCl ₃ /DIPE (diffusion)	CHCl ₃ /EtOH (diffusion)
empirical formula	C ₃₂ H ₂₇ NO ₄ S	C ₃₀ H ₂₂ N ₃ OP
formula weight	521.60	471.47
crystal system	Monoclinic	Monoclinic
space group	P2 ₁ /c	P2 ₁ /c
<i>a</i> [Å]	18.417 (5)	9.726 (5)
<i>b</i> [Å]	8.175 (5)	23.761 (5)
<i>c</i> [Å]	18.000 (5)	11.632 (5)
<i>α</i> [°]	90 (5)	90 (5)
<i>β</i> [°]	103.438 (5)	112.634 (5)
<i>γ</i> [°]	90 (5)	90 (5)
<i>V</i> [Å ³]	2635.87	2481.11
<i>Z</i>	4	4
<i>T</i> [K]	100	150
<i>D</i> _{calcd} [g · cm ⁻³]	1.172	1.262
<i>μ</i> [mm ⁻¹]	0.162	1.195
<i>θ</i> range [°]	3.42-29.25	3.61-66.91
total no. data	35749	26567
no.unique data	6739	4409
no. params refined	5166	3829
<i>R</i> ₁	0.0541	0.0394
<i>wR</i> ₂	0.1364	0.0971
GOF	1.035	1.020

 		
compound	SPh	Ph3NSPh
Cristal growth	EtOAc (recrystallization)	DCM/EtOH (diffusion)
empirical formula	C ₁₆ H ₁₄ N ₂ OS	C ₃₅ H ₂₇ N ₃ OS
formula weight	282.37	537.68
crystal system	Monoclinic	Orthorhombic
space group	P2 ₁ /c	Pbca
<i>a</i> [Å]	7.1180 (8)	11.1584 (17)
<i>b</i> [Å]	17.3683 (17)	15.1108 (17)
<i>c</i> [Å]	11.5631 (11)	33.728 (4)
α [°]	90 (5)	90
β [°]	94.347 (10)	90
γ [°]	90 (5)	90
<i>V</i> [Å ³]	1425.41	5686.96
<i>Z</i>	4	8
<i>T</i> [K]	150	150
<i>D</i> _{calcd} [g · cm ⁻³]	1.316	1.256
μ [mm ⁻¹]	0.22	0.15
θ range [°]	3.6–29.2°	3.7–28.0°
total no. data	19003	26527
no. unique data	3651	7022
no. params refined	2998	4048
<i>R</i> ₁	0.044	0.069
<i>wR</i> ₂	0.079	0.152
GOF	1.02	0.98

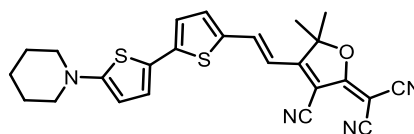
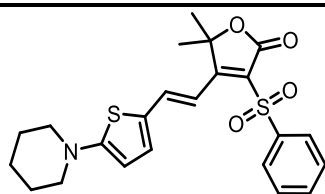


compound	Ph3NSO2Ph	Ph2NFSPPh
Cristal growth	CHCl ₃ /Hept (diffusion)	CHCl ₃ /DIPE (diffusion)
empirical formula	C ₃₅ H ₂₇ N ₃ O ₃ S	C ₄₆ H ₃₉ N ₃ OS
formula weight	569.68	681.90
crystal system	Monoclinic	Monoclinic
space group	P2 ₁ /c	P2 ₁ /c
<i>a</i> [Å]	22.307 (3)	22.113 (3)
<i>b</i> [Å]	9.2796 (9)	9.141 (8)
<i>c</i> [Å]	14.2356 (17)	19.164 (2)
α [°]	90	90
β [°]	104.766 (14)	105.731 (11)
γ [°]	90	90
<i>V</i> [Å ³]	2849.45	3728.62
<i>Z</i>	4	4
<i>T</i> [K]	150	150
<i>D</i> _{calcd} [g · cm ⁻³]	1.328	1.215
μ [mm ⁻¹]	1.34	0.13
θ range [°]	4.0–66.7°	3.0–27.6°
total no. data	21438	33835
no.unique data	5043	9283
no. params refined	3415	5723
<i>R</i> ₁	0.058	0.099
<i>wR</i> ₂	0.132	0.166
GOF	0.99	1.06

 		
compound	Ph2NFSO2Ph	CbzOMeA2
Cristal growth	CHCl ₃ /Hept (diffusion)	DCM/EtOH (evaporation)
empirical formula	C ₄₆ H ₃₉ N ₃ O ₃ S	C ₃₃ H ₂₇ NO ₅ S
formula weight	713.90	549.65
crystal system	Triclinic	Triclinic
space group	P $\bar{1}$	P $\bar{1}$
<i>a</i> [Å]	11.8120 (13)	10.1132 (19)
<i>b</i> [Å]	12.9977 (16)	11.5877 (13)
<i>c</i> [Å]	13.5311 (15)	13.317 (2)
α [°]	65.759 (11)	110.113 (12)
β [°]	79.321 (10)	98.892 (15)
γ [°]	87.886 (10)	91.922 (12)
<i>V</i> [Å ³]	1859.65	1441.48
<i>Z</i>	2	2
<i>T</i> [K]	150	200
<i>D</i> _{calcd} [g · cm ⁻³]	1.275	1.266
μ [mm ⁻¹]	0.13	0.15
θ range [°]	3.5–29.1°	3.0–25.4°
total no. data	27806	37735
no.unique data	9017	7396
no. params refined	6172	4261
<i>R</i> ₁	0.054	0.070
<i>wR</i> ₂	0.127	0.154
GOF	1.00	0.99



compound	II-13	PT-TCF
Cristal growth	CHCl ₃ /Hept (diffusion)	DCM/EtOH (diffusion)
empirical formula	C ₃₂ H ₂₁ N ₂ O ₄ S ₄ ·C ₃₂ H ₂₂ N ₂ O ₄ S ₄	C ₂₁ H ₂₀ N ₄ OS
formula weight	1252.59	376.48
crystal system	Orthorhombic	Monoclinic
space group	Pbca	P2 ₁ /c
<i>a</i> [Å]	16.7406 (18)	14.2509 (14)
<i>b</i> [Å]	19.9577 (19)	7.1057 (6)
<i>c</i> [Å]	34.483 (5)	19.424 (2)
<i>α</i> [°]	90	90
<i>β</i> [°]	90	106.264 (11)
<i>γ</i> [°]	90	90
<i>V</i> [Å ³]	11520.9	1888.21
<i>Z</i>	8	4
<i>T</i> [K]	150	100
<i>D</i> _{calcd} [g · cm ⁻³]	1.444	1.324
<i>μ</i> [mm ⁻¹]	0.37	0.19
<i>θ</i> _{range} [°]	3.4–26.0°	4.2–29.4°
total no. data	81737	25828
no.unique data	14822	4822
no. params refined	6184	4012
<i>R</i> ₁	0.072	0.055
<i>wR</i> ₂	0.252	0.164
GOF	1.03	0.98



compound	PT-A2	PTT-TCF
Cristal growth	CHCl ₃ /EtOH (diffusion)	DCM/Hept (diffusion)
empirical formula	C ₂₃ H ₂₅ NO ₄ S ₂	C ₂₅ H ₂₂ N ₄ OS ₂ ·CH ₂ Cl ₂
formula weight	443.58	543.54
crystal system	Monoclinic	Triclinic
space group	P2 ₁ /c	P $\bar{1}$
<i>a</i> [Å]	16.148 (5)	9.8731 (12)
<i>b</i> [Å]	11.883 (5)	11.7357 (15)
<i>c</i> [Å]	12.521 (5)	12.5844 (16)
α [°]	90	76.924 (11)
β [°]	111.442 (5)	80.106 (10)
γ [°]	90	68.394 (12)
<i>V</i> [Å ³]	2236.32	1314.2
<i>Z</i>	4	2
<i>T</i> [K]	100	150
<i>D</i> _{caled} [g · cm ⁻³]	1.317	1.373
μ [mm ⁻¹]	0.267	0.44
θ _{range} [°]	3.84–29.29°	3.0–27.5°
total no. data	26333	21360
no.unique data	5534	6547
no. params refined	4552	3819
<i>R</i> ₁	0.0381	0.069
<i>wR</i> ₂	0.0872	0.227
GOF	1.029	1.03

Références

- [1] B. Valeur, M. N. Berberan-Santos, *Molecular Fluorescence. Principles and Applications*, John Wiley & Sons, **2012**.
- [2] T. H. Maiman, *Nature* **1960**, *187*, 493–494.
- [3] J. Hecht, *Opt. Eng.* **2010**, *49*, 091002.
- [4] J. D. Bhawalkar, G. S. He, P. N. Prasad, *Rep. Prog. Phys.* **1996**, *59*, 1041.
- [5] G. S. He, L.-S. Tan, Q. Zheng, P. N. Prasad, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1245–1330.
- [6] M. Göppert-Mayer, *Ann. Phys.* **1930**, *401*, 273–294.
- [7] W. Kaiser, C. G. B. Garrett, *Phys. Rev. Lett.* **1961**, *7*, 229–231.
- [8] W. L. Peticolas, J. P. Goldsborough, K. E. Rieckhoff, *Phys. Rev. Lett.* **1963**, *10*, 43–45.
- [9] P. T. C. So, C. Y. Dong, B. R. Masters, K. M. Berland, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2000**, *2*, 399–429.
- [10] Z. Zheng, F. Caraguel, Y.-Y. Liao, C. Andraud, B. van der Sanden, Y. Bretonnière, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 94200–94205.
- [11] H.-B. Sun, S. Kawata, in *NMR • 3D Anal. • Photopolymerization*, Springer, Berlin, Heidelberg, **2004**, pp. 169–273.
- [12] B. H. Cumpston, S. P. Ananthavel, S. Barlow, D. L. Dyer, J. E. Ehrlich, L. L. Erskine, A. A. Heikal, S. M. Kuebler, I.-Y. S. Lee, D. McCord-Maughon, et al., *Nature* **1999**, *398*, 51–54.
- [13] W. Fan, P. Huang, X. Chen, *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 6488–6519.
- [14] Y. Shen, A. J. Shuhendler, D. Ye, J.-J. Xu, H.-Y. Chen, *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 6725–6741.
- [15] L. W. Tutt, T. F. Boggess, *Prog. Quantum Electron.* **1993**, *17*, 299–338.
- [16] 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.
- [17] M. Pawlicki, H. A. Collins, R. G. Denning, H. L. Anderson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3244–3266.
- [18] K. D. Belfield, D. J. Hagan, E. W. Van Stryland, K. J. Schafer, R. A. Negres, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1575–1578.
- [19] S. J. K. Pond, M. Rumi, M. D. Levin, T. C. Parker, D. Beljonne, M. W. Day, J.-L. Brédas, S. R. Marder, J. W. Perry, *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 11470–11480.
- [20] C. W. Dirk, L.-T. Cheng, M. G. Kuzyk, *Int. J. Quantum Chem.* **1992**, *43*, 27–36.
- [21] H. M. Kim, B. R. Cho, *Chem. Commun.* **2009**, *0*, 153–164.
- [22] S. Marder, D. Neher, Eds., *Photoresponsive Polymers I*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2008**.
- [23] D. Beljonne, W. Wenseleers, E. Zojer, Z. Shuai, H. Vogel, S. J. K. Pond, J. W. Perry, S. R. Marder, J.-L. Brédas, *Adv. Funct. Mater.* **2002**, *12*, 631–641.
- [24] W. Bentoumi, J.-C. Mulatier, P.-A. Bouit, Maury Olivier, A. Barsella, J.-P. Vola, E. Chastaing, L. Divay, F. Soyer, P. Le Barny, et al., *Chem. – Eur. J.* **2014**, *20*, 8909–8913.
- [25] L. Beverina, J. Fu, A. Leclercq, E. Zojer, P. Pacher, S. Barlow, E. W. Van Stryland, D. J. Hagan, J.-L. Brédas, S. R. Marder, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7282–7283.
- [26] N. S. Makarov, M. Drobizhev, A. Rebane, *Opt. Express* **2008**, *16*, 4029–4047.
- [27] S. de Reguardati, J. Pahapill, A. Mikhailov, Y. Stepanenko, A. Rebane, *Opt. Express* **2016**, *24*, 9053–9066.
- [28] M. Sheik-Bahae, A. A. Said, T. H. Wei, D. J. Hagan, E. W. V. Stryland, *IEEE J. Quantum Electron.* **1990**, *26*, 760–769.
- [29] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, **2013**.
- [30] “IBS - Photophysics of fluorescent proteins -,” can be found under <http://www.ibs.fr/local/cache-vignettes/L640xH421/jablsml-34e11.png?1520047431>, **2018**.
- [31] J. F. W. Herschel, *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **1845**, *135*, 143–145.
- [32] *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, Verlag Chemie., **1871**.
- [33] F. Würthner, R. Wortmann, R. Matschiner, K. Lukaszuk, K. Meerholz, Y. DeNardin, R. Bittner, C. Bräuchle, R. Sens, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2765–2768.
- [34] C. Reichardt, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2319–2358.

- [35] P.-A. Bouit, C. Aronica, L. Toupet, B. Le Guennic, C. Andraud, O. Maury, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4328–4335.
- [36] A. J. Huckaba, A. Yella, L. E. McNamara, A. E. Steen, J. S. Murphy, C. A. Carpenter, G. D. Punecky, N. I. Hammer, M. K. Nazeeruddin, M. Grätzel, et al., *Chem. – Eur. J.* **2016**, *22*, 15536–15542.
- [37] A. A. Ishchenko, A. V. Kulinich, S. L. Bondarev, V. N. Knyukshto, *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 13629–13637.
- [38] W. Rettig, M. Dekhtyar, *Chem. Phys.* **2003**, *293*, 75–90.
- [39] F. Würthner, G. Archetti, R. Schmidt, H.-G. Kuball, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4529–4532.
- [40] F. Bureš, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 58826–58851.
- [41] G. Qian, Z. W. Wang, *Chem. – Asian J.* **2010**, *5*, 1006–1029.
- [42] H. Meier, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2482–2506.
- [43] F. Effenberger, F. Würthner, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 719–721.
- [44] 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.
- [45] S. J. Lord, N. R. Conley, H. 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.
- [46] M. J. Kamlet, J. L. Abboud, R. W. Taft, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 6027–6038.
- [47] T. Parasassi, E. K. Krasnowska, L. Bagatolli, E. Gratton, *J. Fluoresc.* **1998**, *8*, 365–373.
- [48] H. Zhu, J. Fan, J. Du, X. Peng, *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 2115–2126.
- [49] S. Kao, A. N. Asanov, P. B. Oldham, *Instrum. Sci. Technol.* **1998**, *26*, 375–387.
- [50] C.-T. Chen, *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 4389–4400.
- [51] F. Cicoira, C. Santato, *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17*, 3421–3434.
- [52] A. J. C. Kuehne, M. C. Gather, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 12823–12864.
- [53] M. S. Meaney, V. L. McGuffin, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 2557.
- [54] K. Li, B. Liu, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 6570–6597.
- [55] O. Guillou, C. Daigebonne, G. Calvez, K. Bernot, *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 844–856.
- [56] X. Hou, C. Ke, C. J. Bruns, P. R. McGonigal, R. B. Pettman, J. F. Stoddart, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6884.
- [57] M. Shimizu, T. Hiayama, *Chem. – Asian J.* **2010**, *5*, 1516–1531.
- [58] A. Wakamiya, K. Mori, S. Yamaguchi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4273–4276.
- [59] J. A. Ferreira, G. Porter, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2 Mol. Chem. Phys.* **1977**, *73*, 340–348.
- [60] M. Kasha, H. R. Rawls, E.-B. M. Ashraf, *Pure Appl. Chem.* **1965**, *11*, 371–392.
- [61] J. Shi, L. E. Aguilar Suarez, S.-J. Yoon, S. Varghese, C. Serpa, S. Y. Park, L. Lüer, D. Roca-Sanjuán, B. Milián-Medina, J. Gierschner, *J. Phys. Chem. C* **2017**, *121*, 23166–23183.
- [62] J. Gierschner, S. Y. Park, *J. Mater. Chem. C* **2013**, *1*, 5818–5832.
- [63] M. Kasha, *Radiat. Res.* **1963**, *20*, 55–70.
- [64] Z. Chen, A. Lohr, C. R. Saha-Möller, F. Würthner, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 564–584.
- [65] Q. Li, Z. Li, *Adv. Sci.* **2017**, *4*, 1600484.
- [66] 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.
- [67] M. Ipuy, Y.-Y. Liao, E. Jeanneau, P. L. Baldeck, Y. Bretonniere, C. Andraud, *J. Mater. Chem. C* **2016**, *4*, 766–779.
- [68] M. Shirakawa, S. Kawano, N. Fujita, K. Sada, S. Shinkai, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 5037–5044.
- [69] S. Choi, J. Bouffard, Y. Kim, *Chem. Sci.* **2013**, *5*, 751–755.
- [70] J. Luo, Z. Xie, J. W. Y. Lam, L. Cheng, H. Chen, C. Qiu, H. S. Kwok, X. Zhan, Y. Liu, D. Zhu, et al., *Chem. Commun.* **2001**, *0*, 1740–1741.
- [71] T. Förster, K. Kasper, *Z. Für Phys. Chem.* **1954**, *1*, 275–277.
- [72] S. Hamann, J. F. Kiilgaard, T. Litman, F. J. Alvarez-Leefmans, B. R. Winther, T. Zeuthen, *J. Fluoresc.* **2002**, *12*, 139–145.
- [73] Y. Hong, J. W. Y. Lam, B. Zhong Tang, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5361–5388.
- [74] J. Mei, N. L. C. Leung, R. T. K. Kwok, J. W. Y. Lam, B. Z. Tang, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 11718–11940.
- [75] Y. Hong, J. W. Y. Lam, B. Zhong Tang, *Chem. Commun.* **2009**, *0*, 4332–4353.
- [76] B.-K. An, S.-K. Kwon, S.-D. Jung, S. Y. Park, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14410–14415.
- [77] S. J. Strickler, R. A. Berg, *J. Chem. Phys.* **1962**, *37*, 814–822.

- [78] J. Mohanty, W. M. Nau, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, *3*, 1026–1031.
- [79] X.-L. Peng, S. Ruiz-Barragan, Z.-S. Li, Q.-S. Li, L. Blancafort, *J. Mater. Chem. C* **2016**, *4*, 2802–2810.
- [80] J. Gierschner, L. Lüer, B. Milián-Medina, D. Oelkrug, H.-J. Egelhaaf, *J. Phys. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 2686–2697.
- [81] U. Rösch, S. Yao, R. Wortmann, F. Würthner, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7184–7188.
- [82] D. Presti, L. Wilbraham, C. Targa, F. Labat, A. Pedone, M. C. Menziani, I. Ciofini, C. Adamo, *J. Phys. Chem. C* **2017**, *121*, 5747–5752.
- [83] C.-H. Zhao, A. Wakamiya, Y. Inukai, S. Yamaguchi, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15934–15935.
- [84] 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.
- [85] L.-O. Pålsson, R. Beavington, M. J. Frampton, J. M. Lupton, S. W. Magennis, J. P. J. Markham, J. N. G. Pillow, P. L. Burn, I. D. W. Samuel, *Macromolecules* **2002**, *35*, 7891–7901.
- [86] A. Reisch, P. Didier, L. Richert, S. Oncul, Y. Arntz, Y. Mély, A. S. Klymchenko, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4089.
- [87] 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.
- [88] Z. Xie, B. Yang, F. Li, G. Cheng, L. Liu, G. Yang, H. Xu, L. Ye, M. Hanif, S. Liu, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14152–14153.
- [89] X. Cai, C.-J. Zhang, F. T. W. Lim, S. J. Chan, A. Bandla, C. K. Chuan, F. Hu, S. Xu, N. V. Thakor, L.-D. Liao, et al., *Small* **2016**, *12*, 6576–6585.
- [90] Q. Xia, Z. Chen, Z. Yu, L. Wang, J. Qu, R. Liu, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 17081–17088.
- [91] D. Wang, H. Su, R. T. K. Kwok, G. Shan, A. C. S. Leung, M. M. S. Lee, H. H. Y. Sung, I. D. Williams, J. W. Y. Lam, B. Z. Tang, *Adv. Funct. Mater.* **2017**, *27*, 1704039.
- [92] A. Shao, Y. Xie, S. Zhu, Z. Guo, S. Zhu, J. Guo, P. Shi, T. D. James, H. Tian, W.-H. Zhu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 7275–7280.
- [93] N. Alifu, L. Yan, H. Zhang, A. Zebibula, Z. Zhu, W. Xi, A. W. Roe, B. Xu, W. Tian, J. Qian, *Dyes Pigments* **2017**, *143*, 76–85.
- [94] M. Shimizu, K. Mochida, M. Katoh, T. Hiyama, *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114*, 10004–10014.
- [95] E. Genin, Z. Gao, J. A. Varela, J. Daniel, T. Bsaibess, I. Gosse, L. Groc, L. Cognet, M. Blanchard-Desce, *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 2258–2261.
- [96] Z. Zheng, T. Zhang, H. Liu, Y. Chen, R. T. K. Kwok, C. Ma, P. Zhang, H. H. Y. Sung, I. D. Williams, J. W. Y. Lam, et al., *ACS Nano* **2018**, DOI 10.1021/acsnano.8b03138.
- [97] A. Singh, C.-K. Lim, Y.-D. Lee, J. Maeng, S. Lee, J. Koh, S. Kim, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 8881–8888.
- [98] A. D'Aléo, D. Gachet, V. Heresanu, M. Giorgi, F. Fages, *Chem. – Eur. J.* **2012**, *18*, 12764–12772.
- [99] A. D'Aléo, M. H. Sazzad, D. H. Kim, E. Y. Choi, J. W. Wu, G. Canard, F. Fages, J.-C. Ribierre, C. Adachi, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 7003–7006.
- [100] D. L. Crossley, I. Vitorica-Yrezabal, M. J. Humphries, M. L. Turner, M. J. Ingleson, *Chem. – Eur. J.* **2016**, *22*, 12439–12448.
- [101] J. Massin, W. Dayoub, J.-C. Mulatier, C. Aronica, Y. Bretonnière, C. Andraud, *Chem. Mater.* **2011**, *23*, 862–873.
- [102] S. Redon, G. Eucat, M. Ipuy, E. Jeanneau, I. Gautier-Luneau, A. Ibanez, C. Andraud, Y. Bretonnière, *Dyes Pigments* **2018**, *156*, 116–132.
- [103] G. Eucat, Ingénierie moléculaire de nouveaux émetteurs à l'état solide et élaboration de nanoparticules coeur-coquilles pour l'imagerie médicale, PhD thesis, Université de Grenoble, **2014**.
- [104] M. Ipuy, Développement de nouveaux chromophores basés sur le groupement tricyanofurane pour différentes applications en biologie, PhD thesis, ENS LYON, **2014**.
- [105] Z. Zheng, Development of Far-Red / Near-Infrared Luminescent Chromophores and Nanoparticles for in Vivo Biphotonic Applications, PhD thesis, ENS Lyon, **2016**.
- [106] V. J. Pansare, S. Hejazi, W. J. Faenza, R. K. Prud'homme, *Chem. Mater.* **2012**, *24*, 812–827.
- [107] E. Hemmer, A. Benayas, F. Légaré, F. Vetrone, *Nanoscale Horiz.* **2016**, *1*, 168–184.
- [108] T. Vo-Dinh, *Biomedical Photonics Handbook*, CRC Press, **2003**.

- [109] J. V. Frangioni, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 7, 626–634.
- [110] Z. Zhou, J. Song, L. Nie, X. Chen, *Chem. Soc. Rev.* **2016**, 45, 6597–6626.
- [111] W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb, *Science* **1990**, 248, 73–76.
- [112] M. Oheim, D. J. Michael, M. Geisbauer, D. Madsen, R. H. Chow, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, 58, 788–808.
- [113] F. Helmchen, W. Denk, *Nat. Methods* **2005**, 2, 932–940.
- [114] I. A. Karpenko, Y. Niko, V. P. Yakubovskiy, A. O. Gerasov, D. Bonnet, Y. P. Kovtun, A. S. Klymchenko, *J. Mater. Chem. C Mater. Opt. Electron. Devices* **2016**, 4, 3002–3009.
- [115] A. S. Klymchenko, *Acc. Chem. Res.* **2017**, 50, 366–375.
- [116] M. A. Haidekker, E. A. Theodorakis, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 1669–1678.
- [117] V. Ntziachristos, *Nat. Methods* **2010**, 7, 603–614.
- [118] F. Scheffold, in *Opt. Imaging Neocortical Dyn.*, Humana Press, Totowa, NJ, **2014**, pp. 19–32.
- [119] L. V. Wang, J. Yao, *Nat. Methods* **2016**, 13, 627–638.
- [120] G. Ku, L. V. Wang, *Opt. Lett.* **2005**, 30, 507–509.
- [121] R. O. Esenaliev, A. A. Karabutov, A. A. Oraevsky, *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **1999**, 5, 981–988.
- [122] K. Maslov, H. F. Zhang, S. Hu, L. V. Wang, *Opt. Lett.* **2008**, 33, 929–931.
- [123] G. P. Luke, D. Yeager, S. Y. Emelianov, *Ann. Biomed. Eng.* **2012**, 40, 422–437.
- [124] A. G. Bell, *Am. J. Sci.* **1880**, Series 3 Vol. 20, 305–324.
- [125] M. W. Sigrist, *J. Appl. Phys.* **1986**, 60, R83–R122.
- [126] A. C. Tam, *Rev. Mod. Phys.* **1986**, 58, 381–431.
- [127] P. Beard, *Interface Focus* **2011**, 1, 602–631.
- [128] T. Bowen, in *1981 Ultrason. Symp.*, **1981**, pp. 817–822.
- [129] T. Bowen, R. L. Nasoni, A. E. Pifer, G. H. Sembroski, in *1981 Ultrason. Symp.*, **1981**, pp. 823–827.
- [130] R. G. Olsen, J. C. Lin, *Bioelectromagnetics* **1983**, 4, 397–400.
- [131] G. Ku, L. V. Wang, *Med. Phys.* **2000**, 27, 1195–1202.
- [132] R. A. Kruger, K. D. Miller, H. E. Reynolds, W. L. Kiser, D. R. Reinecke, G. A. Kruger, *Radiology* **2000**, 216, 279–283.
- [133] A. A. Oraevsky, S. L. Jacques, R. O. Esenaliev, F. K. Tittel, *Proc SPIE* **1994**, 2134, 2134–7.
- [134] A. A. Oraevsky, S. L. Jacques, F. K. Tittel, *Appl. Opt.* **1997**, 36, 402–415.
- [135] R. A. Kruger, *Med. Phys.* **1994**, 21, 127–131.
- [136] R. A. Kruger, P. Liu, Y. Fang, R. C. Appledorn, *Med. Phys.* **1995**, 22, 1605–1609.
- [137] R. O. Esenaliev, A. A. Karabutov, F. K. Tittel, B. D. Fornage, S. L. Thomsen, C. Stelling, A. A. Oraevsky, in *Opt. Tomogr. Spectrosc. Tissue Theory Instrum. Model Hum. Stud. II*, International Society For Optics And Photonics, **1997**, pp. 71–83.
- [138] C. G. A. Hoelen, F. F. M. de Mul, R. Pongers, A. Dekker, *Opt. Lett.* **1998**, 23, 648–650.
- [139] P. C. Beard, in *Biomed. Optoacoust. III*, International Society For Optics And Photonics, **2002**, pp. 54–63.
- [140] R. G. M. Kolkman, E. Hondebrink, W. Steenbergen, F. F. M. de Mul, *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **2003**, 9, 343–346.
- [141] X. Wang, Y. Pang, G. Ku, X. Xie, G. Stoica, L. V. Wang, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 803–806.
- [142] R. Fainchtein, B. J. Stoyanov, J. C. Murphy, D. A. Wilson, D. F. Hanley, *Proc SPIE* **2000**, 3916, 3916–15.
- [143] X. Wang, X. Xie, G. Ku, L. V. Wang, G. Stoica, *J. Biomed. Opt.* **2006**, 11, 024015.
- [144] L. V. Wang, S. Hu, *Science* **2012**, 335, 1458–1462.
- [145] J. Xia, J. Yao, L. V. Wang, *Electromagn. Waves Camb. Mass* **2014**, 147, 1–22.
- [146] K. Maslov, G. Stoica, L. V. Wang, *Opt. Lett.* **2005**, 30, 625–627.
- [147] J. Yao, L. V. Wang, *Laser Photonics Rev.* **2013**, 7, 758–778.
- [148] W. Xing, L. Wang, K. Maslov, L. V. Wang, *Opt. Lett.* **2013**, 38, 52–54.
- [149] A. Danielli, K. I. Maslov, A. Garcia-Urbe, A. M. Winkler, C. Li, L. Wang, Y. Chen, G. W. Dorn, L. V. Wang, *J. Biomed. Opt.* **2014**, 19, 086006.
- [150] S.-Y. Lee, Y.-H. Lai, K.-C. Huang, Y.-H. Cheng, T.-F. Tseng, C.-K. Sun, *Sci. Rep.* **2015**, 5, 15421.

- [151] Q. Miao, K. Pu, *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27*, 2808–2823.
- [152] J. Weber, P. C. Beard, S. E. Bohndiek, *Nat. Methods* **2016**, *13*, 639–650.
- [153] H.-C. Huang, S. Barua, G. Sharma, S. K. Dey, K. Rege, *J. Controlled Release* **2011**, *155*, 344–357.
- [154] S. Zackrisson, S. M. W. Y. van de Ven, S. S. Gambhir, *Cancer Res.* **2014**, *74*, 979–1004.
- [155] L. Nie, X. Chen, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 7132–7170.
- [156] W. Ni, X. Kou, Z. Yang, J. Wang, *ACS Nano* **2008**, *2*, 677–686.
- [157] Y. Xia, Y. Xiong, B. Lim, S. E. Skrabalak, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 60–103.
- [158] W. Li, X. Chen, *Nanomed.* **2015**, *10*, 299–320.
- [159] B. Nikoobakht, M. A. El-Sayed, *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 1957–1962.
- [160] J.-W. Kim, E. I. Galanzha, E. V. Shashkov, H.-M. Moon, V. P. Zharov, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 688–694.
- [161] G. Huang, S. Yang, Y. Yuan, D. Xing, *Appl. Phys. Lett.* **2011**, *99*, 123701.
- [162] Y.-S. Chen, W. Frey, S. Kim, P. Kruizinga, K. Homan, S. Emelianov, *Nano Lett.* **2011**, *11*, 348–354.
- [163] X. Yang, S. E. Skrabalak, Z.-Y. Li, Y. Xia, L. V. Wang, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3798–3802.
- [164] Y. Wang, X. Xie, X. Wang, G. Ku, K. L. Gill, D. P. O’Neal, G. Stoica, L. V. Wang, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1689–1692.
- [165] C. Kim, E. C. Cho, J. Chen, K. H. Song, L. Au, C. Favazza, Q. Zhang, C. M. Cobley, F. Gao, Y. Xia, et al., *ACS Nano* **2010**, *4*, 4559–4564.
- [166] L. Nie, S. Wang, X. Wang, P. Rong, Y. Ma, G. Liu, P. Huang, G. Lu, X. Chen, *Small* **2014**, *10*, 1585–1593.
- [167] K. Cheng, S.-R. Kothapalli, H. Liu, A. L. Koh, J. V. Jokerst, H. Jiang, M. Yang, J. Li, J. Levi, J. C. Wu, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 3560–3571.
- [168] J. W. M. Bulte, M. M. J. Modo, Eds., *Design and Applications of Nanoparticles in Biomedical Imaging*, Springer International Publishing, **2017**.
- [169] K. A. Homan, M. Souza, R. Truby, G. P. Luke, C. Green, E. Vreeland, S. Emelianov, *ACS Nano* **2012**, *6*, 641–650.
- [170] K. Homan, S. Kim, Y.-S. Chen, B. Wang, S. Mallidi, S. Emelianov, *Opt. Lett.* **2010**, *35*, 2663–2665.
- [171] G. Ku, M. Zhou, S. Song, Q. Huang, J. Hazle, C. Li, *ACS Nano* **2012**, *6*, 7489–7496.
- [172] E. V. Shashkov, M. Everts, E. I. Galanzha, V. P. Zharov, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 3953–3958.
- [173] N. Khlebtsov, L. Dykman, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1647–1671.
- [174] A. D. L. Zerda, C. Zavaleta, S. Keren, S. Vaithilingam, S. Bodapati, Z. Liu, J. Levi, B. R. Smith, T.-J. Ma, O. Oralkan, et al., *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 557–562.
- [175] V. P. Nguyen, Y. Oh, K. Ha, J. Oh, H. W. Kang, *Jpn. J. Appl. Phys.* **2015**, *54*, 07HF04.
- [176] A. de la Zerda, Z. Liu, S. Bodapati, R. Teed, S. Vaithilingam, B. T. Khuri-Yakub, X. Chen, H. Dai, S. S. Gambhir, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 2168–2172.
- [177] X. Yang, S. Skrabalak, E. Stein, B. Wu, X. Wei, Y. Xia, L. V. Wang, *Proc SPIE* **2008**, *6856*, 68560I.
- [178] K. Sano, M. Ohashi, K. Kanazaki, A. Makino, N. Ding, J. Deguchi, Y. Kanada, M. Ono, H. Saji, *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28*, 1024–1030.
- [179] K. Sano, M. Ohashi, K. Kanazaki, N. Ding, J. Deguchi, Y. Kanada, M. Ono, H. Saji, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *464*, 820–825.
- [180] C. Kim, K. H. Song, F. Gao, L. V. Wang, *Radiology* **2010**, *255*, 442–450.
- [181] J. Yao, K. I. Maslov, S. Hu, L. V. Wang, *Proc SPIE* **2010**, *7564*, 75642J.
- [182] W. Li, L. Xing, L. Tao, Z. Qian, L. Nie, in *2014 IEEE Biomed. Circuits Syst. Conf. BioCAS Proc.*, **2014**, pp. 93–96.
- [183] R. Watanabe, S. Sato, Y. Tsunoi, S. Kawauchi, T. Takemura, M. Terakawa, *68560I* **2015**, *9305*, 930523.
- [184] S. Ashkenazi, *J. Biomed. Opt.* **2010**, *15*, 040501.
- [185] E. Morgounova, Q. Shao, B. J. Hackel, D. D. Thomas, S. Ashkenazi, *J. Biomed. Opt.* **2013**, *18*, 056004.
- [186] D. Razansky, C. Vinegoni, V. Ntziachristos, *Opt. Lett.* **2007**, *32*, 2891–2893.
- [187] A. T. Press, A. Traeger, C. Pietsch, A. Mosig, M. Wagner, M. G. Clemens, N. Jbeily, N. Koch, M. Gottschaldt, N. Bézière, et al., *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5565.
- [188] J. Levi, A. Sathirachinda, S. S. Gambhir, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2014**, *20*, 3721–3729.

- [189] A. Mishra, Y. Jiang, S. Roberts, V. Ntziachristos, G. G. Westmeyer, *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 10785–10789.
- [190] N. Sim, S. Gottschalk, R. Pal, M. Delbianco, O. Degtyaruk, D. Razansky, G. G. Westmeyer, V. Ntziachristos, D. Parker, A. Mishra, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 15149–15152.
- [191] S. Onoe, T. Temma, K. Kanazaki, M. Ono, H. Saji, *J. Biomed. Opt.* **2015**, *20*, 096006.
- [192] J. Joseph, K. N. Baumann, P. Koehler, T. J. Zuehlsdorff, D. J. Cole, J. Weber, S. E. Bohndiek, S. Hernández-Ainsa, *Nanoscale* **2017**, *9*, 16193–16199.
- [193] S. Biffi, L. Petrizza, C. Garrovo, E. Rampazzo, L. Andolfi, P. Giustetto, I. Nikolov, G. Kurdi, M. B. Danailov, G. Zauli, et al., *Int. J. Nanomedicine* **2016**, *11*, 4865–4874.
- [194] S. Pascal, A. Haefele, C. Monnereau, A. Charaf-Eddin, D. Jacquemin, B. Le Guennic, C. Andraud, O. Maury, *J. Phys. Chem. A* **2014**, *118*, 4038–4047.
- [195] F.-F. An, Z.-J. Deng, J. Ye, J.-F. Zhang, Y.-L. Yang, C.-H. Li, C.-J. Zheng, X.-H. Zhang, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 17985–17992.
- [196] S. Sreejith, J. Joseph, M. Lin, N. V. Menon, P. Borah, H. J. Ng, Y. X. Loong, Y. Kang, S. W.-K. Yu, Y. Zhao, *ACS Nano* **2015**, *9*, 5695–5704.
- [197] D. Zhang, Y.-X. Zhao, Z.-Y. Qiao, U. Mayerhöffer, P. Spenst, X.-J. Li, F. Würthner, H. Wang, *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 2021–2029.
- [198] P. Anees, J. Joseph, S. Sreejith, N. Venugopal Menon, Y. Kang, S. W.-K. Yu, A. Ajayaghosh, Y. Zhao, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 4110–4116.
- [199] R. J. Paproski, A. Forbrich, E. Huynh, J. Chen, J. D. Lewis, G. Zheng, R. J. Zemp, *Small* **2016**, *12*, 371–380.
- [200] M. Erfanzadeh, M. Luciano, F. Zhou, C. Brückner, Q. Zhu, *Proc SPIE* **2017**, *10064*, 1006432.
- [201] E. Huynh, J. F. Lovell, B. L. Helfield, M. Jeon, C. Kim, D. E. Goertz, B. C. Wilson, G. Zheng, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 16464–16467.
- [202] K. K. Ng, M. Shakiba, E. Huynh, R. A. Weersink, Á. Roxin, B. C. Wilson, G. Zheng, *ACS Nano* **2014**, *8*, 8363–8373.
- [203] N. Muhanna, C. S. Jin, E. Huynh, H. Chan, Y. Qiu, W. Jiang, L. Cui, L. Burgess, M. K. Akens, J. Chen, et al., *Theranostics* **2015**, *5*, 1428–1443.
- [204] L. Li, D. Wang, L. Wang, D. Ramella, H. Wang, H. Gao, J. Zhang, Y. Xing, B. Li, Z. Yang, et al., *Dyes Pigments* **2018**, *148*, 501–507.
- [205] S. Banala, S. Fokong, C. Brand, C. Andreou, B. Kräutler, M. Rueping, F. Kiessling, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 6176–6181.
- [206] A. B. E. Attia, G. Balasundaram, W. Driessen, V. Ntziachristos, M. Olivo, *Biomed. Opt. Express* **2015**, *6*, 591–598.
- [207] C. J. H. Ho, G. Balasundaram, W. Driessen, R. McLaren, C. L. Wong, U. S. Dinish, A. B. E. Attia, V. Ntziachristos, M. Olivo, *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 5342.
- [208] Q. Jia, J. Ge, W. Liu, X. Zheng, M. Wang, H. Zhang, P. Wang, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 21124–21132.
- [209] N. Bézière, V. Ntziachristos, *J. Nucl. Med.* **2015**, *56*, 323–328.
- [210] M. J. Duffy, O. Planas, A. Faust, T. Vogl, S. Hermann, M. Schäfers, S. Nonell, C. A. Strassert, *Photoacoustics* **2018**, *9*, 49–61.
- [211] H. Huang, D. Wang, Y. Zhang, Y. Zhou, J. Geng, U. Chitgupi, T. R. Cook, J. Xia, J. F. Lovell, *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27*, 1574–1578.
- [212] Y. Zhou, D. Wang, Y. Zhang, U. Chitgupi, J. Geng, Y. Wang, Y. Zhang, T. R. Cook, J. Xia, J. F. Lovell, *Theranostics* **2016**, *6*, 688–697.
- [213] C. Mauriello-Jimenez, M. Henry, D. Aggad, L. Raehm, X. Cattoën, M. W. C. Man, C. Charnay, S. Alpugan, V. Ahsen, D. K. Tarakci, et al., *Nanoscale* **2017**, *9*, 16622–16626.
- [214] W. Hu, H. Ma, B. Hou, H. Zhao, Y. Ji, R. Jiang, X. Hu, X. Lu, L. Zhang, Y. Tang, et al., *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 12039–12047.
- [215] Y. Ni, R. K. Kannadorai, J. Peng, S. W.-K. Yu, Y.-T. Chang, J. Wu, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 11504–11507.

- [216] Y. Gawale, N. Adarsh, S. K. Kalva, J. Joseph, M. Pramanik, D. Ramaiah, N. Sekar, *Chem. Wein. Bergstr. Ger.* **2017**, *23*, 6570–6578.
- [217] Q. Tang, W. Si, C. Huang, K. Ding, W. Huang, P. Chen, Q. Zhang, X. Dong, *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 1566–1573.
- [218] K. Miki, A. Enomoto, T. Inoue, T. Nabeshima, S. Saino, S. Shimizu, H. Matsuoka, K. Ohe, *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 249–256.
- [219] H. Li, P. Zhang, L. P. Smaga, R. A. Hoffman, J. Chan, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 15628–15631.
- [220] H. J. Knox, J. Hedhli, T. W. Kim, K. Khalili, L. W. Dobrucki, J. Chan, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1794.
- [221] C. J. Reinhardt, E. Y. Zhou, M. D. Jorgensen, G. Partipilo, J. Chan, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 1011–1018.
- [222] B. Shi, X. Gu, Q. Fei, C. Zhao, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 2150–2155.
- [223] Z. Zha, Z. Deng, Y. Li, C. Li, J. Wang, S. Wang, E. Qu, Z. Dai, *Nanoscale* **2013**, *5*, 4462–4467.
- [224] K. Pu, A. J. Shuhendler, J. V. Jokerst, J. Mei, S. S. Gambhir, Z. Bao, J. Rao, *Nat. Nanotechnol.* **2014**, *9*, 233–239.
- [225] J. Liu, J. Geng, L.-D. Liao, N. Thakor, X. Gao, B. Liu, *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 2854–2862.
- [226] H. Chen, J. Zhang, K. Chang, X. Men, X. Fang, L. Zhou, D. Li, D. Gao, S. Yin, X. Zhang, et al., *Biomaterials* **2017**, *144*, 42–52.
- [227] Q. Fan, K. Cheng, Z. Yang, R. Zhang, M. Yang, X. Hu, X. Ma, L. Bu, X. Lu, X. Xiong, et al., *Adv. Mater.* **2015**, *27*, 843–847.
- [228] A.-P. Xu, H.-H. Han, J. Lu, P.-P. Yang, Y.-J. Gao, H.-W. An, D. Zhanng, L.-Z. Li, J.-P. Zhang, D. Wang, et al., *Dyes Pigments* **2016**, *125*, 392–398.
- [229] Y. Ni, R. K. Kannadorai, S. W.-K. Yu, Y.-T. Chang, J. Wu, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 4531–4535.
- [230] J. Qi, Y. Fang, R. T. K. Kwok, X. Zhang, X. Hu, J. W. Y. Lam, D. Ding, B. Z. Tang, *ACS Nano* **2017**, *11*, 7177–7188.
- [231] H. Xiao, C. Wu, P. Li, W. Gao, W. Zhang, W. Zhang, L. Tong, B. Tang, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 7025–7030.
- [232] S. Roberts, M. Seeger, Y. Jiang, A. Mishra, F. Sigmund, A. Stelzl, A. Lauri, P. Symvoulidis, H. Rolbieski, M. Preller, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 2718–2721.
- [233] A. Danielli, C. P. Favazza, K. Maslov, L. V. Wang, *Appl. Phys. Lett.* **2010**, *97*, 163701.
- [234] M. Frenette, M. Hatamimoslehabadi, S. Bellinger-Buckley, S. Laoui, J. La, S. Bag, S. Mallidi, T. Hasan, B. Bouma, C. Yelleswarapu, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 15853–15856.
- [235] M. Hatamimoslehabadi, S. Bellinger, J. La, E. Ahmad, M. Frenette, C. Yelleswarapu, J. Rochford, *J. Phys. Chem. C* **2017**, *121*, 24168–24178.
- [236] M. Frenette, M. Hatamimoslehabadi, S. Bellinger-Buckley, S. Laoui, S. Bag, O. Dantiste, J. Rochford, C. Yelleswarapu, *Chem. Phys. Lett.* **2014**, *608*, 303–307.
- [237] M. Stolar, T. Baumgartner, *Chem. – Asian J.* **2014**, *9*, 1212–1225.
- [238] T. Baumgartner, R. Réau, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 4681–4727.
- [239] H.-H. Chou, C.-H. Cheng, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 2468–2471.
- [240] D. Joly, D. Tondelier, V. Deborde, B. Geffroy, M. Hissler, R. Réau, *New J. Chem.* **2010**, *34*, 1603–1611.
- [241] A. Fukazawa, Y. Ichihashi, S. Yamaguchi, *New J. Chem.* **2010**, *34*, 1537–1540.
- [242] N. Lin, J. Qiao, L. Duan, H. Li, L. Wang, Y. Qiu, *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 19451–19457.
- [243] F. Bu, E. Wang, Q. Peng, R. Hu, A. Qin, Z. Zhao, B. Z. Tang, *Chem. – Eur. J.* **2015**, *21*, 4440–4449.
- [244] T. Sanji, K. Shiraishi, M. Tanaka, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2009**, *1*, 270–273.
- [245] Z. Miao, J. A. Reisz, S. M. Mitroka, J. Pan, M. Xian, S. B. King, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 16–19.
- [246] M. Onoda, H. Tokuyama, S. Uchiyama, K. Mawatari, T. Santa, K. Kaneko, K. Imai, K. Nakagomi, *Chem. Commun.* **2005**, *0*, 1848–1850.
- [247] A. Tirla, P. Rivera-Fuentes, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 14709–14712.
- [248] E. Öberg, H. Appelqvist, K. P. R. Nilsson, *Front. Chem.* **2017**, *5*, 28.
- [249] C. Wang, A. Fukazawa, M. Taki, Y. Sato, T. Higashiyama, S. Yamaguchi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 15213–15217.
- [250] L. H. Davies, B. Stewart, R. W. Harrington, W. Clegg, L. J. Higham, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4921–4924.

- [251] L. H. Davies, R. W. Harrington, W. Clegg, L. J. Higham, *Dalton Trans.* **2014**, 43, 13485–13499.
- [252] T. Hatakeyama, S. Hashimoto, M. Nakamura, *Org. Lett.* **2011**, 13, 2130–2133.
- [253] J. N. Smith, J. M. Hook, N. T. Lucas, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, 140, 1131–1141.
- [254] Luis G. Madrigal, Charles W. Spangler, *Proc SPIE* **1999**, 3796, 3796–8.
- [255] L. G. Madrigal, C. W. Spangler, *MRS Online Proc. Libr. Arch.* **1999**, 561, DOI 10.1557/PROC-561-75.
- [256] L. Madrigal, K. Kuhl, C. Spangler, *MRS Online Proc. Libr. Arch.* **1999**, 598, DOI 10.1557/PROC-598-BB8.9.
- [257] Z. Yuan, N. J. Taylor, T. B. Marder, I. D. Williams, S. K. Kurtz, L.-T. Cheng, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 0, 1489–1492.
- [258] T. Agou, J. Kobayashi, T. Kawashima, *Org. Lett.* **2005**, 7, 4373–4376.
- [259] X. He, J. Borau-Garcia, A. Y. Y. Woo, S. Trudel, T. Baumgartner, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 1137–1147.
- [260] T. T.-L. Au-Yeung, A. S. C. Chan, *Coord. Chem. Rev.* **2004**, 248, 2151–2164.
- [261] P. Natarajan, *Anal. Methods* **2014**, 6, 2432–2435.
- [262] F. Y. Kwong, C. W. Lai, M. Yu, K. S. Chan, *Tetrahedron* **2004**, 60, 5635–5645.
- [263] X. Xia, P. H. Toy, *Synlett* **2015**, 26, 1737–1743.
- [264] S. Liu, M. A. Haller, H. Ma, L. R. Dalton, S.-H. Jang, A. K.-Y. Jen, *Adv. Mater.* **2003**, 15, 603–607.
- [265] T. Le Bahers, C. Adamo, I. Ciofini, *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, 7, 2498–2506.
- [266] X. Yan, M. Remond, Z. Zheng, E. Hoibian, C. Soulage, S. Chambert, C. Andraud, B. Van der Sanden, F. Ganachaud, Y. Bretonnière, et al., *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, 10, 25154–25165.
- [267] C. Hansch, A. Leo, R. W. Taft, *Chem. Rev.* **1991**, 91, 165–195.
- [268] H. Deng, H. Hu, M. He, J. Hu, W. Niu, A. M. Ferrie, Y. Fang, *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 7385–7396.
- [269] M. He, T. M. Leslie, J. A. Sinicropi, *Chem. Mater.* **2002**, 14, 2393–2400.
- [270] M. He, T. M. Leslie, J. A. Sinicropi, *Chem. Mater.* **2002**, 14, 4662–4668.
- [271] G. Melikian, F. P. Rouessac, C. Alexandre, *Synth. Commun.* **1995**, 25, 3045–3051.
- [272] D. Villemin, L. Liao, *Synth. Commun.* **2001**, 31, 1771–1780.
- [273] M. Hanack, G. Bailer, J. Hackenberg, L. R. Subramanian, *Synthesis* **1991**, 1205–1208.
- [274] D. A. Torres, J. P. Ferraris, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 7589–7592.
- [275] N. Boens, W. Qin, N. Basarić, J. Hofkens, M. Ameloot, J. Pouget, J.-P. Lefèvre, B. Valeur, E. Gratton, M. vandeVen, et al., *Anal. Chem.* **2007**, 79, 2137–2149.
- [276] K. Rurack, M. Spieles, *Anal. Chem.* **2011**, 83, 1232–1242.
- [277] M. Y. Berezin, C. Zhan, H. Lee, C. Joo, W. J. Akers, S. Yazdanfar, S. Achilefu, *J. Phys. Chem. B* **2011**, 115, 11530–11535.
- [278] J. Massin, A. Charaf-Eddin, F. Appaix, Y. Bretonniere, D. Jacquemin, B. van der Sanden, C. Monnereau, C. Andraud, *Chem. Sci.* **2013**, 4, 2833–2843.
- [279] O. A. Kucherak, P. Didier, Y. Mély, A. S. Klymchenko, *J. Phys. Chem. Lett.* **2010**, 1, 616–620.
- [280] W. Lee, W. S. Jenks, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 474–480.
- [281] B. W. Vos, W. S. Jenks, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2544–2547.
- [282] R. S. Kathayat, N. S. Finney, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 12612–12614.
- [283] S. Malashikhin, N. S. Finney, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 12846–12847.
- [284] M. Monçalves, G. M. Zanotto, J. M. Toldo, D. S. Rampon, P. H. Schneider, P. F. B. Gonçalves, F. S. Rodembusch, C. C. Silveira, *RSC Adv.* **2017**, 7, 8832–8842.
- [285] S. T. Manjare, Y. Kim, D. G. Churchill, *Acc. Chem. Res.* **2014**, 47, 2985–2998.
- [286] F. Yu, P. Li, G. Li, G. Zhao, T. Chu, K. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 11030–11033.
- [287] S. Barlow, S. A. Odom, K. Lancaster, Y. A. Getmanenko, R. Mason, V. Coropceanu, J.-L. Brédas, S. R. Marder, *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114, 14397–14407.
- [288] B. Chen, H. Zhang, W. Luo, H. Nie, R. Hu, A. Qin, Z. Zhao, B. Z. Tang, *J. Mater. Chem. C* **2017**, 5, 960–968.
- [289] C. Wetzel, E. Brier, A. Vogt, A. Mishra, E. Mena-Osteritz, P. Bäuerle, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 12334–12338.
- [290] F. M. Jradi, D. O’Neil, X. Kang, J. Wong, P. Szymanski, T. C. Parker, H. L. Anderson, M. A. El-Sayed, S. R. Marder, *Chem. Mater.* **2015**, 27, 6305–6313.

- [291] M. Xu, M. Zhang, M. Pastore, R. Li, F. D. Angelis, P. Wang, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 976–983.
- [292] R. Kondo, T. Yasuda, Y. S. Yang, J. Y. Kim, C. Adachi, *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 16810–16816.
- [293] S. J. Evenson, T. M. Pappenfus, M. C. Ruiz Delgado, K. R. Radke-Wohlers, J. T. López Navarrete, S. C. Rasmussen, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 6101–6111.
- [294] S. Ko, H. Choi, M.-S. Kang, H. Hwang, H. Ji, J. Kim, J. Ko, Y. Kang, *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 2391–2399.
- [295] W. Zeng, Y. Cao, Y. Bai, Y. Wang, Y. Shi, M. Zhang, F. Wang, C. Pan, P. Wang, *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 1915–1925.
- [296] P.-Y. Ho, Y. Wang, S.-C. Yiu, W.-H. Yu, C.-L. Ho, S. Huang, *Org. Lett.* **2017**, *19*, 1048–1051.
- [297] A. B. Marco, R. Andreu, S. Franco, J. Garín, J. Orduna, B. Villacampa, R. Alicante, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 3919–3926.
- [298] A. B. Marco, N. Martínez de Baroja, S. Franco, J. Garín, J. Orduna, B. Villacampa, A. Revuelto, R. Andreu, *Chem. – Asian J.* **2015**, *10*, 188–197.
- [299] S. D. Oosterhout, V. Savikhin, J. Zhang, Y. Zhang, M. A. Burgers, S. R. Marder, G. C. Bazan, M. F. Toney, *Chem. Mater.* **2017**, *29*, 3062–3069.
- [300] S. Förtsch, A. Vogt, P. Bäuerle, *J. Phys. Org. Chem.* **2017**, *30*, e3743.
- [301] S. J. Evenson, S. C. Rasmussen, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 4054–4057.
- [302] A. Bhuwarka, J. F. Mike, J. J. Intemann, A. Ellern, M. Jeffries-EL, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 9462–9470.
- [303] B. O. Keller, J. Sui, A. B. Young, R. M. Whittall, *Anal. Chim. Acta* **2008**, *627*, 71–81.
- [304] S. Sharif, R. P. Rucker, N. Chandrasoma, D. Mitchell, M. J. Rodriguez, R. D. J. Froese, M. G. Organ, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 9507–9511.
- [305] M. Su, S. L. Buchwald, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 4710–4713.
- [306] R. Lemke, *Synthesis* **1974**, 359–361.
- [307] M. C. Brick, H. J. Palmer, T. H. Whitesides, *Langmuir* **2003**, *19*, 6367–6380.
- [308] W. S. Saad, R. K. Prud'homme, *Nano Today* **2016**, *11*, 212–227.
- [309] J. Geng, Z. Zhu, W. Qin, L. Ma, Y. Hu, G. G. Gurzadyan, B. Z. Tang, B. Liu, *Nanoscale* **2013**, *6*, 939–945.
- [310] A. V. Kabanov, E. V. Batrakova, V. Y. Alakhov, *J. Controlled Release* **2002**, *82*, 189–212.
- [311] E. V. Batrakova, A. V. Kabanov, *Fifth Int. Nanomedicine Drug Deliv. Symp.* **2008**, *130*, 98–106.
- [312] V. P. Torchilin, *J. Controlled Release* **2001**, *73*, 137–172.
- [313] Mathieu Maurin, Olivier Stephan, Jean-Claude A. Vial, Seth R. Marder, Boudewijn P. J. van der Sanden, *J. Biomed. Opt.* **2011**, *16*, 036001-16–7.
- [314] N. Rapoport, K. Caldwell, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **1994**, *3*, 217–228.
- [315] Q. Huo, J. Liu, L.-Q. Wang, Y. Jiang, T. N. Lambert, E. Fang, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6447–6453.
- [316] D. Genovese, S. Bonacchi, R. Juris, M. Montalti, L. Prodi, E. Rampazzo, N. Zaccheroni, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 5965–5968.
- [317] E. Rampazzo, F. Boschi, S. Bonacchi, R. Juris, M. Montalti, N. Zaccheroni, L. Prodi, L. Calderan, B. Rossi, S. Becchi, et al., *Nanoscale* **2012**, *4*, 824–830.
- [318] E. Rampazzo, S. Bonacchi, D. Genovese, R. Juris, M. Montalti, V. Paterlini, N. Zaccheroni, C. Dumas-Verdes, G. Clavier, R. Méallet-Renault, et al., *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 9261–9267.
- [319] J. Geng, C. C. Goh, W. Qin, R. Liu, N. Tomczak, L. G. Ng, B. Z. Tang, B. Liu, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 13416–13419.
- [320] S. M. A. Fateminia, Z. Wang, C. C. Goh, P. N. Manghnani, W. Wu, D. Mao, L. G. Ng, Z. Zhao, B. Z. Tang, B. Liu, *Adv. Mater.* **2017**, *29*, 1604100.
- [321] S. A. Vitale, J. L. Katz, *Langmuir* **2003**, *19*, 4105–4110.
- [322] R. Botet, *J. Phys. Conf. Ser.* **2012**, *352*, 012047.
- [323] M. Breton, G. Prével, J.-F. Audibert, R. Pansu, P. Tauc, B. Le Pioufle, O. Français, J. Fresnais, J.-F. Berret, E. Ishow, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 13268–13276.
- [324] M. Collot, T. K. Fam, P. Ashokkumar, O. Faklaris, T. Galli, L. Danglot, A. S. Klymchenko, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 5401–5411.
- [325] Z. Lu, N. Liu, S. J. Lord, S. D. Bunge, W. E. Moerner, R. J. Twieg, *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 797–810.

- [326] J. A. Davies, A. Elangovan, P. A. Sullivan, B. C. Olbricht, D. H. Bale, T. R. Ewy, C. M. Isborn, B. E. Eichinger, B. H. Robinson, P. J. Reid, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 10565–10575.
- [327] J. Tan, R. Li, D. Li, Q. Zhang, S. Li, H. Zhou, J. Yang, J. Wu, Y. Tian, *Dalton Trans.* **2014**, *44*, 1473–1482.
- [328] A. L. Capodilupo, V. Vergaro, F. Baldassarre, A. Cardone, G. A. Corrente, C. Carlucci, S. Leporatti, P. Papadia, G. Gigli, G. Ciccarella, *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1850*, 385–392.
- [329] D. Prim, G. Kirsch, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 6511–6526.
- [330] S.-H. Jang, J. Luo, N. M. Tucker, A. Leclercq, E. Zojer, M. A. Haller, T.-D. Kim, J.-W. Kang, K. Firestone, D. Bale, et al., *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 2982–2988.
- [331] A. Leclercq, E. Zojer, S.-H. Jang, S. Barlow, V. Geskin, A. K.-Y. Jen, S. R. Marder, J. L. Brédas, *J. Chem. Phys.* **2006**, *124*, 044510.
- [332] X. Ma, R. Liang, F. Yang, Z. Zhao, A. Zhang, N. Song, Q. Zhou, J. Zhang, *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 1756–1764.
- [333] R. Chen, X. Yang, H. Tian, X. Wang, A. Hagfeldt, L. Sun, *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 4007–4015.
- [334] M. M. M. Raposo, G. Kirsch, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 4891–4899.
- [335] M. Manuela M. Raposo, G. Kirsch, *HETEROCYCLES* **2001**, *55*, 1487.
- [336] C. L. Allen, J. M. J. Williams, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 3405–3415.
- [337] C. Cabanetos, W. Bentoumi, E. Blart, Y. Pellegrin, V. Montembault, Y. Bretonnière, C. Andraud, L. Mager, L. Fontaine, F. Odobel, *Polym. Adv. Technol.* **2013**, *24*, 473–477.
- [338] Q. Li, C. Lu, J. Zhu, E. Fu, C. Zhong, S. Li, Y. Cui, J. Qin, Z. Li, *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 4545–4551.
- [339] K. Schaper, S. A. M. Mobarekeh, P. Doro, D. Maydt, *Photochem. Photobiol.* **2010**, *86*, 1247–1254.
- [340] S. Ameen, S. B. Lee, S. C. Yoon, J. Lee, C. Lee, *Dyes Pigments* **2016**, *124*, 35–44.
- [341] J. Hai, B. Zhao, F. Zhang, C.-X. Sheng, L. Yin, Y. Li, E. Zhu, L. Bian, H. Wu, W. Tang, *Polymer* **2013**, *54*, 4930–4939.
- [342] Y.-Y. Wu, W.-T. Yu, T.-C. Hou, T.-K. Liu, C.-L. Huang, I.-C. Chen, K.-T. Tan, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 11507–11510.
- [343] L. Porrès, A. Holland, L.-O. Pålsson, A. P. Monkman, C. Kemp, A. Beeby, *J. Fluoresc.* **2006**, *16*, 267–273.
- [344] J. C. de Mello, H. F. Wittmann, R. H. Friend, *Adv. Mater.* **1997**, *9*, 230–232.